

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 957**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08844568 .9**  
96 Fecha de presentación: **30.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2211892**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

54 Título: **COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA BÁSICA DE LA MIELINA Y SUS UTILIZACIONES MÉDICAS.**

30 Prioridad:  
**31.10.2007 GB 0721430**  
**18.01.2008 GB 0800962**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.12.2011**

73 Titular/es:  
**APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED**  
**UNIVERSITY GATE EAST, PARK ROW**  
**BRISTOL BS1 5UB, GB**

72 Inventor/es:  
**WRAITH, David y**  
**STREETER, Heather**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

**ES 2 370 957 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**

Composiciones que comprenden péptidos de la proteína básica de la mielina y sus utilizaciones médicas.

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende péptidos de la proteína básica de la mielina. La composición puede utilizarse para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

**Introducción**

10 **ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La esclerosis múltiple (EM) constituye la afección neurológica incapacitante más habitual que afecta a los adultos jóvenes. En el Reino Unido, aproximadamente 85.000 personas presentan EM.

15 En la esclerosis múltiple (EM), la inflamación del tejido nervioso provoca la pérdida de mielina, un material grasoso que actúa como un aislamiento protector para las fibras nerviosas en el cerebro y en la médula espinal. La pérdida de mielina, o desmielinización, deja múltiples zonas de tejido cicatricial, o esclerosis, a lo largo de las células nerviosas. En consecuencia, la esclerosis da lugar a múltiples y variados síntomas y señales, habitualmente con remisiones y recidivas repetidas.

20 Los síntomas habituales de la EM incluyen pérdida de visión, paso vacilante y desigual, pronunciación confusa, así como frecuencia e incontinencia urinarias, pudiendo provocar además la EM cambios de humor y depresión, espasmos musculares y parálisis severa.

25 Actualmente, se acepta que la EM es una enfermedad autoinmunitaria mediada por las células T autorreactivas.

Los tratamientos habituales para la EM inhiben generalmente el sistema inmunitario. Por ejemplo, un tratamiento incluye el trasplante de médula ósea junto con la administración de citostáticos y medicamentos inmunoinhibidores. Este tratamiento es efectivo para algunos pacientes, pero es caro y generalmente de alto riesgo. Adicionalmente, la administración de citostáticos se considera motivo de controversia para tratar la EM, a causa de que sus efectos son poco claros y los efectos secundarios potenciales son severos.

35 El tratamiento con interferón-beta (IFNβ), reduce los síntomas de EM en algunos pacientes y es, por tanto, muy utilizado. Sin embargo, el mecanismo de acción del interferón beta no está claro y el tratamiento con IFNβ no es efectivo para muchos pacientes. Además, el tratamiento con IFNβ se combina con el desarrollo de anticuerpos anti-IFNβ en la mayoría de los pacientes (Giovannoni, G., Munschauer, F.E., 3ª edición, y Deisenhammer, F (2002) "Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis. J. Neurol Neurosurg Psychiatry 73,465-469.

40 Habitualmente, no existe un tratamiento efectivo para la EM. El tratamiento se centra únicamente en reducir los síntomas, habitualmente mediante la inhibición general del sistema inmunitario. Existe, por lo tanto, la urgente necesidad de una terapia dirigida específicamente a las respuestas inmunitarias locales que se asocian con el comienzo y progresión de la enfermedad.

45 **PÉPTIDOS SINTÉTICOS**

Metzler y Wraith (Int. Immunol.5:1159-1165 (1993)) fueron los primeros investigadores que describieron la utilización de péptidos sintéticos para inducir la inhibición de una respuesta autoinmunitaria en el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE), un modelo de EM habitualmente utilizado *in vivo*. En este estudio, los péptidos derivados de MBP se administraron por vía intranasal, descubriéndose que el nivel de inhibición de la enfermedad correlacionaba con la fuerza antigénica del péptido utilizado.

55 Más tarde, en 1995, Liu y Wraith (Int Immunol. 7:1255-1263) mostraron que era también posible inducir la inhibición de EAE en los ratones mediante la administración intraperitoneal de péptidos solubles derivados de MBP. En este estudio, se obtuvo la inhibición de tanto las respuestas Th1 como de las Th2, y se mostró que la administración de péptidos después del comienzo de una respuesta inmunitaria podría conducir a la inhibición de la reacción inmune en marcha.

60 Sin embargo, se descubrió que no todos los péptidos que podían actuar como epítopos de las células C, podían inducir tolerancia. El péptido 89-101 de la proteína básica de la mielina (MBP) es un antígeno inmunodominante después de inmunización y es también un inmunógeno muy efectivo tanto en términos de sensibilización para la reactividad de las células T como de la inducción de EAE. Sin embargo, este péptido se ha mostrado inefectivo para inducir la tolerancia cuando se administra en solución (Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol 28:1251-1261).

65 Los presentes inventores han demostrado previamente que existe una relación entre la capacidad de un péptido para unirse a una molécula MHC de tipo I o II y de ser presentado a una célula T sin un procesamiento antigénico

posterior, y su capacidad para inducir tolerancia *in vivo*. Los péptidos que son procesadores antigénicos independientes, (es decir, no requieren un procesamiento antigénico posterior a la unión con MHC), puede predecirse que sean tolerogénicos *in vivo*. Estos péptidos se han denominado "apitopes" por *Antigen Processing Independent epiTOPES*.

El documento WO 02/16410 da a conocer los siguientes *apitopes* de la proteína básica de mielina (MBP):30-44, 80-94, 83-99, 81-95, 82-96, 83-97, 84-98, 110-124, 130-144, 131-145, 132-146 y 133-147.

