

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 045**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014 PCT/IB2014/063739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14772444 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 3030259**

54 Título: **Péptidos**

30 Prioridad:

06.08.2013 GB 201314052

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

18.04.2018

73 Titular/es:

**APITOPE INTERNATIONAL NV (100.0%)
Campus Diepenbeek Agoralaan
3590 Diepenbeek, BE**

72 Inventor/es:

WRAITH, DAVID

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 664 045 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

Péptidos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a péptidos, donde al menos parte de los cuales se deriva del receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR, por sus siglas en inglés). Estos péptidos pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Graves (GD, por sus siglas en inglés).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La enfermedad de Graves se caracteriza por una glándula tiroides hiperactiva, lo que da como resultado la producción de una cantidad excesiva de la hormona tiroidea y aumento de la glándula tiroides (bocio). El estado resultante de hipertiroidismo puede provocar una amplia gama de síntomas neuropsicológicos y físicos. GD es la causa más común de hipertiroidismo (60-90% de todos los casos) y normalmente se presenta en la etapa media de la vida, pero también aparece en niños, adolescentes y ancianos. Afecta hasta un 2% de la población femenina, y es entre cinco y diez veces más común en mujeres que en hombres. La GD pediátrica afecta aproximadamente a 6000 niños en EE. UU. y 6000 en la UE. La GD es también la causa más común de hipertiroidismo grave, que está acompañado por más señales y síntomas clínicos y anomalías de laboratorio en comparación con las formas más moderadas de hipertiroidismo.

15 Hay un fuerte componente hereditario ligado a GD. Sin embargo, no hay estudios poblacionales recientes sobre GD, existen unos pocos estudios cuasipoblacionales sobre hipertiroidismo y, por lo tanto, todas las estimaciones de la incidencia y prevalencia de GD son aproximadas. La incidencia del hipertiroidismo varía de 26:100 000 a 93:100 000 y se estima que la prevalencia global es de un 1.3%, siendo un 42% los casos evidentes y un 62% subclínicos.

20 Aproximadamente un 30-50% de las personas con GD también padecerán oftalmopatía de Graves (GO, por sus siglas en inglés), una protrusión de uno o ambos ojos. Muchos casos de GO son moderados y autolimitantes, sin embargo, un 20% de los casos presentan una enfermedad de significativa/moderada a grave, donde al menos la mitad de estos requieren esteroides y un 3-5% de los pacientes con GO presenta una enfermedad dolorosa que afecta a la visión con neuropatía óptica distiroidea (DON, por sus siglas en inglés). La protuberancia de los ojos puede provocar sequedad grave de la córnea ya que los párpados son incapaces de cerrarse de noche. El aumento de la presión del nervio óptico puede conllevar efectos en el campo visual y pérdida de visión. GO puede estar asociada con mixedema pretibial.

25 Virtualmente todos los síntomas y señales de GD son el resultado de efectos directos e indirectos del hipertiroidismo, siendo las principales excepciones GO, el bocio y el mixedema. Los síntomas del hipertiroidismo pueden incluir insomnio, temblor de las manos, hiperactividad, pérdida del cabello, sudoración excesiva, intolerancia al calor y pérdida de peso a pesar del aumento del apetito. Las señales adicionales más comunes son un tiroides sin dolorimiento, agrandado de manera difusa (normalmente simétrico), retracción palpebral, lagrimeo excesivo debido a la oftalmopatía de Graves, arritmias del corazón e hipertensión. Los pacientes tirotóxicos pueden experimentar cambios de personalidad y comportamiento tales como psicosis, agitación y depresión. En el hipertiroidismo más moderado, los pacientes pueden experimentar manifestaciones menos evidentes, por ejemplo, ansiedad, inquietud, irritabilidad e inestabilidad emocional.

30 En la actualidad no se dispone de una cura para GD y, por lo tanto, los tratamientos actuales se enfocan en actuar sobre los síntomas que se presentan. Existen tres modalidades de tratamiento para GD, fármacos antitiroideos orales (ATD, por sus siglas en inglés), yodo radiactivo (RAI, por sus siglas en inglés) y tiroidectomía. Las últimas dos estrategias dan como resultado un complemento de por vida con hormonas tiroideas. La terapia con radioyodo es el tratamiento más habitual 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.

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

40 Debido al éxito variable de cada opción de tratamiento, a menudo los pacientes se someten a más de una estrategia si el primer tratamiento elegido no resulta ser totalmente exitoso. El riesgo de recidiva o hipotiroidismo posterior es sustancial y la eficacia general de los tratamientos disponibles para GD no llega a ser la deseable. Por lo tanto, se necesitan terapias alternativas para GD que sean eficaces para tratar GD y aliviar o reducir los síntomas de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Figura 1: Inmunogenicidad de RNB-5 en ratones DR3. Se sometieron los ratones (N=2 machos; N=2 hembras) a una exposición inicial a RNB-5 y después de 10 días, se cultivaron las células LN (combinadas según el sexo) y los esplenocitos con concentraciones diferentes de péptidos y se midió la proliferación celular. Los índices de

estimulación (SI, por sus siglas en inglés) representan la relación de incorporación de timidina del cultivo estimulado con péptidos respecto al del cultivo no estimulado. F, hembras; M, machos; LN, ganglios linfáticos.

5 Figura 2: Identificación de apítopos en RNB-5. Se inmunizaron ratones DR3 con RNB-5/CFA y se generaron hibridomas. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridoma específicas para TSHR con 5×10^4 células VAVY frescas (barras negras) o fijadas (barras blancas) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno (RNB-5 o péptido anidado en RNB-5). Se muestran clones representativos. Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por el antígeno. El gráfico representa la media de una medida duplicada y los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. APC, célula presentadora de antígenos.

10 Figura 3: Identificación de apítopos en RNB-5. Se inmunizaron ratones DR4 con TSHR/CFA y se generaron hibridomas. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridoma específicas para TSHR con 5×10^4 células BM14 frescas (barras negras) o fijadas (barras blancas) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno (TSHR, RNB-5 o péptido anidado en RNB-5). Se muestran clones representativos. Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por el antígeno. El gráfico representa la media de una medida duplicada. APC, célula presentadora de antígenos.

15 Figura 4A: Identificación de apítopos en RNB-4. Se inmunizaron ratones DR4 con TSHR-CFA y se generaron hibridomas. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridoma específicas para TSHR con 5×10^4 células BM14 frescas (barras negras) o fijadas (barras blancas) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno (TSHR, RNB-4 o péptido anidado en RNB-4). Se muestra un clon representativo. Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por el antígeno y se muestra como valores OD. El gráfico representa la media de una medida duplicada y los resultados son representativos de 3 medidas independientes. APC, célula presentadora de antígenos.

20 Figura 4B: Identificación de apítopos en RNB-4. Se inmunizaron ratones DR4 con TSHR/CFA y se generaron hibridomas. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridoma específicas para TSHR con 5×10^4 células BM14 frescas (barras negras) o fijadas (barras blancas) y antígeno (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TSHR o RNB-4; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptidos anidados en RNB-4). Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por el antígeno y se muestra como valores OD.

25 Figura 5: Protocolo de inducción de la inmunotolerancia *ex vivo*. A, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la parte posterior del cuello con 100 μg del péptido en los días -8, -6 y -4 (programa de dosis elevada). En el día 0, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la base de la cola RNB-5/CFA. B, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la parte posterior del cuello 0.1 μg , 1 μg y 10 μg del péptido en los días -15, -13 y -11, y después recibieron 3 inyecciones de 100 μg del péptido en los días -8, -6 y -4 (programa de aumento escalonado de la dosis). En el día 0, a los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la base de la cola TSHR/CFA o péptido/CFA. En ambos programas, los ratones se sacrificaron 10 días después de la inmunización para medir la proliferación de células LN y esplenocitos tras la reestimulación de TSHR.

30 Figura 6: Inducción de la tolerancia *ex vivo* mediante apítopos de RNB-5. Los ratones se pretrataron con apítopos de RNB-5 de acuerdo con el programa de dosis elevada (A-B) o el programa de aumento escalonado de la dosis (C-F). Los datos representan la media \pm SEM (siglas en inglés de error estándar de la media) de los valores de SI para los ratones tratados con PBS (líneas negras) y ratones tratados con péptido (líneas rojas). Los gráficos A, B, C, E y F representan experimentos realizados en ratones DR3, el gráfico D representa un experimento realizado en ratones DR4. Se utilizó ANOVA bidireccional para medir los efectos globales en tratamiento en la proliferación de los linfocitos T y los valores p están escritos en los gráficos. Se utilizaron pruebas *post-hoc* de Bonferroni y las diferencias significativas se indican en los gráficos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). SI, índice de estimulación; LN, ganglios linfáticos.

35 Figura 7: Inducción de la tolerancia *ex vivo* mediante péptidos RNB-9. Los ratones DR3 se pretrataron de acuerdo con el programa de aumento escalonado de la dosis con RNB-9B (A, C) o RNB-9C (B,D). Los datos representan la media \pm SEM (siglas en inglés de error estándar de la media) de los valores de SI para los ratones tratados con PBS (líneas negras) y ratones tratados con péptido (líneas rojas). Se utilizó ANOVA bidireccional para medir los efectos globales en tratamiento en la proliferación de los linfocitos T y los valores p están escritos en los gráficos. Se utilizaron pruebas *post-hoc* de Bonferroni y las diferencias significativas se indican en los gráficos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). SI, índice de estimulación; LN, ganglios linfáticos.

40 Figura 8: Niveles de anticuerpo para TSHR (IgG total) medidos mediante ELISA. Los ratones se inmunizaron una vez (grupo A+B) o dos veces (grupo C) con 50 μg de TSHR en adyuvante. Se muestran los valores OD por grupo como la media \pm SEM.

45 Figura 9: Niveles de T4 en suero en ratones inmunizados con LacZ-Ad y Ad-TSHR-Ad. Los datos mostrados son valores individuales para ratones de diferentes grupos antes (A), 4 semanas después (B) y 10 semanas después (C) de la primera inmunización. Se indica el número de hipertiroideos frente al número total de cada grupo. Los ratones se consideraron hipertiroideos cuando sus valores de T4 superaron la media + 2SD para los valores de T4 en suero en ratones inmunizados con LacZ-Ad. Los niveles de T4 medios no fueron significativamente diferentes entre ratones inyectados con TSHR-Ad y LacZ-Ad a las 4 o 10 semanas. Se consideró significativamente diferente el ANOVA unidireccional, con prueba *post-hoc* de Bonferroni, $p < 0.05$.

Figura 10: Niveles de anticuerpo anti-TSHR (IgG total, ELISA) en ratones inmunizados con LacZ-Ad y TSHR-Ad. Los datos mostrados son valores individuales para ratones de diferentes grupos antes (A), 4 semanas después (B) y 10 semanas después (C) de la primera inmunización. Se realizó el análisis estadístico con ANOVA unidireccional y pruebas *post-hoc* de Bonferroni. Se indican las diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

5 Figura 11: Respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivaron clones de hibridoma (representados en diferentes colores) con APC frescas y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2. El reemplazo de los aminoácidos de la región central de RNB-5D-GKK o RNB-5D-KKK obstaculiza el reconocimiento por los clones de hibridoma, lo que indica que estos aminoácidos son importantes en la región del epítipo.

Figura 12: Respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivaron clones de hibridoma (representados en diferentes colores) con APC frescas (barras con relleno) o fijadas (barras vacías) y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2.

15 Figura 13: Respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivaron clones de hibridoma (representados en diferentes colores) con APC frescas y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2.

20 Figura 14: Respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivaron clones de hibridoma (representados en diferentes colores) con APC fijadas y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2.

25 Figura 15: Respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivaron clones de hibridoma (representados en diferentes colores) con APC frescas y fijadas y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2.

30 Figura 16: Inducción de la tolerancia *ex vivo* mediante RNB 4K-GKK en ratones DR4 de acuerdo con el programa de aumento escalonado de la dosis. Se utilizó ANOVA bidireccional para medir los efectos globales en tratamiento en la proliferación de los linfocitos T y los valores p están escritos en los gráficos. Se utilizaron pruebas *post-hoc* de Bonferroni y se indican las diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Los datos representan la media \pm SEM para los ratones tratados con PBS (líneas negras) y péptido (líneas rojas). SI, índice de estimulación; LN, ganglios linfáticos.

35 Figura 17: Identificación de la región RNB12 mediante la reactividad de una línea de linfocitos T generada a partir de pacientes con la enfermedad de Graves. Se generó una línea de linfocitos T estimulando PBMC aisladas de un paciente con la enfermedad de Graves con RNB 12 durante 12 días. Después de un ciclo de reestimulación adicional de 12 días, se estudiaron los linfocitos T específicos para RNB12 para determinar el reconocimiento de los péptidos anidados individuales en la región RNB12. SI, índice de estimulación.

40 Figura 18: Identificación de apítopos en la región RNB12 utilizando TLC específicos para RNB12 generados a partir de un donante sano. Se cultivaron linfocitos T específicos para RNB12 con BM14, una línea celular humana que expresa moléculas MHC de clase II en presencia del péptido. Las barras negras representan la estimulación en presencia de células BM14 frescas, pero irradiadas y las barras blancas la presencia de APC fijadas. (Remítase a los materiales y métodos). Antes de añadir 3H-timidina a los cultivos, se recogió el sobrenadante del cultivo y se congeló. El sobrenadante se analizó para determinar IFN gamma (A) para confirmar la respuesta proliferativa de linfocitos T (B). TLC, línea de linfocitos T; APC, célula presentadora de antígenos; MHC de clase II, complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; SI, índice de estimulación; OD, densidad óptica.

45 Figura 19: Ejemplos de la inducción de la tolerancia *ex vivo* mediante péptidos modificados RNB5D en ratones DR3 de acuerdo con el programa de aumento escalonado de la dosis. Se utilizó ANOVA bidireccional para medir los efectos globales en tratamiento en la proliferación de los linfocitos T y los valores p están escritos en los gráficos. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Los datos representan la media \pm SEM para los ratones tratados con PBS (líneas negras) y con péptido (líneas rojas). SI, índice de estimulación. A: RNB5D-K1; B: RNB5D-K3; C: RNB5D-K16

50 Figura 20: Gráfico que ilustra el estado del apítopo de los péptidos modificados RNB5D. Un ejemplo de la respuesta de un clon de hibridoma específico para TSHR y RNB-5, aislado de ratones HLA-DR3 y HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Se cultivó el clon de hibridoma con APC frescas (barras negras) y fijadas (barras blancas) y 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno durante 48 horas antes de la determinación de la producción de IL-2.

COMPENDIO DE LOS ASPECTOS DE LA INVENCION

Los presentes inventores han identificado varios péptidos derivados de TSHR que son útiles en la prevención y/o tratamiento de GD.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno, que se selecciona entre los siguientes:

RNB_4K: NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID No. 62)

RNB_4K-GKK: KKG NLPNISRIYV SIDVTGKK (SEQ ID No. 63)

RNB_9B: GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID No 18)

Se puede seleccionar un péptido a partir de los siguientes péptidos de TSHR y derivados de estos:

RNB_5D-GKK: KKG IYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 12)

RNB_5D-KKK: KKK IYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 21)

RNB_5E-GKK: KKG YVSIDVTLQQLESHSGKK (SEQ ID No 13)

RNB_5A: ISRIYVSIDVTLQQL (SEQ ID No 6)

RNB_5B: SRIYVSIDVTLQQLE (SEQ ID No 7)

RNB_5C: RIYVSIDVTLQQLES (SEQ ID No 8)

RNB_5D: IYVSIDVTLQQLESH (SEQ ID No 9)

RNB_5E: YVSIDVTLQQLESHS (SEQ ID No 10)

RNB_5F: VSIDVTLQQLESHSF (SEQ ID No 11)

RNB_5F-GKK: KKG VSIDVTLQQLESHSFGKK (SEQ ID No 14)

RNB_4J-GKK: KKG SNLPNISRNVSIDVGKK (SEQ ID No 16)

RNB_4J: SNLPNISRIYVSIDV (SEQ ID No 15)

RNB_4K: NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID No. 62)

RNB_4K-GKK: KKG NLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID No. 63)

KNB_9A: TGLKMFPDLTKVYST (SEQ ID No 17)

RBB_9B: GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID No 18)

RMB_9C: LKMFPDLTKVSTDI (SEQ ID No 19)

KNB_9D: KMFPDLTKVSTDIF (SEQ ID No 20)

RNB_12A: LTLKLYNNGFTSVQG (SEQ ID No. 65)

RNB_12B: TLKLYNNGFTSVQGY (SEQ ID No. 66)

RNB_12B-KKK: KKK TLKLYNNGFTSVQGYKKK (SEQ ID No. 67)

El péptido puede comprender la secuencia de RNB 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, 4J, 4K, 9A, 9B, 9C, 9D, 12A o 12B, una variante de estas en la que uno o más aminoácidos han sido reemplazados por otro aminoácido, tal como K, que se ha modificado en uno o ambos extremos, por ejemplo, mediante la introducción de secuencias «GKK» o «KKK».

El péptido puede comprender la secuencia de RNB-5D, una variante de esta en la que uno o más aminoácidos han sido reemplazados por otro aminoácido, tal como K, que se ha modificado en uno o ambos extremos, por ejemplo, mediante la introducción de secuencias «GKK» o «KKK».

En la presente se describe un péptido que comprende la secuencia:

5 KK-(G/K)-aa1-(RNB-5D péptido)-aa2-aa3-Z-(G/K)-KK

donde aa1 no es un aminoácido, I, K o T;

el péptido RNB-5D es YVSIDVTLQQLE, o una variante de este en el cual uno o más aminoácidos han sido reemplazados por K,

aa2 no es un aminoácido, S o K;

10 aa3 no es un aminoácido, H o K;

que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno.

En esta realización, el péptido RNB-5D puede ser YVSIDVTLQQLE, o una variante de este en el cual uno, dos o tres aminoácidos son reemplazados por K.

15 El péptido de la invención se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítosos (Tabla 1): KGGIYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 12), KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 22), ICGGIKVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 23), KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 24), KGGIYVSIDVKLQQLESHGKK (SEQ ID No 25), KGGIYVSIDVTLQKLESHGKK (SEQ ID No 26), KGGIYVSIDVTLQQKESHGKK (SEQ ID No 27), KGGIYVSIDVTLQQLKSHGKK (SEQ ID No 28),
 20 KGGIYVSIDVTLQQLEKHGKK (SEQ ID No 29), KGGIYVSIDVTLQQLESKGGK (SEQ ID No 30), KGGYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 31), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 32), KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 35), KGGIYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 36), KGGIYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 37), KGGIYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No 38), KGGIYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 39), KGGIYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 40),
 25 KGGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 41), KGGTYVSIDVELQQLEGKK (SEQ ID No 42), KGGTYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No 43), KGGTYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 44), KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 45), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 21), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 46), KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 47), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 48), KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 49),
 30 KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK (SEQ ID No 50), KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID No 51), KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID No 52), KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK (SEQ ID No 53), KKKTYVSIDVTLQQLKSHKKK (SEQ ID No 54), KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK (SEQ ID No 55), KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK (SEQ ID No 56), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No 57), KKKYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID No 58), KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID No 59), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No 60), KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID No. 61).

El péptido se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítosos y tienen una solubilidad mejorada: KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 22), KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24), KGGYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 31), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 32), KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 35), KGGIYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 40), KGGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 42), KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 45), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 49), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVKLQKLEKKK (SEQ ID No. 58), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60), KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID No. 61).

45 El péptido se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítosos y tienen la mejor solubilidad: KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 32), KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 35), KGGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 42), KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 45), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 49), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

Los siguientes péptidos son de especial interés: KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 32), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 34), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende varios péptidos, incluidos uno o más péptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, para su uso en la supresión o prevención de la producción de autoanticuerpos para TSHR *in vivo*.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Graves en un sujeto.

10 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, en la producción de un medicamento para suprimir o prevenir la producción de autoanticuerpos para TSHR *in vivo*.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, en la producción de un medicamento para tratar y/o prevenir la enfermedad de Graves.

15 En la presente se describe un método para suprimir o prevenir la producción de autoanticuerpos para TSRH en un sujeto que comprende el paso de administración de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, al sujeto.

20 En la presente se describe un método para tratar la enfermedad de Graves en un sujeto que comprende el paso de administración de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, al sujeto.

El sujeto puede ser HLA-DR3 o HLA-DR4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

PÉPTIDOS

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido.

25 El término «péptido» se utiliza en el sentido normal para referirse a una serie de residuos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí normalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídico sintéticos.

30 El péptido de la presente invención se puede generar utilizando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar mediante técnicas en fase sólida (Roberge JY *et al.* (1995) *Science* 269: 202-204), escindir de la resina y purificar mediante cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo, Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co, Nueva York NY). La síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones que proporciona el proveedor.

35 Como alternativa, el péptido se puede generar mediante medios recombinantes o mediante escisión a partir de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido se puede obtener mediante escisión a partir de la proteína receptora de tirotrópina, a lo que puede seguir modificación de uno o ambos extremos. La composición de un péptido se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

40 A efectos prácticos, hay otras características diferentes que el péptido puede mostrar. Por ejemplo, es importante que el péptido sea lo suficientemente estable *in vivo* para ser útil desde un punto de vista terapéutico. La semivida del péptido *in vivo* puede ser de al menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas o 24 horas.

El péptido también puede mostrar una buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido puede mantener una conformación *in vivo* que permita que se una a una molécula de MHC en la superficie celular sin el impedimento esperado.

APÍTOPOS

45 En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T son capaces de reconocer epítopos internos de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno (APC) incorporan antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido se puede unir a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II dentro de la célula y ser llevado a la superficie celular. Cuando está presente en la superficie celular junto con una molécula de MHC, el péptido puede ser reconocido por un linfocito T (mediante el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés)), en cuyo caso el epítipo es un epítipo de linfocitos T.

Por lo tanto, un epítipo es un péptido que se puede derivar de un antígeno que es capaz de unirse al surco de unión peptídica de una molécula de MHC de clase I o II y de ser reconocido por un linfocito T.

5 El epítipo mínimo es el fragmento más corto que se puede derivar de un epítipo que es capaz de unirse al surco de unión peptídica de una molécula de MHC de clase I o II y de ser reconocido por un linfocito T. Para una región inmunógena concreta, es normalmente posible generar un «conjunto anidado» de péptidos solapantes que actúan como epítipos, todos los cuales contienen el epítipo mínimo pero difieren en sus regiones flanqueantes.

10 Del mismo modo, es posible identificar el epítipo mínimo para una combinación concreta de molécula de MHC:linfocito T midiendo la respuesta a péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta respecto al péptido que comprende los residuos 1-15 en la colección solapante, se pueden utilizar 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 epítipo mínimo.

15 Los presentes inventores han determinado previamente que existe un vínculo entre la capacidad de un péptido para unirse a una molécula de MHC de clase I o II y de ser presentado a un linfocito T sin un procesamiento adicional, y la capacidad del péptido para inducir tolerancia *in vivo* (WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse al surco de unión peptídica de una molécula de MHC sin un proceso adicional (por ejemplo, recorte) o se une en una conformación inapropiada, entonces no generará tolerancia *in vivo*. Por otra parte, si el péptido tiene el tamaño y la conformación adecuados para unirse directamente al surco de unión peptídica de MHC y de ser presentado a un linfocito T, entonces se puede predecir que este péptido será útil para la inducción de la tolerancia.

20 Por lo tanto, es posible investigar la capacidad de generar tolerancia de un péptido investigando si se puede unir a una molécula de MHC de clase I o II y ser presentado a un linfocito T sin un procesamiento del antígeno adicional *in vitro*.

25 Los péptidos de la presente invención son apítipos (nombre generado tomando las letras en mayúsculas en inglés de epiTOPOS Independientes del Procesamiento del Antígeno (*Antigen Processing-Independent epiTOPES*)) en el sentido de que son capaces de unirse a una molécula de MHC y estimular una respuesta a partir de linfocitos T específicos para TSHR sin un procesamiento del antígeno adicional. Se puede predecir que tales apítipos provocarán tolerancia a TSHR, siguiendo el método basado en reglas descrito en el documento WO 02/16410.

Un péptido de la presente invención puede tener cualquier longitud que sea capaz de unirse a una molécula de MHC de clase I o II sin ningún procesamiento adicional. Normalmente el péptido de la presente invención es capaz de unirse a MHC de clase II.

30 Los polipéptidos que se unen a las moléculas de MHC de clase I tienen una longitud normalmente de 7 a 13, más normalmente de 8 a 10 aminoácidos. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre los átomos de la cadena principal de péptido y sitios no variables en el surco de unión peptídica de todas las moléculas de MHC de clase I. Hay sitios no variables en ambos extremos del surco que se unen al extremo amino y carboxi del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan mediante un retorcimiento del esqueleto, a menudo en los residuos de prolina o glicina que permiten flexibilidad.

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

El péptido de la presente invención puede 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.

PORCIÓN

45 El péptido de la presente invención puede comprender la totalidad o una porción de los péptidos derivados de TSHR mostrados como las SEQ ID NOs 1-3.

El término «porción» se refiere a un péptido que se deriva de las SEQ ID NOs 1-3 y contiene al menos un epítipo mínimo del péptido.

50 Un péptido de este tipo puede comprender una o más mutaciones, normalmente sustituciones de aminoácidos dentro de la secuencia derivada de TSHR. El aminoácido se puede sustituir por un aminoácido tal como glicina, lisina o ácido glutámico. El péptido puede comprender hasta tres, hasta dos o hasta una sustitución de aminoácidos respecto a la secuencia derivada de TSHR.

Un péptido de este tipo puede comprender aminoácidos en uno o ambos extremos que no se pueden derivar a partir de la secuencia de TSHR. Por ejemplo, el péptido puede tener uno o más residuos de glicina y/o lisina y/o ácido

glutámico en uno o ambos extremos. Por ejemplo, los aminoácidos adicionales pueden comprender un espaciador de glicina o lisina, seguido por la pareja de aminoácidos KK, KE, EK o EE en uno o ambos extremos.

Por ejemplo, el péptido puede tener la siguiente fórmula:

KKG-porción derivada de TSHR-GKK.

- 5 El péptido, incluidos los aminoácidos no derivados de TSHR, puede ser un apítopo, es decir ser capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno.

RECEPTOR DE LA HORMONA ESTIMULADORA DEL TIROIDES (TSHR)

GD es una enfermedad autoinmunitaria provocada por linfocitos T y B autorreactivos que tienen como diana el autoantígeno primario, el receptor de la hormona estimuladora del tiroides (TSHR).

- 10 TSHR es un receptor acoplado a proteínas G en las células foliculares del tiroides en la glándula tiroides que estimula la producción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) mediante la cascada de señales de AMPc tras unirse a su ligando, la hormona estimuladora del tiroides (TSH). Tras la internalización, degradación y presentación del TSHR por las APC, los linfocitos T se activan e interactúan con linfocitos B autorreactivos, los cuales a su vez producen autoanticuerpos agonistas estimuladores dirigidos contra TSHR. Las inmunoglobulinas estimuladoras del tiroides se unen a la misma cavidad del receptor que TSH, activan la transducción de señales mediada por TSHR y dan lugar a la producción de un exceso de hormona tiroidea por parte de la glándula tiroides y crecimiento del tiroides.
- 15

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

- 20 El holorreceptor TSHR tiene 764 residuos y comprende un dominio extracelular N-terminal, al cual se une TSH, una serpiente (o dominio transmembrana) y un dominio intracelular C-terminal.

- TSHR comprende un dominio extracelular grande (418 aminoácidos) con residuos de Cys sumamente conservados, que facilitan la formación de una estructura terciaria de un dominio extracelular que puede ser importante tanto para la unión al ligando como para la conformación del receptor inactiva. El dominio extracelular comprende más de la mitad de la longitud total de la proteína y es suficiente para la unión del ligando de afinidad elevada. Después de ser transportada a la superficie celular, la molécula receptora se somete a una escisión intermolecular, que conlleva la eliminación de una secuencia de 50 aminoácidos entre los residuos 316 y 366. Como resultado, el receptor comprende dos subunidades, la subunidad α que comprende el dominio de unión al ligando extracelular y la subunidad β que comprende el dominio transmembrana y la secuencia C-terminal corta, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. En los pasos posteriores, la subunidad α se desprende, lo que conlleva un exceso de subunidades β que carecen del dominio de unión al ligando sobre la membrana celular.
- 25
- 30

Tras la unión de TSH circulante a TSHR, una cascada de señalización de la proteína G activa la adenililciclase y los niveles intercelulares de AMPc se elevan. El AMPc activa todos los aspectos funcionales de la célula del tiroides, incluidos el bombeo de yodo, síntesis de tiroglobulina, yodación, endocitosis y proteólisis, actividad peroxidasa del tiroides y liberación de hormonas.

- 35 La secuencia de aminoácidos de TSHR maduro se proporciona a continuación (SEQ ID No. 21).

```

1 mrapdlqlv lllldlprdlg gmgcssppe chqeedfrvt ckdiqripsl ppstqtkli
61 ethlrtpsh afsnlpnisr iyvsidvtlq qlshsfynl skvthieirn trnltyidpd
121 alkelplikf lgifntglkm fpdltkvyst diffileitd npymtsipvn afqglcnetl
181 tlkiyngft svqgyafngt kldavylnkn kyltvidkda fggvysgpsl ldvsqtsvta
241 lpskglehik eliarntwtl kklplslsfl hltradlsyp shccafknqk kirgileslm
301 cnessmqslr qrksvnains plhqeyeenl gdsivgykek skfqdthna hyyvffeeqe
361 deiigfggel knpgeetlqa fdshydytic qdsedmvctp ksdefnpced imgykflriv
421 vwfvsllall gnvfvllill tshyklvpr flmclafad fcmgmyllli asvdlythse
481 yynhaidwgt gpgcntagff tvfaselsvy tltvitlerw yaitfamrld rkirlrhaca
541 imvggwvcdf llallplvgi ssyakvsicl pmdtetplal ayivfvltln ivafvivecc
601 yvkiyitvrn pqynpgdkdt kiakrmavli ftdficmapi sfyalsainl kplitvsnsk
661 illvlfypln scanpflyai ftkafqrdvf illskfgick rqaqayrgqr vppknstdiq
721 vqkvthdmrq qlhmedvye lienshtpk kggqiseeym qtv1

```

- 40 El péptido de la invención se puede derivar, al menos en parte, de TSHR. El péptido o porción de este se puede derivar de una región de 64-92, 78-106, 107-135, 136-164 o 201-229 de TSHR. El péptido o la porción de este se puede derivar de un fragmento del antígeno que surge por el procesamiento general del antígeno por una célula presentadora de antígenos.

ES 2 664 045 T3

La región 64-92 de TSHR (RNB_4) tiene la siguiente secuencia:

LRTIPSHAFSNLPNISRIYVSDVTLQQL (SEQ ID No 2)

El péptido puede comprender el epítipo mínimo del siguiente péptido:

TSHR 73-87 (RNB_4J): SNLPNISRIYVSDV (SEQ ID No 15)

TSHR 73-87 (RNB_4J-GKK): KKGSNLPNISRIYVSDVGKK (SEQ ID No 16)

5 El péptido puede comprender el epítipo mínimo del siguiente péptido:

TSHR 74-88 (RNB_4K): NLPNISRIYVSDVT (SEQ ID No. 62)

TSHR 74-88 (RNB_4K-GKK): KKG NLPNISRIYVSDVTGKK (SEQ ID No. 63)

La región 78-106 de TSHR (RNB_5) tiene la siguiente secuencia:

ISRIYVSDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI (SEQ ID No 1)

10 El péptido puede comprender el epítipo mínimo de los siguientes péptidos: TSHR 78-92 (RNB_5A), 79-93 (RNB_5B), 80-94 (RNB_5C), 81-95 (RNB_5D), 82-96 (RNB_5E) y 83-97 (RNB_5F).

Las secuencias de TSHR 78-92, 79-93, 80-94, 81-95, 82-96 y 83-97 son:

TSHR 78-92 (RNB_5A): ISRIYVSDVTLQQL (SEQ ID No 6)

TSHR 79-93 (RNB_5B): SRIYVSDVTLQQLE (SEQ ID No 7)

TSHR 80-94 (RNB_5C): RIYVSDVTLQQLES (SEQ ID No 8)

TSHR 81-95 (RNB_5D): IYVSDVTLQQLESH (SEQ ID No 9)

TSHR 82-96 (RNB_5E): YVSDVTLQQLESHS (SEQ ID No 10)

TSHR 83-97 (RNB_5F): VSDVTLQQLESHSF (SEQ ID No 11)

TSHR 81-95 (RNB_5D-GKK): KGGIYVSDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 12)

TSHR 81-95 (RNB_5D-KKK): KKKIYVSDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 21)

TSHR 82-96 (RNB_5E-GKK): KGGYVSDVTLQQLESHSGKK (SEQ ID No 13)

TSHR 83-97 (RNB_5F-GKK): KGGVSDVTLQQLESHSFGKK (SEQ ID No 14)

La región 136-164 (RNB_9) de TSHR tiene la siguiente secuencia:

TGLKMFPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM (SEQ ID No 3)

El péptido puede comprender el epítipo mínimo de los siguientes péptidos: TSHR 136-150 (RNB_9A), 137-151 (RNB_9B), 138-152 (RNB_9C) y 139-153 (RNB_9D).

15 Las secuencias de TSHR 136-150, 137-151, 138-152 y 139-153 son:

TSHR 136-150 (RNB_9A): TGLKMFPDLTKVYST (SEQ ID No 17)

TSHR 137-151 (RNB_9B): GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID No 18)

TSHR 138-152 (RNB_9C): LKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID No 19)

TSHR 139-153 (RNB_9D): KMFPDLTKVYSTDIF (SEQ ID No 20)

La región 180-207 de TSHR (RNB_12) tiene la siguiente secuencia:

LTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL

(SEQ ID No 64)

El péptido puede comprender el epítipo mínimo de uno de los péptidos que se muestran en la siguiente tabla:

			SEQ ID No.
RNB-12	A	LTLKLYNNGFTSVQG	65
	B	TLKLYNNGFTSVQGY	66
	C	LKLYNNCFTSVQGYA	68
	D	KLYNNGFTSVQGYAF	69
	E	LYNNGFTSVQGYAFN	70
	F	YNNGFTSVQGYAFNG	71
	G	NNGFTSVQGYAFNGT	72
	H	NGFTSVQGYAFNGTK	73
	I	GFTSVQGYAFNGTKL	74
	J	FTSVQGYAFNGTKLD	75
	K	TSVQGYAFNGTKLDA	76
	L	SVQGYAFNGTKLDAV	77
	M	VQGYAFNGTKLDAVY	78

El péptido puede comprender el epítipo mínimo de uno de los siguientes péptidos:

TSHR 180-194 (RKB_12A): LTLKLYNNGFTSVQG (SEQ ID No. 65)

5 TSHR 180-194 (RNB_12B); TLKLYNNGFTSVQGY (SEQ ID No. 66)

TSHR 180-194 (RNB_12B-KKK): KKKTLKLYNNGFTSVQGYKKK (SEQ ID No. 67).

Un péptido también puede comprender la secuencia:

KK-(G/K)-aa1-(RNB-5D péptido)-aa2-aa3-Z-(G/K)-KK

donde aa1 no es un aminoácido, I, K o T;

10 el péptido RNB-5D es YVSIDVTLQQLE, o una variante de este en el cual uno o más aminoácidos han sido reemplazados por K,

aa2 no es un aminoácido, S o K;

aa3 no es un aminoácido, H o K;

15 que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno.

El péptido RNB-5D puede ser YVSIDVTLQQLE, o una variante de este en el cual uno, dos o tres aminoácidos son reemplazados por K.

20 El péptido la invención se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítos (Tabla 1): KKGIVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 12), KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 22), KKGIVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 23), KKGIVKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 24), KKGIVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 25), KKGIVSIDVTLQKLESHGKK (SEQ ID No 26),

5 KKGIVSIDVTLQQKESHGKK (SEQ ID No 27), KKGIVSIDVTLQQQLKSITGKK (SEQ ID No 28),
 KKGIVSIDVTLQQLEKHGKK (SEQ ID No 29), KKGIVSIDVTLQQLESKGKK (SEQ ID No 30),
 KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 31), KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 32), KKGIVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No 33), KKGIVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 34), KKGIVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No 35),
 10 KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 36), KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 37), KKGIVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No 38), KKGIVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 39), KKGIVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No 40),
 KKGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 41), KKGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 42),
 KKGTYVSIDVTLQCLEGKK (SEQ ID No 43), KKGTYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 44),
 KKGTYVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No 45), KKKTYVSTDVTLQQLESTIKKK (SEQ ID No 21),
 15 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 46), KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 47),
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 48), KKKIYVK1DVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 49),
 KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 50), KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID No 51),
 KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID No 52), KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK (SEQ ID No 53),
 KKKIYVSIDVTLQQKSHKKK (SEQ ID No 54), KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK (SEQ ID No 55),
 20 KKKIYVSIDVTLQQLESKKK (SEQ ID No 56), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No 57),
 KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID No 58), KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID No 59), KKKYVSIDVTLQQKEKKK
 (SEQ ID No 60), KKKYVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID No 61).