El documento WO 03/064464 identifica los siguientes péptidos MBP como *apitopes*: 134-148; 135-149; 136-150; 137-151; 138-152 y 140-154.

### Sumario de la invención

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que un "cóctel" de cuatro péptidos MBP, todos los cuales son *apitopes*, es particularmente efectivo para tratar la EM. Se cree que los cuatro péptidos pueden ejercer un efecto sinérgico cuando se combinan entre sí.

En un primer aspecto, por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición que incluye los siguientes péptidos de la proteína básica de la mielina:

MBP 30-44  
MBP 83-99  
MBP 131-145; y  
MBP 140-154.

La composición puede estar formada esencialmente por MBP 30-44, 83-89, 131-145 y 140-154.

La composición puede utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad, particularmente la esclerosis múltiple.

La composición puede utilizarse para tratar o prevenir la neuritis óptica asociada con la esclerosis múltiple.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir la esclerosis múltiple, y/o la neuritis óptica asociada con la esclerosis múltiple, administrando a un individuo una composición según el primer aspecto de la invención.

En el procedimiento del segundo aspecto de la invención, la composición puede administrarse según un protocolo de aumento de la dosis.

Se ha descubierto que dos de los péptidos del "cóctel" se unen a HLA-DQ6 (MBP 30-44 y 131-145) y dos (MBP 140-154 y 83-99) se unen a HLA-DR2. La utilización conjunta de estos *apitopes* proporciona un cubrimiento más amplio de los distintos haplotipos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que se aprecian en los pacientes EM que la terapia con un solo péptido.

El procedimiento del segundo aspecto de la invención puede implicar la administración de la composición a un individuo HLA-DQ6 o HLA-DR2 positivo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un kit que incluye los péptidos proteicos de la proteína básica de la mielina siguientes:

MBP 30-44  
MBP 83-99  
MBP 131-145; y  
MBP 140-154

para una administración simultánea, por separado o secuencial.

### Introducción a las figuras

Figura 1: Presentación de MPB 30-44 por HLA-DQ6 al clon celular T EM 49:D3.

Figura 2: Presentación de MPB 130-144 por HLA-DQ6 al clon celular T EM 17:A2.

Figura 3: Presentación de MPB 139-153 por las células-L HLA-DR2a y HLA-DR2b transfectadas al clon celular T N5:19

Figura 4: Respuesta proliferativa de las células nodulares linfáticas después de la inducción de tolerancia con el

*apitope* EM6.

Figura 5: Proliferación de los esplenocitos en respuesta al *apitope* MS7. Los esplenocitos se obtuvieron de los ratones tratados mediante la administración intranasal de PBS o del *apitope* EM7 (83-99).

Figura 6: Proliferación de los esplenocitos en respuesta al *apitope* MS7. Los esplenocitos se obtuvieron de los ratones tratados mediante la administración subcutánea-intradérmica de PBS o del *apitope* EM7 (83-99).

Figura 7: Proliferación de IFN $\gamma$  e IL-2 por los esplenocitos obtenidos de los ratones tratados mediante la administración subcutánea-intradérmica de PBS o del *apitope* EM7 (83-99).

Figura 8: Ejemplo de esquema Snellens.

Figura 9: Respuestas PBMC de los pacientes a la proteína básica de la mielina humana (MBP).

Figura 10: Respuestas PBMC de los pacientes a ATX-EM-1467

Figura 11: Comparación de la respuesta proliferativa de las células T a MBP antes de (visita 1) y después de (visita 8) del tratamiento con ATX-EM-1467

### Descripción detallada

El primer aspecto de la invención se refiere a una composición que incluye diversos péptidos de la proteína básica de la mielina.

### Proteína básica de la mielina

La proteína básica de la mielina (MBP) es una proteína de 18,5 kDa que puede aislarse de la materia blanca del cerebro humano. La proteína madura posee 170 aminoácidos y la secuencia resulta muy disponible en la literatura (véase, por ejemplo, Chou *et al* (1986) J. Neurochem. 46:47-53, Figura 1; Kamholz *et al* (1986). PNAS 83:4962-4966, Figura 2; Patente US nº 5.817.629, SEC ID nº1; Roth *et al*) (1987), J. Neurosci. Res.17:321-328, Figura 4; Medeveczky *et al* (2006), FEBS Letters 580:545-552, Figura 3B)

### PÉPTIDOS MBP

El término "péptido" se utiliza en el sentido normal para significar una serie de residuos, típicamente L-aminoácidos, unidos típicamente uno al otro mediante enlaces peptídicos entre el grupo  $\alpha$ -amino y los grupos carboxilos de los aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y péptidos sintéticos análogos.

Los péptidos utilizados en la composición y el kit de la presente invención pueden prepararse utilizando procedimientos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer Verlag, Berlin). Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) Science 269:202-204), fragmentados a partir de la resina, y purificados mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución (por ejemplo, Creighton (1983), Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nueva York, NY). Puede obtenerse la síntesis automatizada, por ejemplo, utilizando el Sintetizador Peptídico ABI 431 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Los péptidos pueden prepararse alternativamente mediante procedimientos de recombinación o de fragmentación de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido puede obtenerse mediante fragmentación a partir del MBP de longitud completa. La composición de un péptido puede confirmarse mediante el análisis aminoácido o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman)

Los péptidos que se utilizan en la composición y los kits de la presente invención, son los siguientes:

#### MBP 30-44:

H-Pro-