El péptido se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítosos y tienen una solubilidad mejorada:

20 KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 22), KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24),
 KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 31), KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 32), KKGIVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No. 33), KKGIVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KKGIVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No. 35),
 KKGIVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No. 40), KKGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 42),
 25 KKGTYVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No. 45), KKKTYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46),
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKIYVK1DVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 49),
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID No. 58), KKKYVSIDVTLQQKEKKK
 (SEQ ID No. 60), KKKYVSIDVTLQKKEKKK (SEQ ID No. 61).

El péptido se puede seleccionar a partir del siguiente grupo, donde todos se han identificado como apítosos y tienen la mejor solubilidad: KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24), KKGIVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 32),
 30 KKGIVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 33), KKGIVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KKGIVSIDVTLQKKEGKK
 (SEQ ID No. 35), KKGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 42), KKGTYVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No. 45),
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48),
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

Los siguientes péptidos son de especial interés: KKGIVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 32),
 35 KKGIVSIDVTLQKKEGKK (SEQ ID No. 34), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46),
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57),
 KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

TOLERANCIA

40 Los epítosos de los linfocitos T desempeñan una función central en la respuesta inmunitaria adaptativa a cualquier
 antígeno, ya sea propio o exógeno. Se ha demostrado la función central desempeñada por los epítosos de los
 linfocitos T en las enfermedades por hipersensibilidad (que incluyen la alergia, enfermedades autoinmunitarias y
 rechazo del trasplante) mediante el uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o
 alérgicas mediante la inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítosos de los linfocitos T)
 combinados con un adyuvante.

45 Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunógena respecto a antígenos concretos
 administrando epítosos peptídicos en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de antígenos peptídico
 solubles es un medio eficaz para inhibir la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE, por
 sus siglas en inglés, un modelo para la esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés)) (Metzler y Wraith (1993)
 50 *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 (objeto de revisión en Anderton y
 Wraith (1998) tal como se ha mencionado anteriormente). Esto también se ha demostrado como un medio de tratar
 una enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) tal como se ha mencionado anteriormente).

La tolerancia es la ausencia de respuesta a un antígeno. La tolerancia a los antígenos propios es un rasgo esencial
 55 del sistema inmunitario, cuando este se pierde, puede aparecer la enfermedad autoinmunitaria. El sistema
 inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad de responder a una enorme variedad de agentes infecciosos a la
 vez que evita los ataques autoinmunitarios a los antígenos propios contenidos en sus propios tejidos. Esto está
 controlado 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 antígenos propios son detectados en el timo, de manera que la
 muerte de los timocitos autorreactivos es incompleta. Por lo tanto, también existen mecanismos mediante los cuales

se puede adquirir tolerancia mediante los linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Se proporciona una revisión de los mecanismos de la tolerancia central y periférica en Anderton *et al.* (1999) (*Immunological Reviews* 169:123-137).

5 En la actualidad se cree que GD está provocada por los autoanticuerpos estimuladores de TSHR que se unen a TSHR y lo activan, y de esta manera estimulan la síntesis y secreción de la hormona tiroidea y el crecimiento del tiroides. Los péptidos de la presente invención son capaces de inducir la tolerancia a TSHR, de manera que cuando se administran a un sujeto pueden restaurar la tolerancia a la proteína TSHR propia y detener la respuesta inmunitaria patogénica.

10 La tolerancia puede ser el resultado de la inducción de la anergia en al menos una porción de los linfocitos T CD4+ o estar caracterizada por ella. Con el fin de activar un linfocito T, se debe asociar un péptido con una APC «profesional» capaz de suministrar dos señales a los linfocitos T. La primera señal (señal 1) es suministrada por el complejo MHC-péptido en la superficie celular de la APC y es recibida por el linfocito T mediante el TCR. La segunda señal (señal 2) es suministrada por moléculas coestimuladoras sobre la superficie de la APC, tales como CD80 y CD86, y recibidas por CD28 en la superficie del linfocito T. Se cree que cuando un linfocito T recibe la señal 1 en ausencia de la señal 2, no se activa y, de hecho, se vuelve anérgico. Los linfocitos T anérgicos son resistentes a una exposición antigénica posterior y pueden ser capaces de suprimir otras respuestas inmunitarias. Se cree que los linfocitos T anérgicos están implicados en la mediación de la tolerancia de los linfocitos T.

20 Los péptidos que requieren procesamiento antes de que se puedan presentar junto con moléculas de MHC no inducen la tolerancia debido a que deben ser manipulados por células presentadoras de antígenos maduras. Las células presentadoras de antígenos maduras (tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) son capaces de procesar antígenos, pero también de suministrar las señales 1 y 2 a un linfocito T, lo que conlleva la activación del linfocito T. Los apítosos, por otra parte, serán capaces de unirse a MHC de clase II en APC inmaduras. Por lo tanto, serán presentados a los linfocitos T sin coestimulación, lo que conlleva anergia y tolerancia de los linfocitos T.

25 Desde luego, los apítosos también son capaces de unirse a moléculas de MHC en la superficie celular de APC maduras. Sin embargo, el sistema inmunitario contiene una abundancia mayor de APC inmaduras que de maduras (se ha sugerido que menos de un 10% de las células dendríticas están activadas, Summers *et al.* (2001) *Am. J. Pathol.* 159: 285-295). La posición por defecto de un apítoso será, por lo tanto, de anergia/tolerancia más que de activación.

30 Se ha mostrado que, cuando se induce la tolerancia mediante la inhalación de péptidos, se reduce la capacidad de los linfocitos T CD4+ específicos del antígeno de proliferar. Asimismo, se reduce de manera regulada la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4 por parte de estas células, pero se aumenta la producción de IL-10. Se ha mostrado que la neutralización de IL-10 en ratones en un estado de tolerancia inducida por péptidos restaura completamente la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha propuesto que una población de células reguladoras persiste en el estado tolerante que produce IL-10 y media la regulación inmunitaria (Burkhart *et al.* (1999) *Int. Immunol.* 11:1625-1634).

35 La inducción de tolerancia a TSHR se puede monitorizar *in vivo* buscando una reducción en el nivel de:

- i) autoanticuerpos para TSHR;
- ii) linfocitos T CD4+ específicos para TSHR; y/o
- iii) linfocitos B capaces de secretar autoanticuerpos para TSHR

mediante técnicas conocidas en la materia.

40 Por lo tanto, la inducción de la tolerancia también se puede monitorizar mediante diversas técnicas que incluyen:

- (a) la inducción de la anergia en linfocitos T CD4+ (que se puede detectar mediante la exposición posterior a un antígeno *in vitro*);
- (b) cambios en la población de linfocitos T CD4+, que incluyen
 - 45 (i) reducción en la proliferación;
 - (ii) reducción regulada en la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4; y
 - (iii) aumento en la producción de IL-10.

El término «tolerogénico», tal como se utiliza en la presente, significa capaz de inducir tolerancia.

COMPOSICIÓN

50 La presente invención también se refiere a una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende uno o más péptidos de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención.

El péptido puede comprender una pluralidad de péptidos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis péptidos.

La composición de la presente invención puede ser para uso profiláctico o terapéutico.

5 Cuando se administra para uso profiláctico, la composición puede reducir o prevenir la generación de una respuesta inmunitaria a TSHR. El nivel de respuesta inmunitaria es inferior 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 de la respuesta inmunitaria, tal como una reducción de un 50%, 70%, 80% o un 90% de la respuesta que se hubiera 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 una respuesta inmunitaria apreciable a TSHR.

10 Cuando se administra para uso terapéutico, la composición puede suprimir una respuesta inmunitaria a TSHR que ya está en curso. El término «suprimir» indica una reducción en el nivel de una respuesta inmunitaria en curso, en comparación con el nivel antes del tratamiento con el péptido, o los niveles que se hubieran observado en el mismo momento si no se hubiera proporcionado el tratamiento.

El tratamiento con la composición de la presente invención puede provocar una reducción en el nivel de uno cualquiera o la totalidad de los siguientes:

- 15
- a. autoanticuerpos para TSHR
 - b. linfocitos T CD4+ específicos para TSHR
 - c. linfocitos B que secretan autoanticuerpos para TSHR.

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

20 El tratamiento con la composición de la presente invención puede también o como alternativa provocar anergia en linfocitos T CD4+ específicos para TSHR. Se puede detectar la anergia, por ejemplo, mediante la exposición posterior a TSHR *in vitro*.

Cuando haya dos o más apítopos, la composición farmacéutica puede estar en forma de un kit, en el cual algunos o cada uno de los apítopos se proporcionan por separado para la administración simultánea, separada o secuencial.

25 Como alternativa (o además) si la composición farmacéutica (o cualquier parte de esta) se va a administrar en múltiples dosis, cada dosis se puede empaquetar por separado.

Asimismo, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el o cada apítopo se puede mezclar con cualquier(cualesquiera) aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

FORMULACIÓN

30 Se puede preparar la composición como un inyectable, ya sea una solución o suspensión líquida; también se puede preparar una forma sólida adecuada para la solución o suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar, o encapsular los péptidos en liposomas. Los principios activos se pueden mezclar con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, el agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de estos.

35

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

40 Si la composición comprende una pluralidad de péptidos, la proporción relativa de los péptidos puede ser aproximadamente igual. Como alternativa, se pueden alterar las proporciones relativas de cada péptido, por ejemplo, para centrar la respuesta tolerogénica de un subconjunto particular de linfocitos T autorreactivos o si se observa que un péptido funciona mejor que los otros en tipos de HLA particulares.

45 Después de la formulación, la composición se puede incorporar a un recipiente estéril que a continuación se sella y almacena a temperatura baja, por ejemplo, 4 °C, o se puede liofilizar.

Convenientemente, la composición se prepara como un polvo liofilizado (secado por congelación). La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada. Los procedimientos de liofilización son muy conocidos en la técnica, remítase, por ejemplo, a <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Habitualmente se utilizan agentes espesantes antes del secado por congelación, tales como manitol, dextrano o glicina.

50

La composición se puede administrar de una manera conveniente tal como las rutas oral, intravenosa (cuando sea soluble en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o mediante supositorio o implantación (por ejemplo, utilizando moléculas de liberación lenta).

La composición se puede administrar convenientemente mediante las rutas intranasal, subcutánea o intradérmica.

El péptido y la composición de la invención se puede utilizar para tratar a un sujeto humano. El sujeto puede tener GD. El sujeto puede tener autoanticuerpos para TSHR.

- 5 El sujeto puede tener un haplotipo HLA que está asociado con una predisposición a desarrollar anticuerpos para TSHR inhibidores. El sujeto puede expresar HLA-DR3 o HLA-DR4. Los métodos para determinar el haplotipo HLA de un individuo son conocidos en la técnica.

Normalmente, un médico determinará la dosis concreta que es más adecuada para un sujeto individual y esta variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular.

- 10 En una realización preferida, se puede seguir un protocolo de «aumento escalado de la dosis», donde se proporciona al paciente una pluralidad de dosis con concentraciones ascendentes. Se ha utilizado una estrategia de este tipo, por ejemplo, para péptidos de la 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).

KITS

- 15 Convenientemente, si la composición comprende una pluralidad de péptidos, estos se pueden administrar juntos, en forma de una composición mixta o cóctel. Sin embargo, puede haber circunstancias en las cuales es preferible proporcionar los péptidos por separado en forma de un kit para la administración simultánea, separada, secuencial o combinada.

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

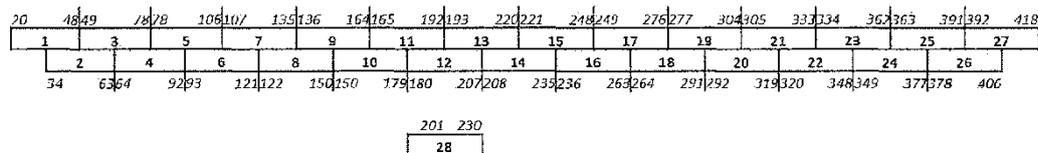
La composición farmacéutica o kit de la invención se puede utilizar para tratar y/o prevenir una enfermedad.

En particular, la composición/kit se puede utilizar para tratar y/o prevenir GD.

Ejemplos

- 25 Ejemplo 1 - Selección de péptidos HLA-DR3 TSHR

Para identificar regiones importantes del epítipo en el TSHR, se dividió el ECD del TSHR (AA20-418) en 28 péptidos solapantes de 28-30 aminoácidos (28-30-mer) que se solapaban en 15 aminoácidos, tal como se muestra a continuación.



Nombre	Longitud (AA)	Secuencia
RNB-1	29	GGMGCSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIP
RNB-2	30	EEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETH
RNB-3	30	SLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNI
RNB-4	29	LRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL
RNB-5	29	ISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHI
RNB-6	29	ESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDA
RNB-7	29	EIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFN
RNB-8	29	LKELPLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYST

ES 2 664 045 T3

Nombre	Longitud (AA)	Secuencia
RNB-9	29	TGLKMFPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM
RNB-10	30	TDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNET
RNB-11	28	TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSV
RNB-12	28	LTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL
RNB-13	28	QGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDA
RNB-14	28	NKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQ
RNB-15	28	FGGVYSGPSLLDVQSQTALPSKGLEH
RNB-16	28	TSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKL
RNB-17	28	LKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRAD
RNB-18	28	PLSLSFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKK
RNB-19	28	LSYPSHCCAFKNQKKIRGILESLMCNES
RNB-20	28	IRGILESLMCNESSMQSLRQRKSVNALN
RNB-21	29	SMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDS
RNB-22	29	SPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHN
RNB-23	29	IVGYKEKSKFQDTHNNAHYVFFEEQEDE
RNB-24	29	NAHYVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEET
RNB-25	29	IIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTCG
RNB-26	29	LQAFDSHYDYTCGDESDMVCTPKSDEFN
RNB-27	27	DSEDMVCTPKSDEFNPCEDIMGYKFLR
RNB-28	29	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPS

5 A continuación, se evaluó la inmunogenicidad de todos los péptidos inmunizando ratones transgénicos HLA-DRB1*0301 (ratones DR3) con 200 µg de una combinación de 3 péptidos emulsionados en CFA. Después de 10 días, se aislaron las células LN y los esplenocitos y se estimularon *in vitro* con 10-25 µg/mL de los péptidos individuales correspondientes. Basándose en los índices de estimulación (SI; incorporación de 3H-timidina (cuentas por minuto) de células estimuladas por péptidos divididas por la de las células no estimuladas), se observó que los péptidos RNB-5 y RNB-9 eran sumamente inmunógenos (SI>10).

La Figura 1 muestra que las LN y esplenocitos, aislados a partir de ratones inmunizados con RNB-5, respondieron de manera notable a la estimulación con RNB-5 *in vitro*.

Todos los ejemplos descritos aquí se centrarán en el péptido RNB-5.

10 Ejemplo 2 - Identificación de apítos en RNB-5

Para determinar la posición exacta del epítipo dentro de RNB-5, se sintetizó un conjunto de péptidos solapantes de 15-mer que abarcaba RNB-5 utilizando química con F-moc estándar. Cada péptido estuvo desplazado por 1 aminoácido, tal como se muestra a continuación.

ES 2 664 045 T3

Nombre	Secuencia
RNB_5A	ISRIYVSIDVTLQQL
RNB_5B	SRIYVSIDVTLQQLE
RNB_5C	RIYVSIDVTLQQLES
RNB_5D	IYVSIDVTLQQLESH
RNB_5E	YVSIDVTLQQLESHS
RNB_5F	VSIDVTLQQLESHSF
RNB_5G	SIDVTLQQLESHSFY
RNB_5H	IDVTLQQLESHSFYN
RNB_5I	DVTLQQLESHSFYNL
RNB_5J	VTLQQLESHSFYNLS
RNB_5K	TLQQLESHSFYNLSK
RNB_5L	LQQLESHSFYNLSKV
RNB_5M	QQLESHSFYNLSKVT
RNB_5N	QLESHSFYNLSKVTH
RNB_5O	LESHSFYNLSKVTHI

Nombre	Secuencia modificada
RNB_5D-GKK = RNB_5D_G0	KKGIYVSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5E-GKK	KKGYVSIDVTLQQLESHSGKK
RNB_5F-GKK	KKGVSIDVTLQQLESHSFGKK
RNB_5D_KKK = KNB_5D_K0	KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_G1	KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G2	KKGIKVSIDVTLQQLESHGKK
RNB-5D G3	KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G4	KKGIYVKIDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G5	KKGIYVSKDVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G6	KKGIYVSIVTLQQLESHGKK
RNB_5D_G7	KKGIYVSIDKTLQQLESHGKK

ES 2 664 045 T3

Nombre	Secuencia modificada
RNB_5D_G8	KKGIYVSIDVKLQQLESHGKK
RNB_5D_G9	KKGIYVSIDVTKQQLESHGKK
RNB_5D_G10	KKGIYVSIDVTLKQLESHGKK
RNB_5D_G11	KKGIYVSIDVTLQKLESHGKK
RNB_5D_G12	KKGIYVSIDVTLQQKESHGKK
RNB_5D_G13	KKGIYVSIDVTLQQLKSHGKK
RNB_5D_G14	KKGIYVSIDVTLQQLEKHGKK
RNB_5D_G15	KKGIYVSIDVTLQQLESKGKK
RNB_5D_G16	KKGYVSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G17	KKGYVSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G18	KKGYVSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G19	KKGYVSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G20	KKGYVSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_G21	KKGIYVSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G22	KKGIYVSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G23	KKGIYVSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G24	KKGIYVSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G25	KKGIYVSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_G26	KKGTYSIDVTLQQLEGKK
RNB_5D_G27	KKGTYSIDVKLQQLEGKK
RNB_5D_G28	KKGTYSIDVTLQKLEGKK
RNB_5D_G29	KKGTYSIDVTLQQKEGKK
RNB_5D_G30	KKGTYSIDVKLQKKEGKK
RNB_5D_K1	KKKKYSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K2	KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K3	KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K4	KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K5	KKKIYVSKDVTLQQLESHKKK

Nombre	Secuencia modificada
RNB_5D_K6	KKKIYVSIKVTLQQLESHKKK
RNB_5D_K7	KKKIYVSDKTLQQLESHKKK
RNB_5D_K8	KKKIYVSDVKLQQLESHKKK
RNB_5D_K9	KKEIYVSDVTKQQLESHKKK
RNB_5D_K10	KKKIYVSDVTLKQLESHKKK
RNB_5D_K11	KKKIYVSDVTLQKLESHKKK
RNB_5D_K12	KKKIYVSDVTLQQKESHKKK
RNB_5D_K13	KKKIYVSDVTLQQLKSHKKK
RNB_5D_K14	KKKIYVSDVTLQQLEKHKKK
RNB_5D_K15	KKKIYVSDVTLQQLESKKKK
RNB_5D_K16	KKKYVSDVTLQQLEKKK
RNB_5D_K17	KKKYVSDVKLQQLEKKK
RNB_5D_K18	KKKYVSDVTLQKLEKKK
RNB_5D_K19	KKKYVSDVTLQQKEKKK
RNB_5D_K20	KKKYVSDVKLQKKEKKK

En primer lugar, los péptidos se analizaron utilizando híbrdomas generados a partir de ratones DR3. Se mostró que los híbrdomas específicos para TSHR y RNB-5 reaccionaban con RNB-5 A-F presentado tanto por células VAVY frescas como fijadas. En la Figura 2 se muestra la producción de IL-2 inducida por el antígeno de clones representativos

- 5 Para determinar la capacidad de estos péptidos de 15-mer para unirse a la molécula HLA-DR, se utilizaron 2 herramientas de software: NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>) e Immune Epitope DataBase (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_ii_binding.html). Utilizando ambos métodos, se identificaron los péptidos anidados en RNB-5A hasta RNB-5F como agentes de unión fuertes tanto a las moléculas HLA-DRB1*0301 como HLA-DRB1*0401.
- 10 Aunque GD en seres humanos está fuertemente asociada con el haplotipo HLA-DRB1*0301, el haplotipo HLA-DRB1*0401 también se presenta a menudo en pacientes con GD. Ya que se había predicho que los péptidos de RNB-5A a 5F se unían a las moléculas HLA-DRB1*0401, se estudió RNB-5 para determinar su capacidad de generar una respuesta inmunitaria en ratones DR4 *in vivo*. Las células LN y los esplenocitos aislados de ratones DR4 inmunizados con RNB-5/CFA mostraron respuestas inmunitarias fuertes cuando se estimularon con péptidos
- 15 anidados en RNB-5. Además, los híbrdomas específicos para RNB-5, generados en ratones DR3, respondieron a los péptidos anidados en RNB-5 cuando fueron presentados por células BM14 (HLA-DRB1*0401). Por lo tanto, se generaron nuevos híbrdomas inmunizando ratones DR4 con TSHR/CFA. Se seleccionaron híbrdomas específicos tanto para la proteína TSHR como para el péptido RNB-5 para identificar apítomos dentro de RNB-5. Se identificaron los péptidos de RNB-5A a 5F como apítomos de nuevo (Figura 3). Se modificaron los péptidos anidados en RNB-5
- 20 DEF añadiendo aminoácidos 'GKK' tanto en el extremo C como N. Los híbrdomas específicos para TSHR y RNB-5 también reaccionan frente a estos péptidos modificados cuando son presentados por APC tanto frescas como fijadas. Tomados en conjunto, estos datos resaltan que esta región resulta de interés para pacientes con GD con cualquier haplotipo HLA-DRB1*0301 o HLA-DRB1*0401.
- 25 Se mostró que parte de los híbrdomas específicos para TSHR generados inmunizando ratones DR4 con TSHR/CFA se unen a RNB-4 en lugar de RNB-5, lo que indica la presencia de otras regiones inmunógenas dentro del TSHR. Se seleccionaron híbrdomas específicos para RNB-4 para identificar apítomos dentro de RNB-4. Se identificó el péptido

RNB-4J como un apítopo (Figura 4). Las secuencias de péptidos anidados en RNB-4 se muestran en la siguiente tabla.

Nombre	Secuencia
RNB_4A	LRTIPSHAFSNLPNI
RNB_4B	RTIPSHAFSNLPNIS
RNB_4C	TIPSHAFSNLPNISR
RNB_4D	IPSHAFSNLPNISRI
RNB_4E	PSHAFSNLPNISRIY
RNB_4F	SHAFSNLPNISRIYV
RNB_4G	HAFSNLPNISRIYVS
RNB_4H	AFSNLPNISRIYVSI
RNB_4I	FSNLPNISRIYVSID
RNB_4J	SNLPNISRIYVSIDV
RNB_4K	NLPNISRIYVSIDVT
RNB_4L	LPNISRNVSIDVTL
RNB_4M	PNISRIYVSIDVTLQ
RNB_4N	NISRIYVSIDVTLQQ

Nombre	Secuencia modificada
RNB_4J-GKK	KKGSNLPNISRIYVSIDVGKK
RNB_4K-GKK	KKGNLPNISRIYVSIDVTGKK

También se estudió el estado del apítopo de los péptidos modificados RNB-5D (Figura 20).

5 Además de los apítopos de RNB-4 y RNB-5, las herramientas de software predictivo informáticas también identificaron los péptidos de RNB-9A a 9D como agentes de unión fuertes a las moléculas HLA-DRB1*0301. Las secuencias de péptidos se muestran en la siguiente tabla.

Nombre	Secuencia
RNB_9A	TGLKMFPDLTKVYST
RNB_9B	GLKMFPDLTKVYSTD
RNB_9C	LKMFPDLTKVYSTDI
RNB_9D	KMFPDLTKVYSTDIF

Se estudió la respuesta de clones de hibridoma específicos para TSHR y RNB-5, aislados de ratones HLA-DR3 o HLA-DR4 inmunizados con TSHR/CFA, a péptidos modificados RNB-5D. Los resultados se muestran en las Figuras 11 a 15.

Ejemplo 3 - Ensayo de tolerancia *ex vivo*

Para evaluar la capacidad de los apítopos de RNB-5 para inducir tolerancia, se investigó en primer lugar la capacidad de estos apítopos para inhibir la respuesta inmunitaria en ratones sanos HLA-DRB1*0301 o HLA-DRB1*0401 *ex vivo*. Los ratones se pretrataron con diferentes apítopos de RNB-5 de acuerdo con el programa de dosis elevada o de aumento escalonado de la dosis, tal como se describe en la sección de métodos. Los estudios mostraron que el pretratamiento con los apítopos de RNB-5 reduce significativamente la proliferación de linfocitos T inducida por TSHR, tanto en ratones DR3 como DR4 (Figura 6A-D). Se modificaron los péptidos anidados en RNB-5 DEF añadiendo aminoácidos 'GKK' tanto en el extremo C como N. El pretratamiento con estos apítopos modificados también redujo significativamente la proliferación de linfocitos T inducida por TSHR (Figura 6E-F).

- 5
- 10 Se predijo que los péptidos RNB-9A a 9D se unirían fuertemente a las moléculas HLA-DRB1*0301 y también se investigó su capacidad para inducir tolerancia inmunitaria específica. Se pretrataron ratones DR3 con RNB-9A a 9D de acuerdo con el programa de aumento escalonado de la dosis. El pretratamiento con RNB-9B a 9C provocó una reducción significativa en la proliferación de linfocitos T inducida por TSHR tanto en células LN como esplenocíticas (Figura 7).
- 15 El péptido RNB 4K-GKK también mostró que reducía significativamente la proliferación de linfocitos T inducida por TSHR en ratones DR4 (Figura 16).

Los péptidos RNB-5D modificados también redujeron significativamente la proliferación de linfocitos T inducida por TSHR. Los experimentos representativos con RNB5D-K1, RNB5D-K3 y RNB5D-K16 se muestran en la Figura 19.

Ejemplo 4 - Modelo en animales para GD

- 20 Para investigar la capacidad de los apítopos de RNB-5 para reducir los síntomas de tipo GD en ratones, se desarrollaron dos modelos diferentes de GD en animales.

En primer lugar, se inmunizaron ratones C57/B16 con TSHR/CFA para inducir la producción de anticuerpos anti-TSHR. Para investigar si una inmunización de refuerzo incrementaría aún más los niveles de anticuerpos anti-TSHR, un grupo de ratones recibió una segunda inmunización 4 semanas después con TSHR/IFA. Los niveles de anticuerpos anti-TSHR en el suero de ratones inmunizados una vez alcanza el nivel máximo estable 2 semanas después de la inmunización. Una segunda inmunización provoca un fuerte aumento de los niveles de anticuerpos anti-TSHR (Figura 8).

- 25
- 30 En segundo lugar, se inyectaron a los ratones Balb/c partículas víricas LacZ-Ad o TSHR-Ad para inducir hipertiroidismo, provocado por la acción de los anticuerpos anti-TSHR en el tiroides. Se midieron los niveles de hormonas T4 y títulos de anticuerpos anti-TSHR e IgG totales en el suero de todos los ratones antes, 4 semanas después y 10 semanas después de la primera inyección de vectores adenovíricos (Figura 9). La inmunización de los ratones con 10^{10} partículas víricas TSHR-Ad indujo hipertiroidismo en 3/7 ratones y 1/7 ratones cuando se midió, respectivamente, 4 semanas y 10 semanas después de la primera inmunización. Esto indica que los niveles de T4 en 2 ratones estuvieron normalizados durante el experimento. La inmunización de los ratones con 10^{11} partículas víricas TSHR-Ad indujo hipertiroidismo en 1/6 ratones tanto 4 semanas como 10 semanas después de la primera inmunización. Aquí, un ratón en estado hipertiroides a las 4 semanas tuvo niveles normales de T4 a las 10 semanas, mientras que los niveles de T4 de otro ratón se incrementaron fuertemente entre las 4 y 10 semanas. Los niveles de anticuerpos anti-TSHR se midieron como valores de IgG totales, sin determinar su efecto estimulador o bloqueante en el TSHR (Figura 10). La inmunización de ratones con partículas víricas TSHR-Ad indujo claramente la producción de anticuerpos anti-TSHR. Los ratones inmunizados con 10^{10} o 10^{11} partículas víricas TSHR-Ad produjeron significativamente más anticuerpos que los ratones inmunizados con LacZ-Ad. Los niveles de anticuerpos anti-TSHR no difirieron entre los ratones inmunizados con 10^{10} TSHR-Ad y 10^{11} TSHR-Ad. No se observó correlación entre los niveles de anticuerpos anti-TSHR IgG totales y los niveles de T4.

- 35
- 40
- 45 Se utilizaron estos modelos en animales para investigar si los apítopos de RNB-5 pueden reducir los síntomas de tipo GD *in vivo*.

Ejemplo 5 - Identificación de apítopos en la región RNB12

RNB12 así como también los péptidos anidados no son inmunógenos en ratones. Por lo tanto, se identificó la región mediante la reactividad de una línea de linfocitos T generada a partir de pacientes con la enfermedad de Graves. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos a partir de una línea de linfocitos T de este tipo.

- 50 Se confirmó que RNB12 y el péptido modificado RNB12-KKK eran apítopos (Figura 18).

Materiales y métodosRatones

Los ratones transgénicos HLA-DRB1*0301 (ratones DR3) se criaron y mantuvieron en la colonia de ratones de Inmunogenética de la Clínica Mayo. Se obtuvieron ratones fundadores HLA DR3-tg de Gunter Hammerling (Centro

de Investigación sobre el Cáncer Alemán, Heidelberg, Alemania). Resumiendo, se coinyectaron un fragmento *Ndel* 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 en óvulos fertilizados de donantes (C57BL/6xDBA/2)-F1 emparejados con machos C57BL/6. Se criaron los ratones transgénicos para obtener ratones con una inactivación génica I-Ab. Se criaron ratones DR3 con un fondo C57BL/10 durante 10 generaciones. Estos ratones expresan la molécula HLA-DRB1*0301 pero no la molécula de MHC-II de ratones.

La cepa de ratones DR4 fue creada inicialmente por Lars Fugger *et al.* (*PNAS* 1994; volumen 91:6151-6155), en ella los constructos HLA-DRA*0101/ HLA-DRB1*0101 y mCD3-huCD4c/g se comicroinyectaron en embriones de emparejamientos (DBA/1xA.CA)F1 y los embriones viables se transfirieron a hembras pseudopreñadas (Balb/c x 129)F1 para llevar el desarrollo a término. La descendencia se crió más tarde para obtener el acervo genético C57BL/6 con la inactivación génica IA-b (ratones AB0) que carece de la expresión de la molécula de MHC de clase II de ratones. La única molécula de MHC de clase II expresada en estos ratones DR4 es, por lo tanto, la molécula HLA humana DR4.

Los estudios con animales fueron aprobados por el «Comité Ético para experimentos con Animales» (ECD, por sus siglas en inglés) en la Universidad de Hasselt y se llevaron a cabo con las mejores normas asistenciales en una instalación exenta de patógenos.

Péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por GL Biochem Ltd (Shangai, China) y se almacenaron en sulfóxido de dimetilo (DMSO; Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) a -80°C.

Investigación de péptidos que se unen a HLA-DRB1*0301

Servidor NetMHCII 2.2

El servidor NetMHCII 2.2 predice la unión de péptidos a HLA-DRB1*0301 utilizando redes neuronales artificiales. Los valores predictivos se dan en valores de CI50 nM. Los péptidos de unión fuerte y débil se indican en los resultados. Los péptidos con una afinidad de unión elevada tienen un valor de CI50 inferior a 50 nM, y los péptidos de unión débil tienen valores de CI50 inferiores a 500 nM. El resultado se presenta como una calificación predictiva que se calcula de la siguiente manera: $1 - \log_{10}(af)$. Dirección del sitio web: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>.

Base de datos de epítomos inmunitarios (IEDB, por sus siglas en inglés): método consenso

Para cada péptido, se generó un intervalo de percentil para cada uno de los cuatro métodos (ARB, colección combinatoria, SMM_align y Sturniolo) comparando la calificación del péptido frente a las calificaciones de cinco millones de 15-mer aleatorio seleccionados a partir de la base de datos SWISSPROT. Un intervalo de percentil con número bajo indicó afinidad elevada. A continuación, se utilizó el intervalo de percentil mediano de los cuatro métodos para generar el intervalo para el método consenso. Dirección del sitio web: http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html.

Determinación de la inmunogenicidad de los péptidos largos

Exposición inicial

Se inyectaron a ratones DR3 por vía subcutánea en la base de la cola 100 µg del antígeno en PBS (Lonza, Verviers, Bélgica) emulsionado con adyuvante de Freund completo ((CFA; BD Benelux, Erembodegem, Bélgica) que contenía 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb, BD Benelux)) (100 µL/inyección). Dependiendo del experimento, se utilizaron como antígeno péptidos RNB o proteína TSHR-289 completa. Los animales de control se inyectaron a la vez con PBS/CFA solo.

Cultivo celular

Diez días después de la inmunización, se recolectaron ganglios linfáticos de drenaje (LN) y el bazo. Las células LN y los esplenocitos se aislaron y cultivaron en medio X-vivo 15 (complementado con glutamina, penicilina y estreptomycin; Lonza) en placas de 96 pocillos de fondo plano. Para investigar la proliferación celular inducida por el antígeno, se cultivaron 0.5×10^6 células/pocillo (200 µL/pocillo) durante 72 horas con diferentes concentraciones del antígeno (0-25 µg/mL) o con 12.5 µg/mL del derivado proteico purificado (PPD; control de la exposición inicial; Statens serum institut; Copenhagen, Dinamarca).

Ensayo de proliferación y análisis de citocinas

Después de 72 horas, se recolectaron y congelaron 60 µL del sobrenadante celular. 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 se congelaron las placas. Se recolectaron las placas descongeladas y se leyeron con un contador β (Líquido para el contador de centelleo Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular. Se analizó el sobrenadante descongelado con Th1/Th2 10plex

FlowCytomix Multiplex de ratón (Bender MedSystems, Viena, Austria) para medir la producción de citocinas inducida por el antígeno.

Generación de hibridomas específicos de RNB-5

Exposición inicial y establecimiento de la línea celular

- 5 En el día 0, se inyectaron a los ratones por vía subcutánea en la base de la cola 100 µg de antígeno/CFA (RNB-5 para ratones DR3; TSHR para ratones DR4). Los ratones de control se inmunizaron con PBS/CFA. En el día 10, se recogieron los LN y los bazo y se generaron suspensiones unicelulares. Se utilizaron algunas de las células para medir la proliferación celular inducida por el antígeno, tal como se ha descrito anteriormente. Se mezclaron restos de los esplenocitos y las células LN, y se aislaron linfocitos T CD4⁺ utilizando un kit de purificación negativo (linfocitos T CD4⁺ intactos; Miltenyi, Leiden, Países Bajos). A continuación, se cultivaron los linfocitos T CD4⁺ junto con el antígeno (25 µg/mL de RNB-5 o 0.5 µg/mL de proteína TSHR-289) y esplenocitos irradiados (3000 rad) de ratones DR3 (proporción APC:linfocitos T CD4⁺ 1:1; 5x10⁶ células/mL). Se cultivaron las células en medio X-vivo 15 para evitar la activación celular inducida por el suero bovino fetal (FCS). En el día 4, se añadieron 20 U/mL de IL-2 humana recombinante (R&D, Abingdon, Reino Unido) a las células. En el día 7, se recolectaron las células vivas eliminando las células muertas utilizando una separación en gradiente de densidad con Ficoll (Histopaque 1083, Sigma-Aldrich). A continuación, se reestimularon las células tal como se ha descrito anteriormente cambiando la proporción de APC: linfocitos T CD4⁺ a 2:1. En el día 9, se recolectaron las células vivas y se utilizaron algunas de ellas para la fusión. Se dejaron en cultivo el resto de los linfocitos T CD4⁺ y se añadió IL-2 en el día 10. En el día 14, se recolectaron las células vivas, se reestimularon con el antígeno en presencia de APC (proporción de APC:linfocitos T CD4⁺ de 3:1) y se utilizaron para una segunda fusión en el día 16.

Fusión

- Se mezclaron 1x10⁷ células BW5147 (Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Salisbury, UK) y 5x10⁶ de linfocitos T CD4⁺ en un tubo de 50 mL y se lavaron en medio exento de suero a 37 °C. Después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspendió con suavidad. Se añadió 1 mL de polietilenglicol (PEG; solución al 40-50%, Sigma Aldrich) a 37 °C durante 45 s, manteniendo las células en un pequeño baño de agua a 37 °C. Las células se incubaron a 37 °C durante 45 s. A continuación, se añadió 1 mL de medio exento de suero a 37 °C durante 30 s a la vez que se giraban, seguido por 2, 3, 4, 10 y 30 mL consecutivamente. El tubo se invirtió muy lentamente y se incubó a 37 °C durante 4 min. Las células se centrifugaron durante 5 min a 1300 rpm a la temperatura ambiente (TA) sin freno. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 50 mL de medio exento de suero a TA lentamente para evitar desplazar el sedimento celular. El paso de lavado se repitió con medio completo. Finalmente, se resuspendieron las células en medio completo a TA con un 10% de FCS y se colocaron con diferentes concentraciones celulares en placas de 96 pocillos de fondo plano (100 µL/pocillo). Después de 48 h, las células se cultivaron en medio 1x hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT, Sigma Aldrich) y se detectó el crecimiento celular de los hibridomas después de aproximadamente 6 días. Los clones se mantuvieron en medio HAT hasta que fueron estables, a continuación se desprendieron mediante medio de hipoxantina-timidina (HT, Sigma-Aldrich) en medio RPMI completo. Con una base regular, los clones se congelaron en medio de congelación (90% de FCS + 10% de DMSO).

Evaluación de la especificidad respecto al antígeno de los clones

- Se cultivaron las células de hibridoma con 5x10⁴ células VAVY o BM14 (línea celular humana que expresa, respectivamente, HLA-DRB1*0301 o HLA-DRB1*0401; Grupo de Trabajo de Histocompatibilidad Internacional, Seattle, EE. UU.) y antígeno (10-25 µg/mL). Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por el antígeno mediante el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

ELISA de IL-2

- Se recubrieron placas de 96 pocillos (Immunosorb 96 pocillos, Fisher Scientific, Erembodegem, Bélgica) durante toda la noche a 4 °C con Ab de captura de rata anti-IL-2 de ratón purificado (BD Biosciences, Oxford, UK), diluido 1:250 en tampón carbonato. Después de 2 lavados con PBS-0.05% de Tween, los pocillos se bloquearon con 10% de FCS/PBS durante 1 hora a TA. A continuación, los pocillos se incubaron con 50 µL de sobrenadante del cultivo celular o patrón de IL-2 (BD Biosciences, Bélgica, Erembodegem) durante 2 h a TA. Los pocillos se incubaron con 50 µL/pocillo de anticuerpo de rata anti-IL-2 de ratón con biotina (BD Biosciences) diluido 1:1000 en 10% de FCS/PBS durante 1 h a TA, a lo que siguió la incubación con 50 µL/pocillo de extravidina peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluida 1:1000 en PBS durante 30 min a TA. Para detectar la unión al anticuerpo, se añadieron 50 µL/pocillo de solución de sustrato TMB (Perbio Science, Erembodegem, Bélgica). Después de 11 min, se detuvo la reacción con color utilizando 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2 M. Se midió la densidad óptica (DO, por sus siglas en inglés) a 450 nm (630 nm ref) (Tecan Benelux, Mechelen, Bélgica).

- 55 Sistema de presentación dependiente de procesamiento de antígenos

Se estudiaron clones específicos del antígeno para determinar su reactividad frente a péptidos de 15-mer (RNB-5A a 5O), presentados mediante células fijadas o no fijadas VAVY o BM14 (=APC). Se cultivaron 5x10⁴ células a partir de

los clones individuales con 25 µg/ml de péptido y 5x10⁴ APC fijadas o frescas. Para fijar las APC, las células se incubaron con paraformaldehído al 0.5% (Merck, Darmstadt, Alemania) (pH7) durante 5 minutos a TA. La reacción de fijación se detuvo añadiendo glicina 0.4 M (Sigma-Aldrich) y lavando las células en RMPI-10% de FCS. Además, se midió la reactividad frente a la proteína TSHR-289 humana (Chesapeake-PERL, Savage, Maryland, EE. UU.) para identificar epítomos crípticos. Después de 48 h, se midió mediante ELISA la producción de IL-2 inducida por el antígeno.

Evaluación de la solubilidad del apítomo de RNB-5

Se analizó la solubilidad de los péptidos mediante Anabiotec (Zwijnaarde, Bélgica). Resumiendo, se disolvieron las muestras peptídicas con dos concentraciones diana diferentes (1 mg/mL y 4 mg/mL) añadiendo PBS pH 7.0 ± 0.1. Las soluciones peptídicas se incubaron a TA durante al menos 16 horas. Se midió la turbidez 320 y 360 nm, antes y después de la centrifugación. Se determinó la concentración peptídica utilizando la absorbancia a 280 y 205 nm y mediante HPLC-UV.

Los péptidos se disolvieron en una concentración madre de 20 mg/mL en DMSO. Se preparó una serie de diluciones de las concentraciones diana de 4, 2 y 1 mg/mL en PBS. Las soluciones peptídicas se incubaron a TA durante 16-17 horas para permitir que se formara cualquier precipitado. Se calificó la turbidez mediante observación visual y se midió la absorbancia a 205 nm, 280 nm y 320 nm utilizando un dispositivo Nanodrop. Las soluciones peptídicas se centrifugaron a 14 800 rpm durante 10 minutos y se repitieron las medidas de la absorbancia y la observación visual. Se calculó la concentración péptica utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{A_{280} \text{ (sin unidades)} \times \text{Peso molecular (Da)}}{\text{Coeficiente de extinción} (\epsilon_{280})(M_{-1}\text{cm}_{-1}) \times l \text{ (cm)}}$$

20 Inducción de la tolerancia con el tratamiento con el apítomo de RNB-5

Se inyectaron por vía subcutánea en la parte posterior del cuello a ratones DR3 péptidos RNB-5 de 15-mer (100 µg/inyección) o PBS en el día -8, -6, -4 programa de dosis elevada) (Figura 5). Como alternativa se inyectaron a los ratones 0.1 µg, 1 µg y 10 µg de los péptidos en los días -15, -13 y -11, respectivamente, y después recibieron 3 inyecciones de 100 µg del péptido en los días -8, -6 y -4 (programa de aumento escalonado de la dosis). En el día 0, se inyectaron a los ratones por vía subcutánea en la base de la cola 100 µg de antígeno/CFA (péptido RNB-5 o proteína TSHR-289). Diez días después de la inmunización, se recolectaron los LN de drenaje y los bazos. El ensayo de proliferación y la medida de citocinas se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente.

Modelos en animales para GD

Inmunización de ratones con adenovirus con la subunidad A de TSHR

30 Se adquirieron adenovirus que expresan la subunidad A de TSHR humana (residuos aminoacídicos 1-289, Ad subunidad A) y adenovirus de control (LacZ-Ad) que expresan β-galactosidasa de Viraquest (North Liberty, IA, EE. UU.). Se inyectó por vía intramuscular a ratones Balb/cJOlaHsd hembra de seis semanas de edad (Harlan Laboratories, Venray, Países Bajos) en el músculo del muslo TSHR-Ad (10¹⁰ o 10¹¹ partículas) o LacZ-Ad (10¹⁰ partículas). Todos los ratones fueron inmunizados simultáneamente utilizando el mismo lote de adenovirus. Se inyectó a los ratones en tres ocasiones con intervalos de tres semanas (día 0, 21 y 42) y se extrajo sangre antes de la primera inmunización y una semana después de la segunda inmunización. Se sacrificaron todos los ratones 4 semanas después de la tercera inyección (semana 10) para obtener sangre y las glándulas tiroideas.

Inmunización de ratones con TSHR/CFA

40 Se expusieron ratones C57/B16JOlaHsd de seis semanas de edad hembra (Harlan Laboratories) (8 ratones por grupo) por vía subcutánea en la base de la cola a 50 µg de proteína TSHR-289 emulsionada en CFA con 4 mg/mL de MTb (50 µL). Se obtuvo sangre de la cola de los ratones en los días 0 (preinmunización), 7, 21, 35, 49, 63 (Grupo A), los días 0, 14, 28, 42, 56 (Grupo B) o los días 0, 21, 28, 42, 56 (Grupo C). Los ratones del grupo C recibieron una inmunización de refuerzo en la semana 4 con 50 µg de proteína TSHR-289 emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (IFA). Diez semanas después de la primera inmunización, se sacrificaron todos los ratones y se recogió la sangre mediante punción cardíaca.

Anticuerpos para TSHR

50 Se midieron los anticuerpos anti-TSHR (clase IgG) contra la proteína TSHR-289 purificada (Chesapeake-Perl) utilizando ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos (96 pocillos mitad de área, Fisher Scientific) durante toda la noche a TA con 50 µL/pocillo de proteína TSHR-289 en PBS (0.5 µg/mL). Después de lavar con PBS-0.05% de Tween, los pocillos se bloquearon con un 1% de BSA (p/v) en PBS durante 1 h a TA y se incubaron con sueros de prueba (alícuotas duplicadas, dilución 1:50). Se utilizó el anticuerpo anti-TSHR de ratón (A9, Abcam, Cambridge, UK) como control positivo. A continuación, se detectó la unión del anticuerpo con anticuerpo caprino anti-IgG de

ES 2 664 045 T3

ratón conjugado con peroxidasa (Abcam) y la señal se desarrolló con TMB. Se midió la densidad óptica (OD) en un lector de placas a 450 nm (Tecan Benelux).

Tiroxina en suero e histología tiroidea

- 5 Se midió la tiroxina total (T4) en suero de ratón no diluido (10 µL) utilizando el kit de ELISA para tiroxina de ratón/rata CBI (Calbiotech, Spring Valley, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los valores de T4 se calcularon a partir de los patrones en el kit y se expresaron como µg/dL. Se fijaron las glándulas tiroideas en formalina tamponada neutra al 10% (pH 7.5), se procesaron para obtener secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observaron las secciones para identificar cambios patológicos (hipertrofia, hiperplasia de las células epiteliales e infiltración de linfocitos) y se calificaron (KWS Biotest, Bristol, UK).

10 Tabla 1

	Péptido	Secuencia	Solubilidad	Respuesta hibridomas	inducida	de	Apitopo
RNB-5D-GKK	G0	KKGIYVSIDVTLQQLESHGKK	+	+++			+
	G1	KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK	++	++			+
	G2	KKGIKVSIDVTLQQLESHGKK	+	+			+
	G3	KKGIYKSIDVTLQQLESHGKK	++++	+			+
	G4	KKGIYVKIDVTLQQLESHGKK	+	-			-
	G5	KKGIYVSKDVTLQQLESHGKK	ND	-			-
	G6	KKGIYVSKVTLQQLESHGKK	ND	-			-
	G7	KKGIYVSIDKTLQQLESHGKK	ND	-			-
	G8	KKGIYVSIDVKLQQLESHGKK	+	+++			+
	G9	KKGIYVSIDVTKQQLESHGKK	ND	-			-
	G10	KKGIYVSIDVTLKQLESHGKK	ND	-+			
	G11	KKGIYVS1DVTLQKLESHGKK	+	+++			+
	G12	KKGIYVSIDVTLQQKESHGKK	+	+++			+
	G13	KKGIYVSIDVTLQQLKSHGKK	+	+++			+
	G14	KKGIYVSIDVTLQQLEKHGKK	+	+++			+
	G15	KKGIYVSIDVTLQQLESKGKK	+	+++			+
	G16	KKGYVSIDVTLQQLEGKK	++	++			+
	G17	KKGYVSIDVKLQQLEGKK	++++	++			+
	G18	KKGYVSIDVTLQKLEGKK	++++	+++			+
	G19	KKGYVSIDVTLQQKEGKK	++++	++			+

ES 2 664 045 T3

	Péptido	Secuencia	Solubilidad	Respuesta inducida de	Apitopo
	G20	KKGYVSIDVKLQKKEGKK	++++	+	+
	G21	KKGIYVSIDVTLQQLEGKK	+	+++	+
	G22	KKGIYVSIDVKLQQLEGKK	+	+++	+
	G23	KKGIYVSIDVTLQKLEGKK	+	+++	+
	G24	KKGIYVSIDVTLQQKEGKK	+	+++	+
	G25	KKGIYVSIDVKLQKKEGKK	+++	++	+
	G26	KKGTYSIDVTLQQLEGKK	+	+++	+
	G27	KKGTYSIDVKLQQLEGKK	++++	++	+
	G28	KKGTYSIDVTLQKLEGKK	+	+++	+
	G29	KKGTYSIDVTLQQKEGKK	+	++	+
	G30	KKGTYSIDVKLQKKEGKK	++++	++	+
	M1	KKGRYLSIDATLQRLEPHGKK	+	-	-
RNB-5D-KKK					
	K0	KKKIYVSIDVTLQQL ESHKKK	+	+++	+
	K1	KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK	++++	++	+
	K2	KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK	+	-+	+
	K3	KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK	++++	+	+
	K4	KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK	+++	-+	+
	K5	KKKIYVSKDVTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K6	KKKIYVSIKVTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K7	KKKIYVSIDKTLQQLESHKKK	ND	-	-
	K8	KKKI Y VSIDVKLQQLESHKKK	+	+++	+
	K9	KKKIYVSIDVTKQQLESHKKK	ND	-	-
	K10	KKKIYVSIDVTLKQL ESHKKK	ND	+	+
	K11	KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK	+	+++	+

	Péptido	Secuencia	Solubilidad	Respuesta inducida de	Apitopo
	K12	KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK	+	+++	+
	K13	KKKIYVSIDVTLQQKSHKKK	+	+++	+
	K14	KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK	+	+++	+
	K15	KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK	+	+++	+
	K16	KKKYVSIDVTLQQLEKKK	++++	++	+
	K17	KKKYVSIDVKLQQLEKKK	++	++	+
	K18	KKKYVSIDVTLQKLEKKK	+	++	+
	K19	KKKYVSIDVTLQQKEKKK	++++	++	+
	K20	KKKYVSIDVKLQKKEKKK	+++	+	+

Líneas de linfocitos T de PBMC humanas (Ejemplo 5)

5 Se aislaron (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) monocitos de sangre periférica (PBMC) a partir de donantes sanos o pacientes con la enfermedad de Graves y se congelaron en alícuotas. En el día 0, las células se descongelaron y se cultivaron 106 PBMC/mL con 20 µg/mL de péptido en RPMI 1640 complementado (HEPES 10 mM, 50 U/mL de penicilina/estreptomicina y L-glutamina 4 mM (Lonza)) (Lonza) y se añadió un 5% de suero AB (Sigma Aldrich) en una placa de 6 pocillos (Greiner Bio-one) y se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂. Después de 7 días, se añadió rhIL-2 (R&D Systems) hasta una concentración final de 20 U/mL. En el día 12, se recolectaron las células, se lavaron y se pusieron de nuevo en un cultivo con una concentración de 106 + 2x106 de PBMC autólogas irradiadas recién descongeladas/mL en una placa de 6 pocillos estimulada con 5-10 µg/mL de péptido y 20 U/mL de rhIL-2. En los días 15, 18 y 21 se añadió más rhIL-2 hasta una concentración final de 20 U/mL.

10 En el día 24, las células se recolectaron, se lavaron y se cultivaron 2x104 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio One) con 105 PBMC autólogas irradiadas y líneas celulares humanas VAVY/BM14/MGAR que expresaban moléculas de MHC cl II humanas (Grupo de Trabajo de Histocompatibilidad Internacional, Seattle, EE. UU.) en RPMI complementado + un 5% de suero AB en presencia de diferentes antígenos (péptidos, proteína) con una concentración de 5-50 µg/mL. Los cultivos se incubaron durante 48 h y se añadieron 0.5 µCi/pocillo de 3H-timidina (Perkin Elmer) las 18 h finales. Después de que las placas se hubieran congelado, las células se recolectaron y se leyeron con un contador β (Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación. Antes de añadir 3H-timidina, se retiraron 60 µL/pocillo de sobrenadante del cultivo celular para el análisis de citocinas.

ELISA de IFN gamma

Se evaluaron los sobrenadantes de los cultivos de TLC para determinar el contenido de IFN gamma mediante el uso del kit Duoset para IFN-gamma humana, R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica a 450 nm (Tecan Benelux).

25 Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas de la invención descritos serán evidentes para los expertos en la técnica.

30 Aunque la invención se ha descrito con relación a realizaciones preferidas específicas, se debe entender que la invención tal como se reivindica no se debe limitar indebidamente a tales realizaciones específicas. Ciertamente, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en biología molecular, inmunología o campos relacionados estén comprendidas en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno, que se selecciona entre los siguientes:

RNB_4K: NLPNISRIYVSIDVT (SEQ ID No. 62)

RNB_4K-GKK: KKG NLPNISRIYVSIDVTGKK (SEQ ID No. 63)

RNB_9B: GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID No 18)

5 2. Un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y de ser presentado a un linfocito T sin procesamiento del antígeno, donde el péptido se selecciona a partir del siguiente grupo:

10 KGGIYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 12), KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 22),
 KKGKIVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 23), KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No 24),
 KGGIYVSIDVKLQQLESHGKK (SEQ ID No 25), KGGIYVSIDVTLQKLESHGKK (SEQ ID No 26),
 KGGIYVSIDVTLQQKESHGKK (SEQ ID No 27), KGGIYVSIDVTLQQKLSHGKK (SEQ ID No 28),
 15 KGGIYVSIDVTLQQLEKHGKK (SEQ ID No 29), KGGIYVSIDVTLQQLESKGGK (SEQ ID No 30),
 KGGYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 31), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 32), KGGYVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 35),
 KGGIYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 36), KGGIYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 37), KGGIYVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No 38), KGGIYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 39), KGGIYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 40),
 20 KGGTYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No 41), KGGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 42),
 KGGTYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No 43), KGGTYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No 44),
 KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No 45), KKKIYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 21),
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 46), KKKIKVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 47),
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 48), KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No 49),
 25 KKKIYVSIDVKLQQLESHKKK (SEQ ID No 50), KKKIYVSIDVTLKQLESHKKK (SEQ ID No 51),
 KKKIYVSIDVTLQKLESHKKK (SEQ ID No 52), KKKIYVSIDVTLQQKESHKKK (SEQ ID No 53),
 KKKIYVSIDVTLQQKLSHKKK (SEQ ID No 54), KKKIYVSIDVTLQQLEKHKKK (SEQ ID No 55),
 KKKIYVSIDVTLQQLESKKKK (SEQ ID No 56), KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No 57),
 KKKYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID No 58), KKKYVSIDVTLQKLEKKK (SEQ ID No 59), KKKYVSIDVTLQQKEKKK
 (SEQ ID No 60), KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID No. 61).

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2 donde el péptido se selecciona a partir del grupo constituido por:

30 KKGKYVSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 22), KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24),
 KGGYVSIDVTLQQLEGKK (SEQ ID No. 31), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 32), KGGYVSIDVTLQKLEGKK
 (SEQ ID No. 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 35),
 KGGIYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 40), KGGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 42),
 KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 45), KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46),
 KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48), KKKIYVKIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 49),
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVKLQQLEKKK (SEQ ID No. 58), KKKYVSIDVTLQQKEKKK
 (SEQ ID No. 60), KKKYVSIDVKLQKKEKKK (SEQ ID No. 61).

35 4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3 donde el péptido se selecciona a partir del grupo constituido por:

40 KGGIYKSIDVTLQQLESHGKK (SEQ ID No. 24), KGGYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No 32),
 KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 33), KGGYVSIDVTLQQKEGKK (SEQ ID No. 34), KGGYVSIDVKLQKKEGKK
 (SEQ ID No. 35), KGGTYVSIDVKLQQLEGKK (SEQ ID No. 42), KGGTYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 45),
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48),
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3 donde el péptido se selecciona a partir del grupo constituido por:

45 KGGYVSIDVTLQKLEGKK (SEQ ID No. 32), KGGYVSIDVKLQKKEGKK (SEQ ID No. 34),
 KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 46), KKKIYKSIDVTLQQLESHKKK (SEQ ID No. 48),
 KKKYVSIDVTLQQLEKKK (SEQ ID No. 57), KKKYVSIDVTLQQKEKKK (SEQ ID No. 60).

6. Una composición que comprende una pluralidad de péptidos, incluidos uno o más péptidos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

7. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en la supresión o prevención de la producción de autoanticuerpos para TSHR *in vivo*.

8. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Graves en un sujeto.
9. Un péptido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde el sujeto es HLA-DR3.
- 5 10. Un péptido o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde el sujeto es HLA-DR4

FIGURA 1

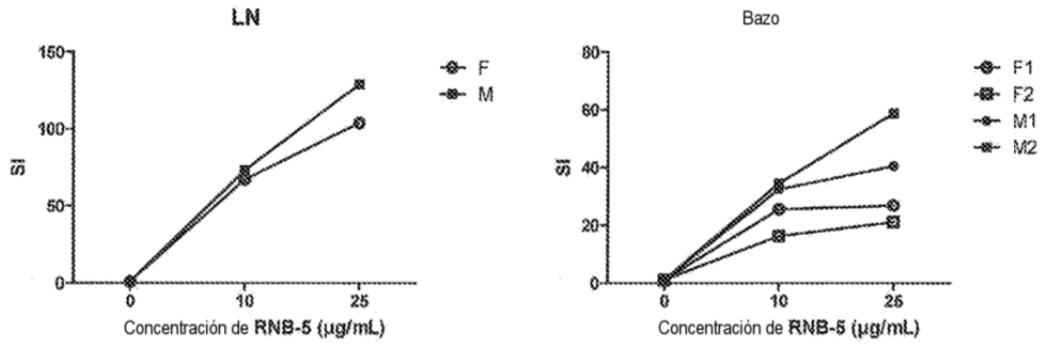


FIGURA 2

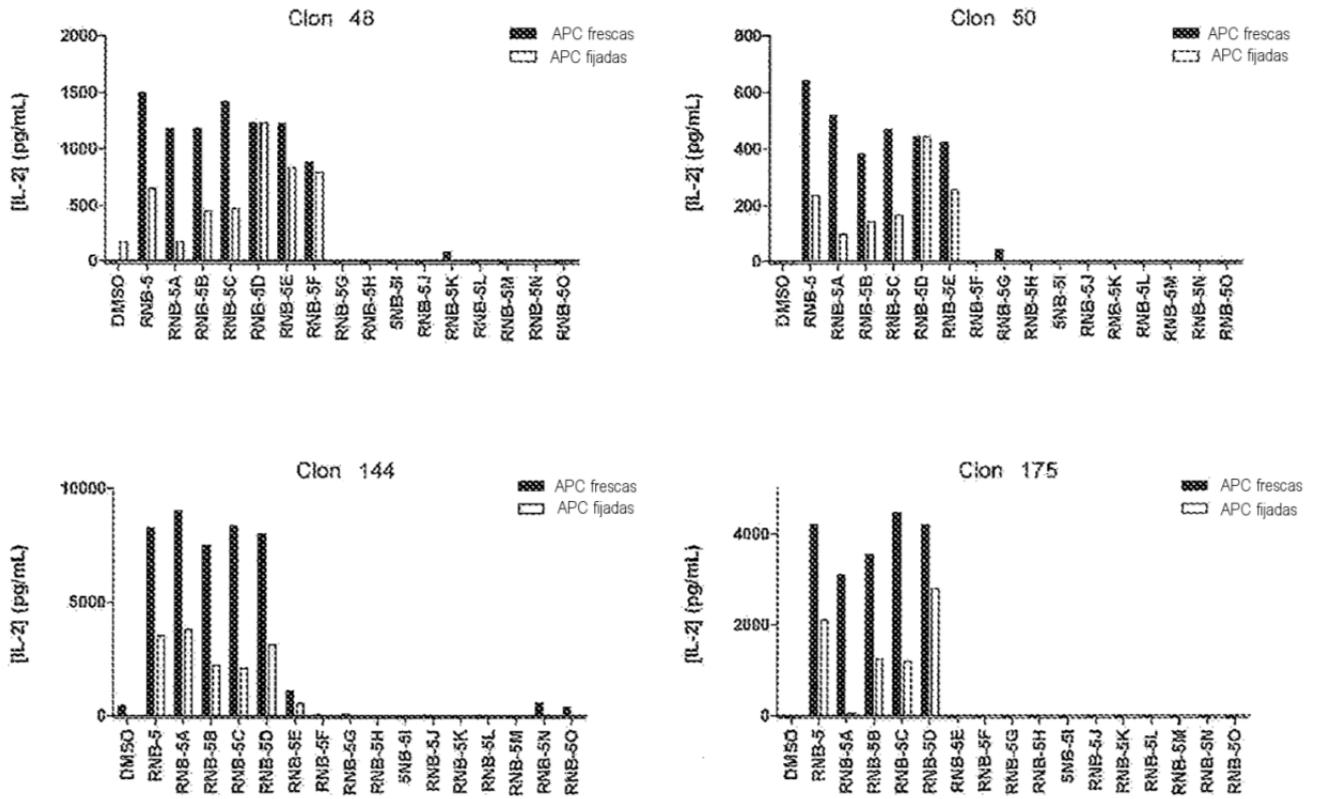


FIGURA 3

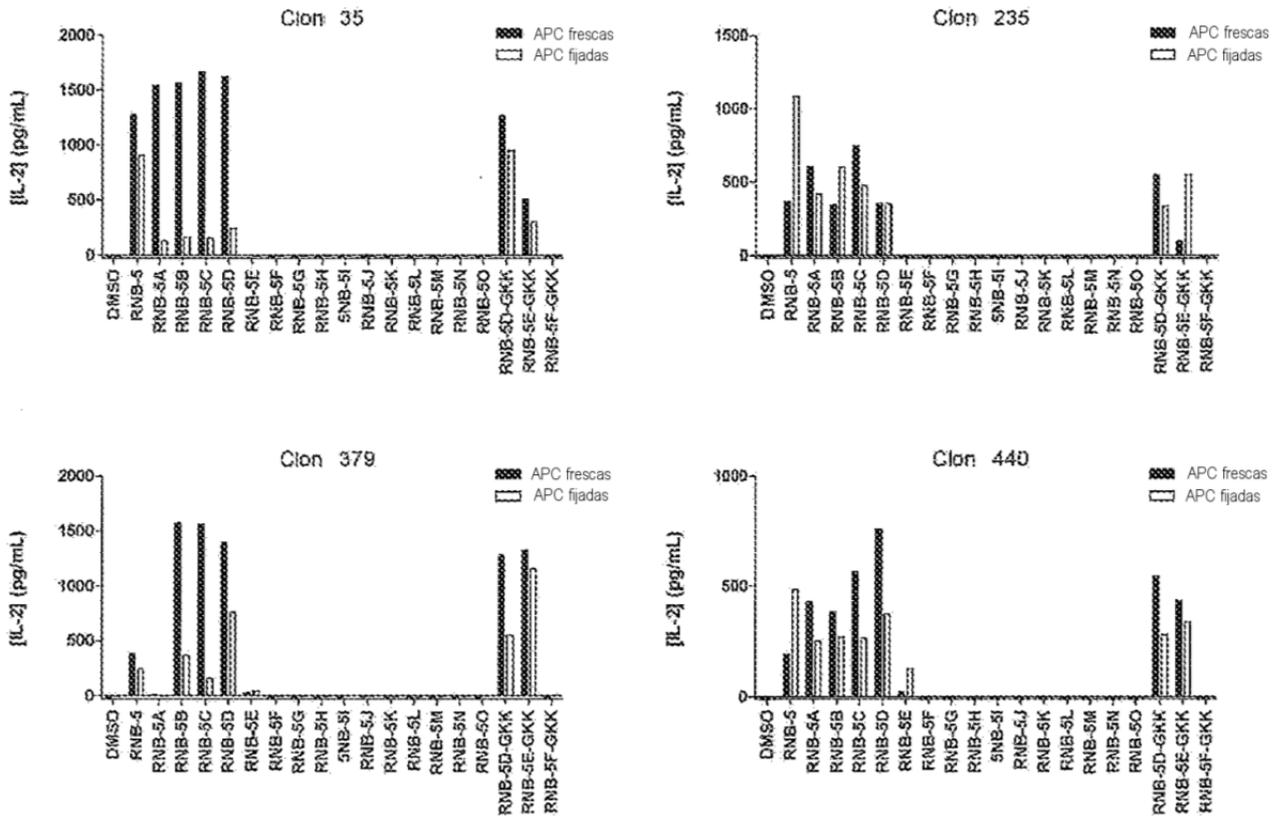
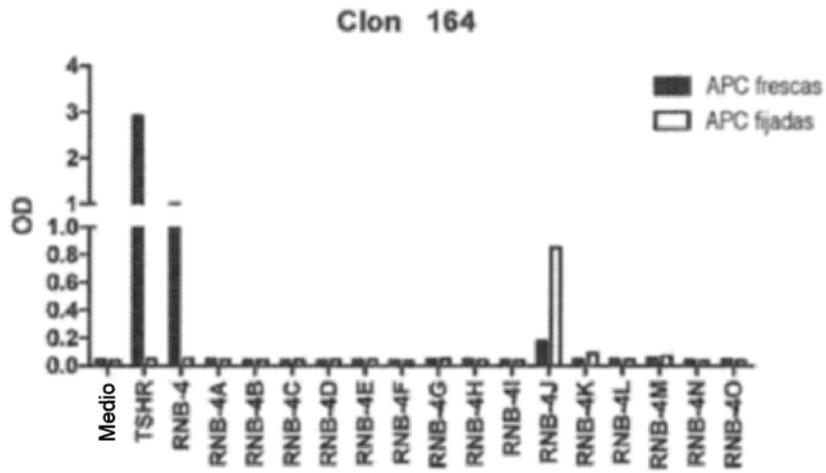


FIGURA 4

A.



B.

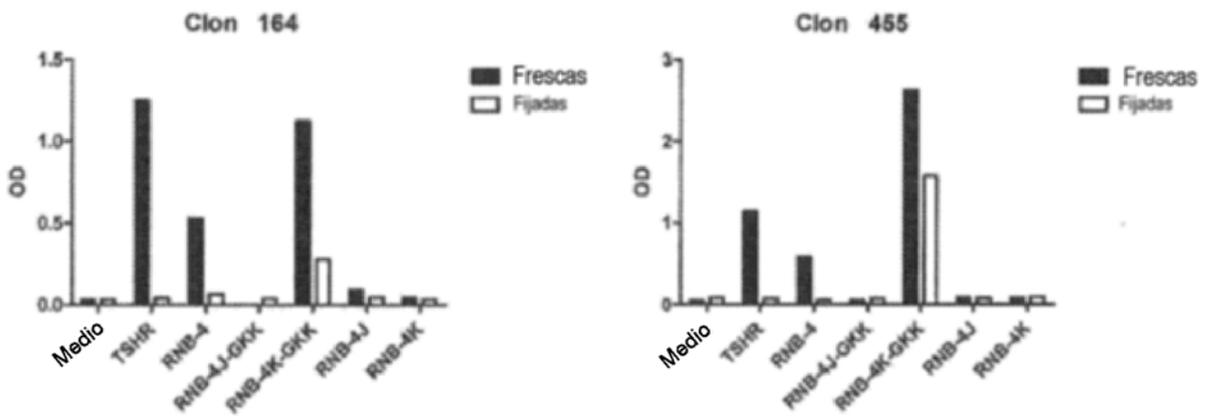


FIGURA 5

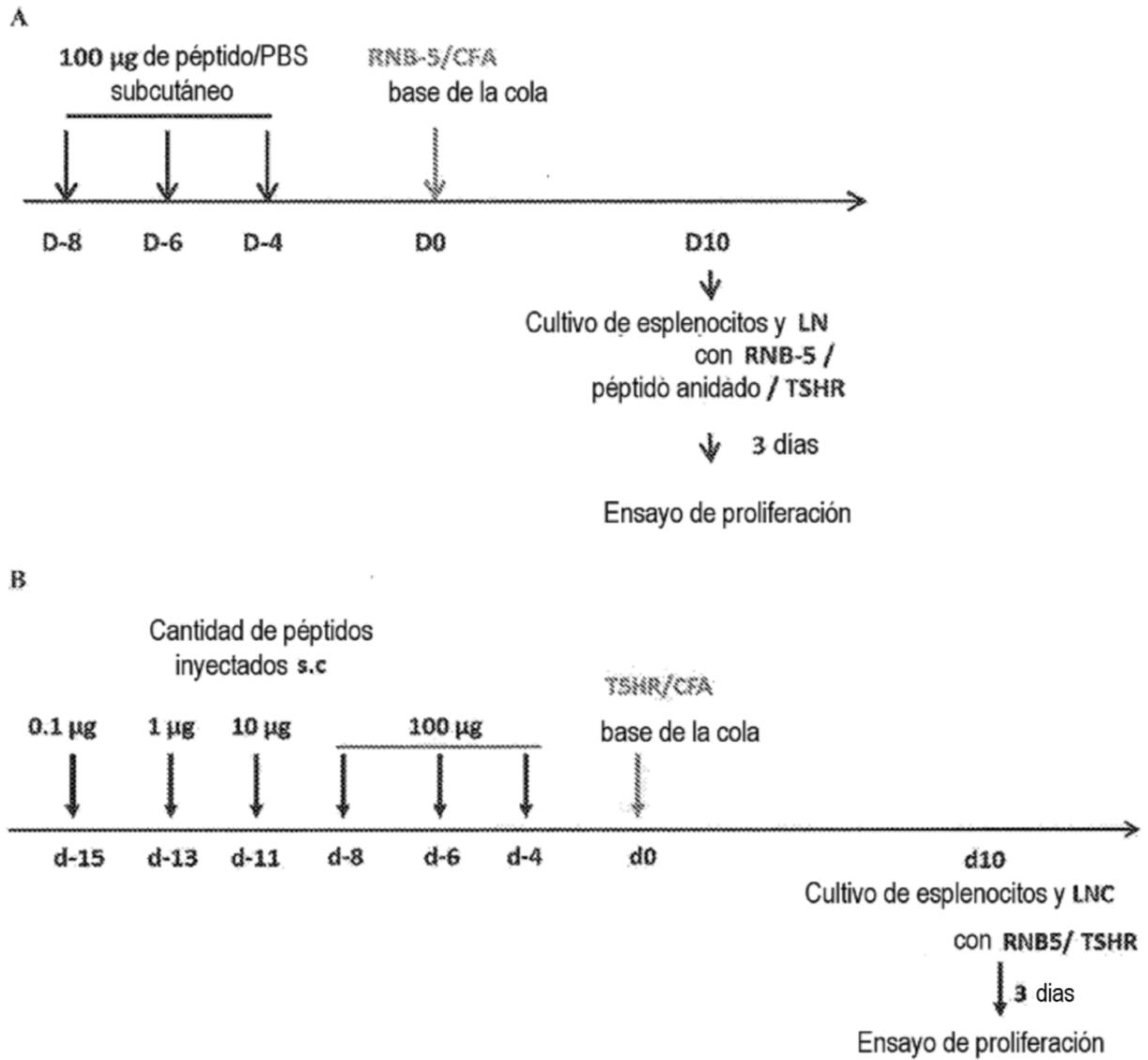


FIGURA 6

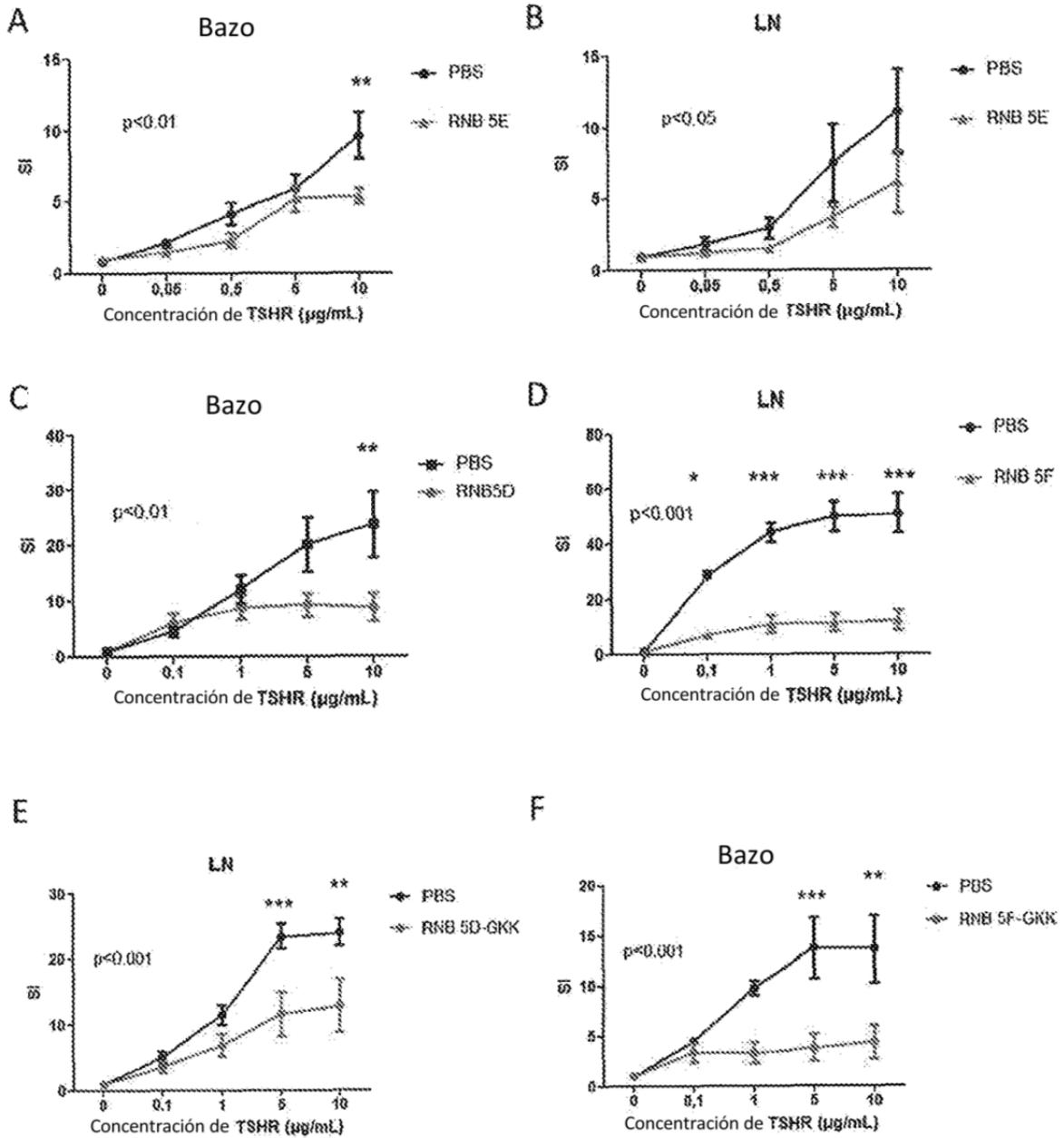


FIGURA 7

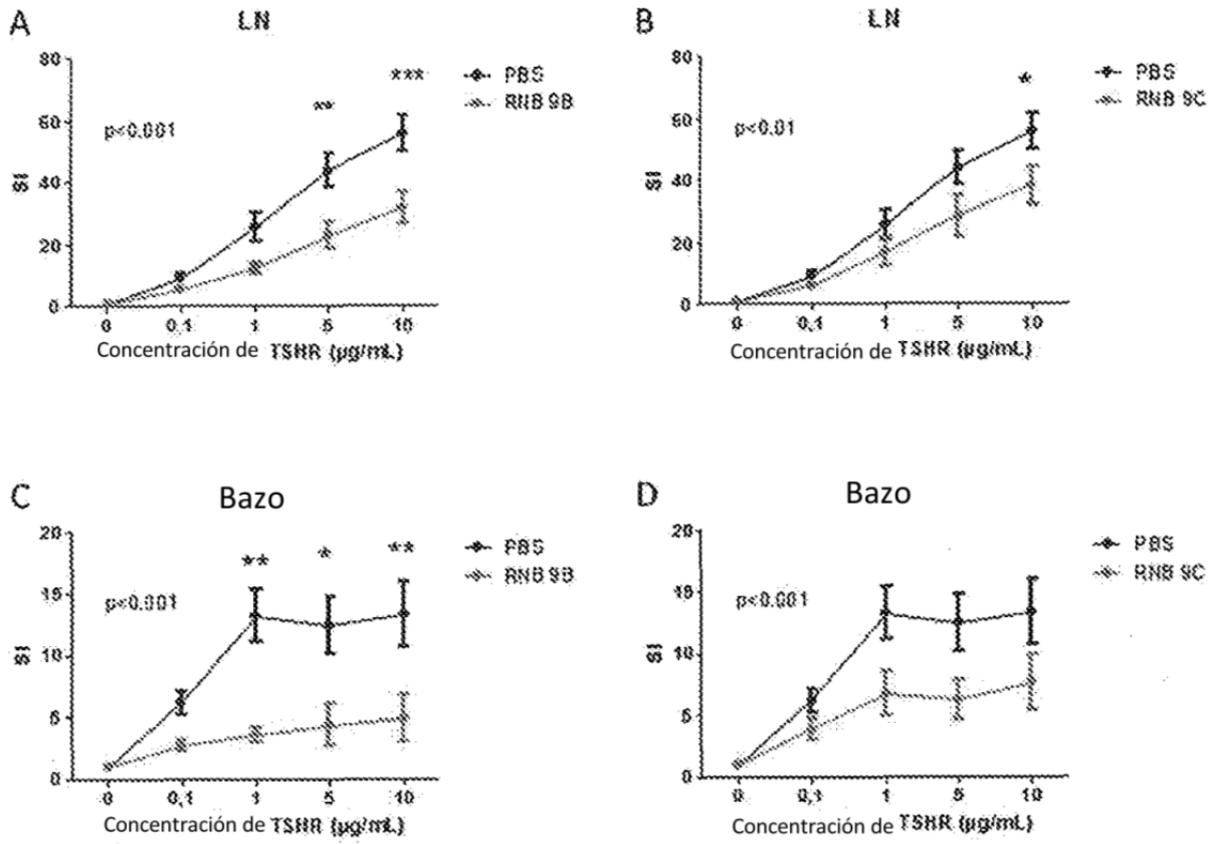


FIGURA 8

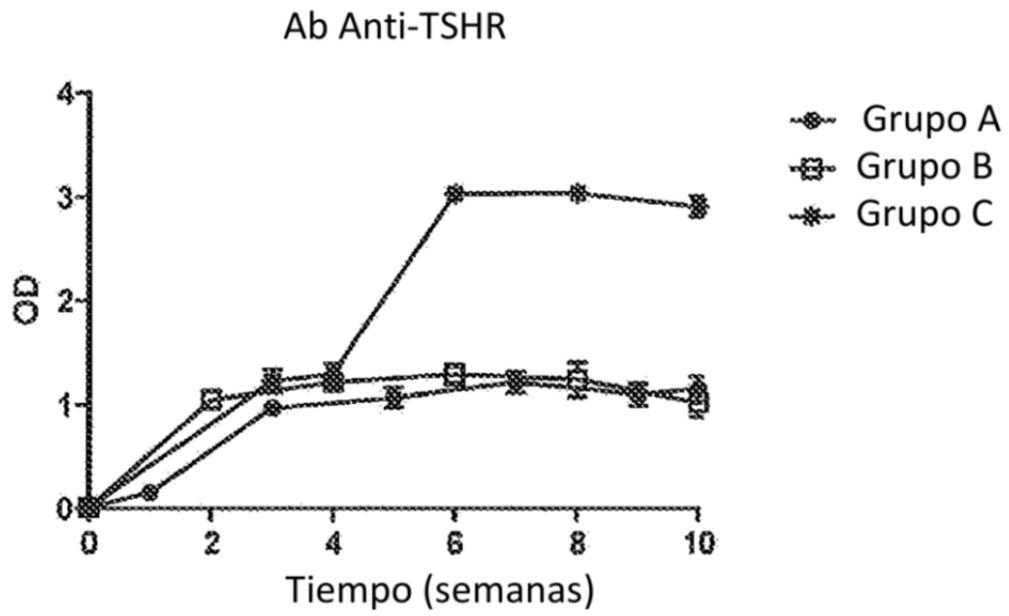


FIGURA 9

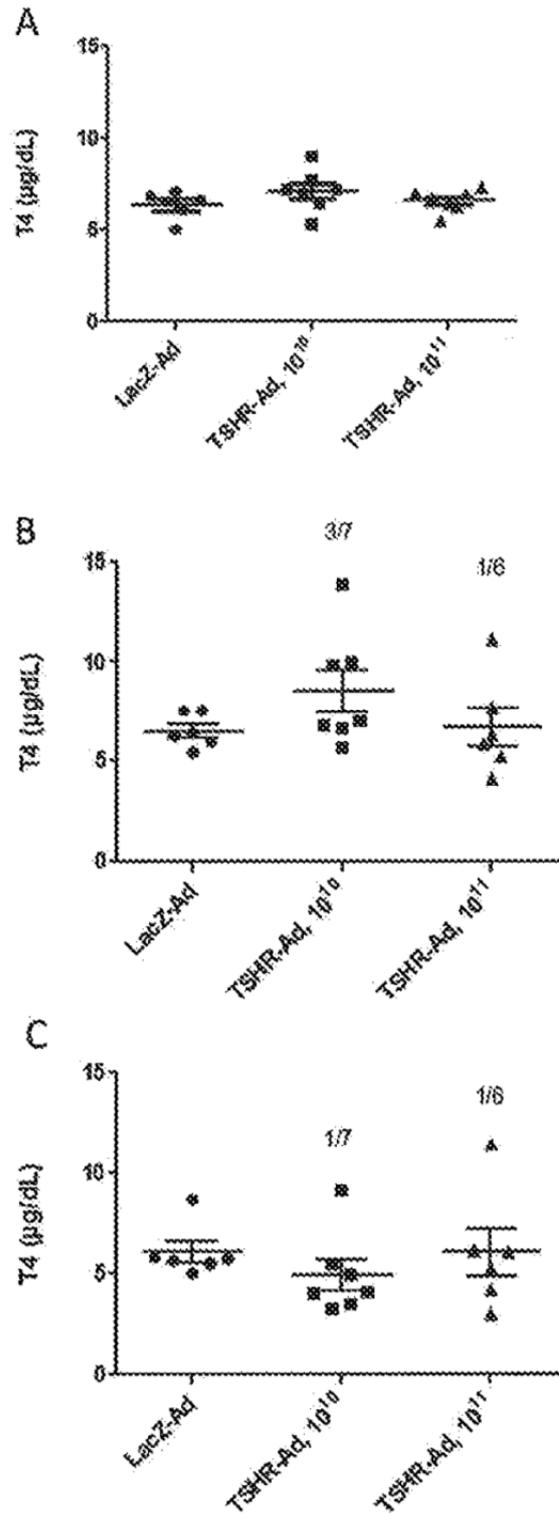


Figura 11

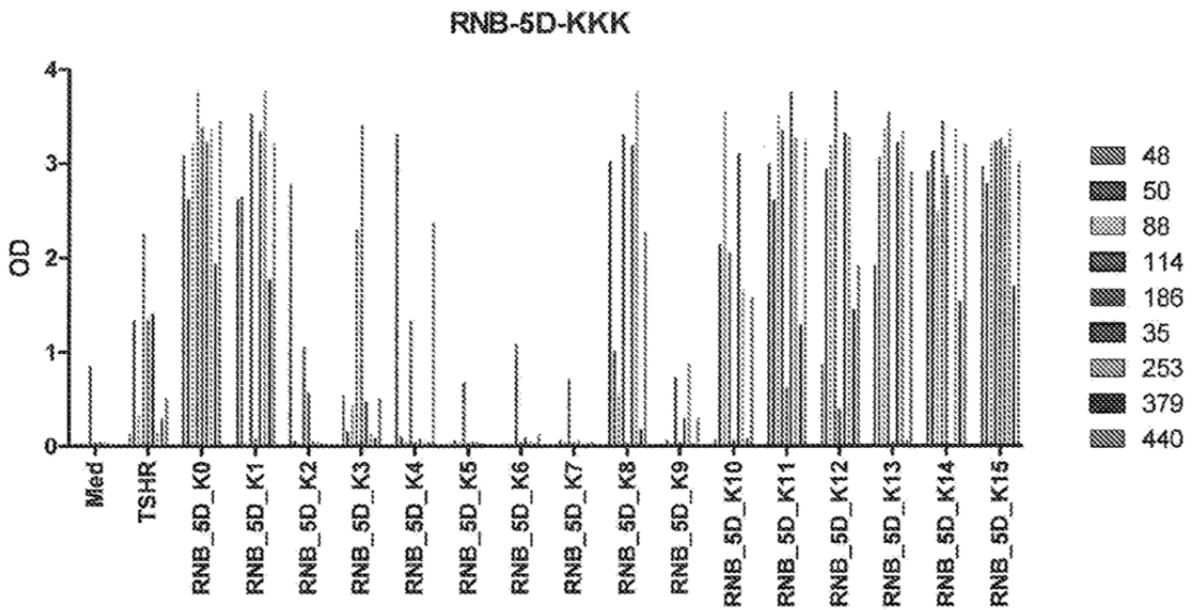
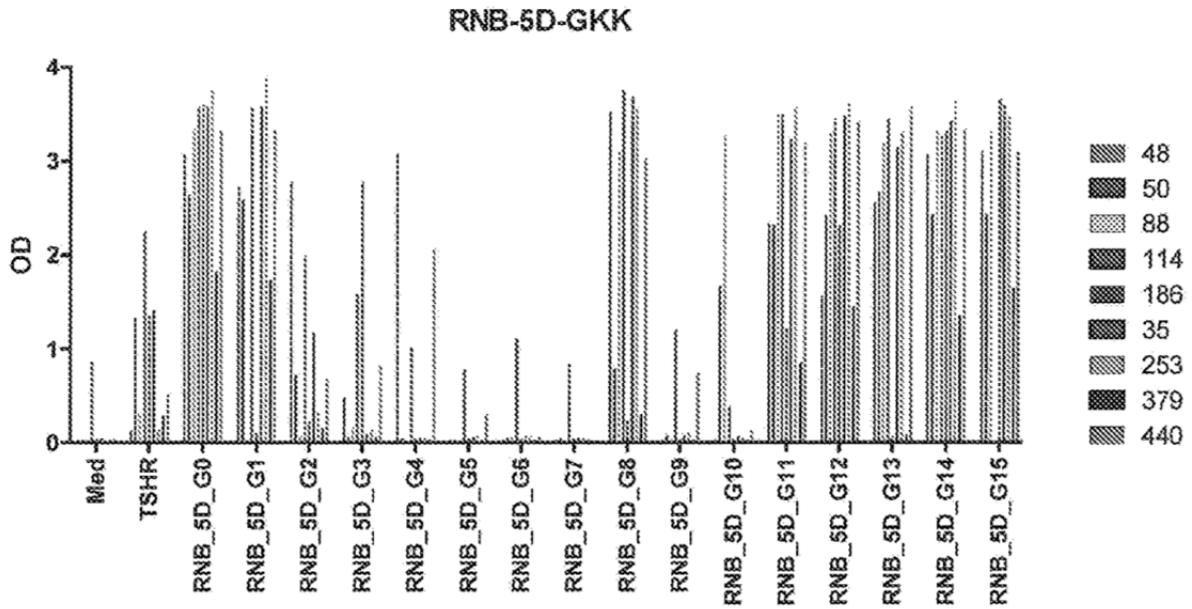


Figura 12

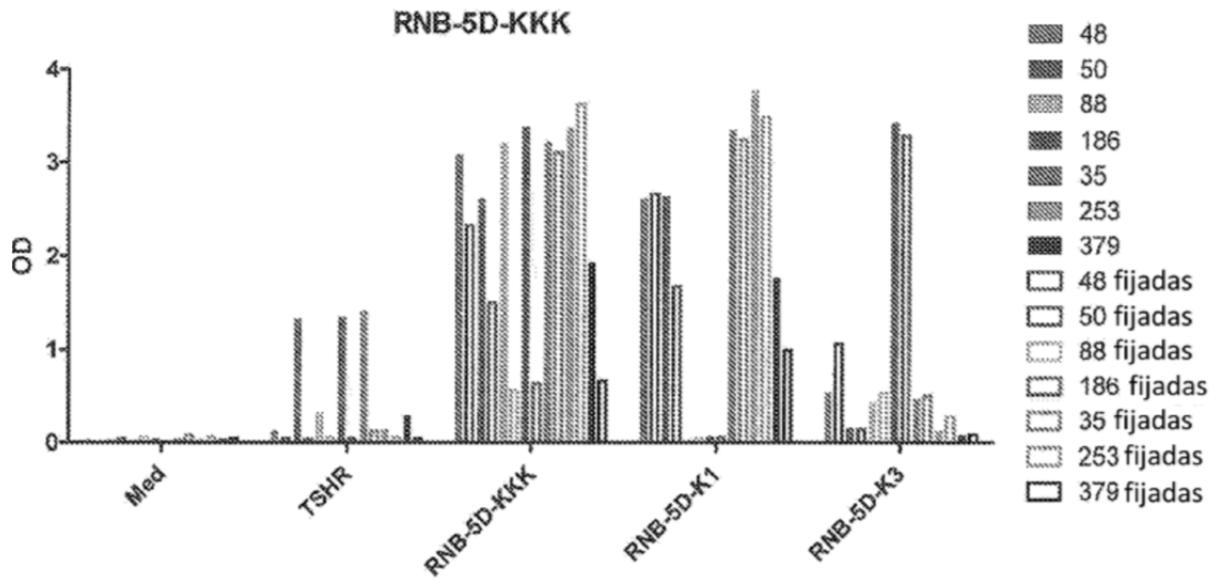


Figura 13

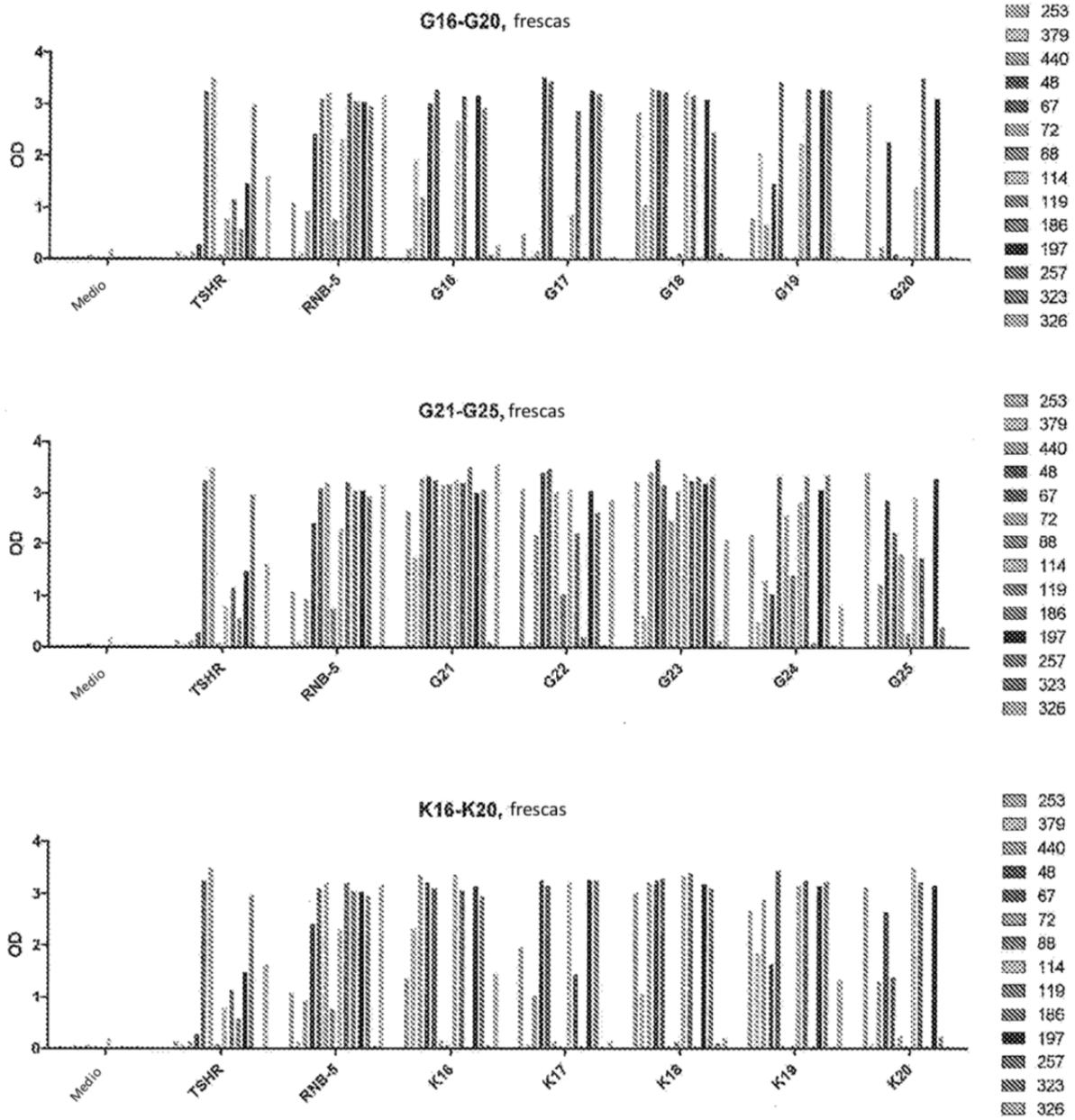


Figura 14

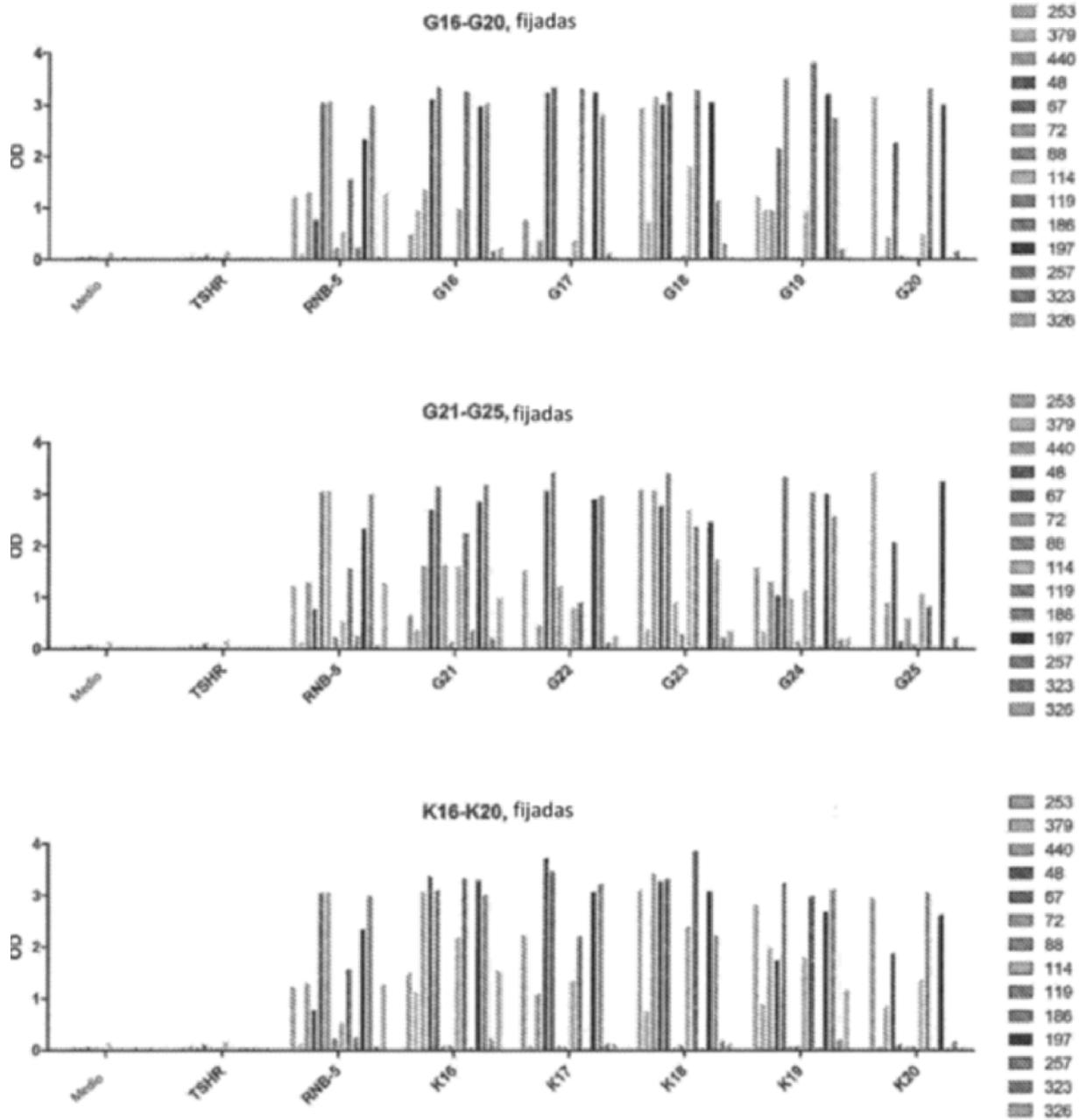


Figura 15

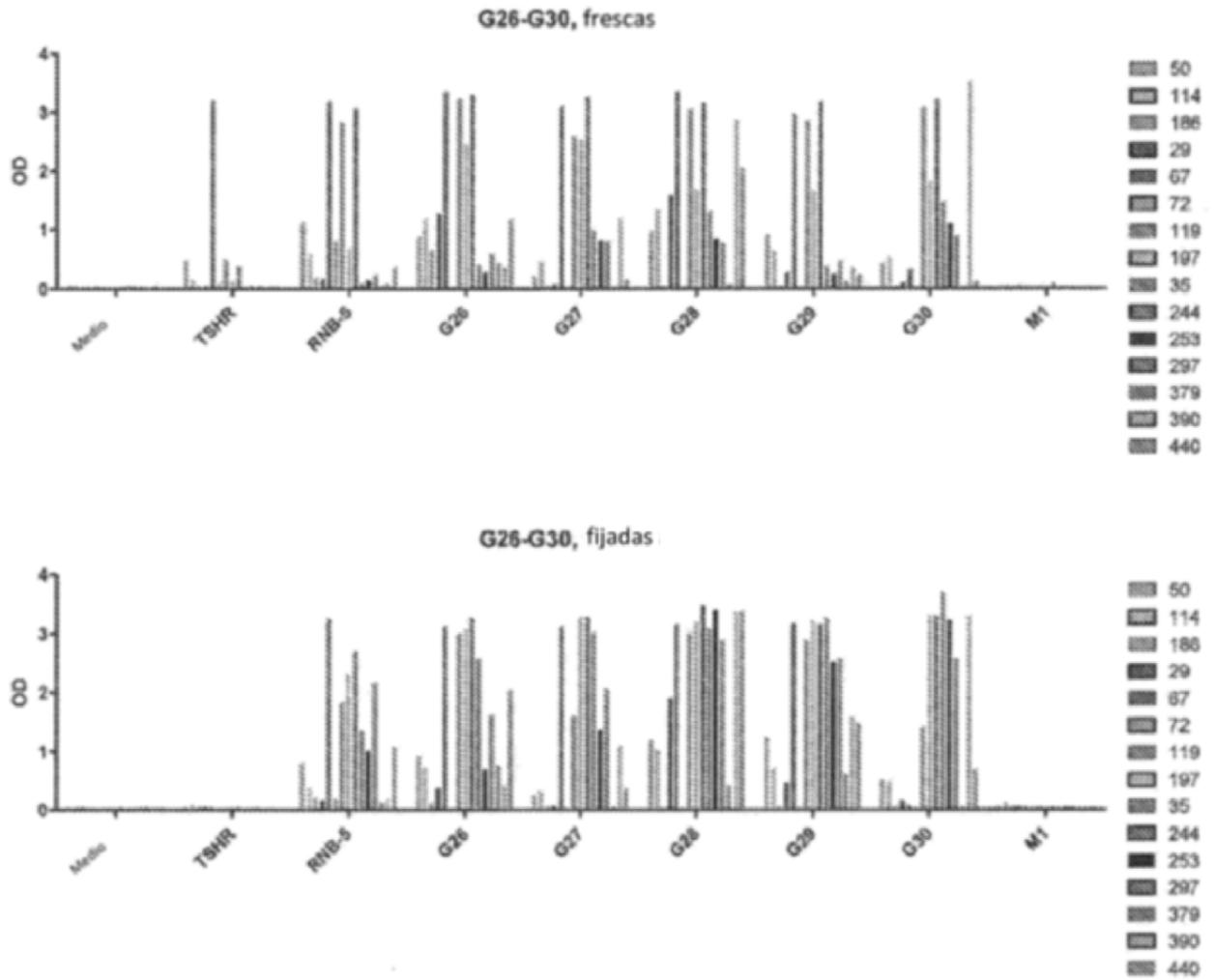


Figura 16

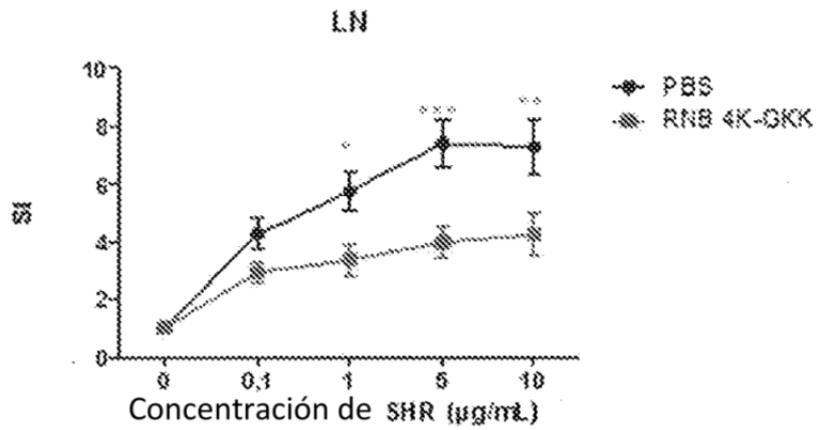


Figura 17

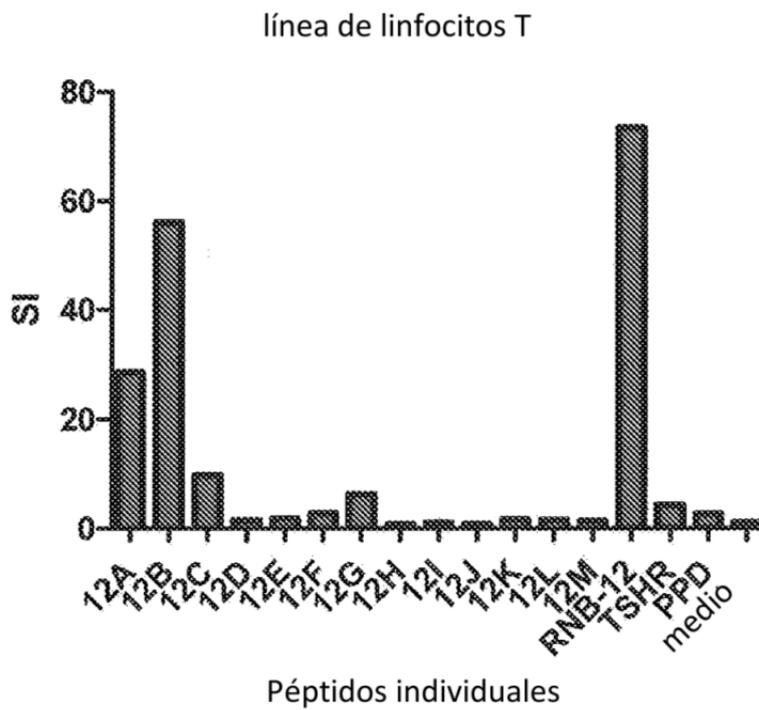


Figura 18

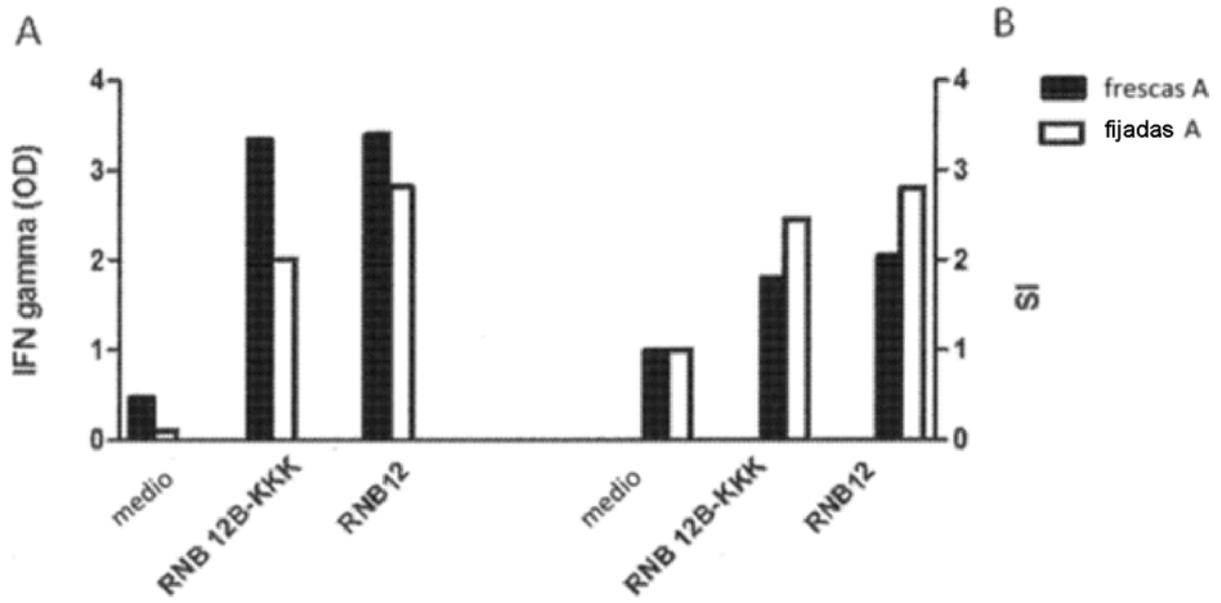


Figura 19

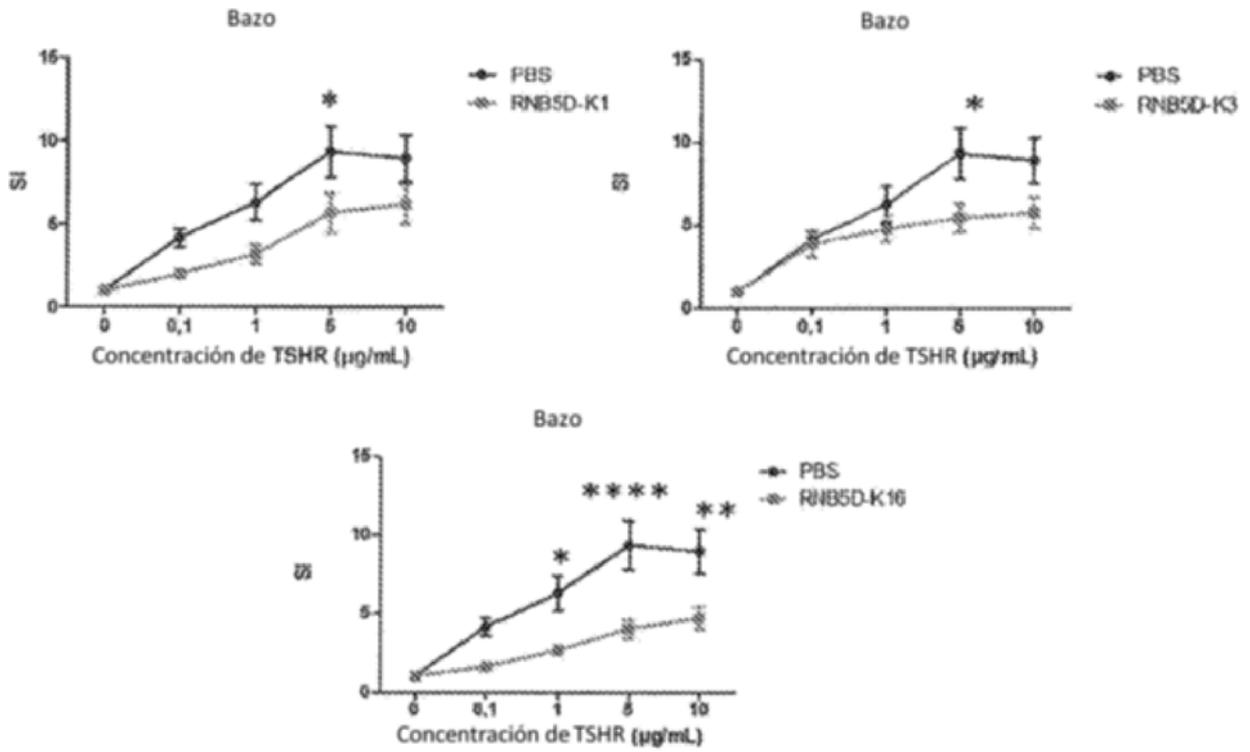


Figura 20

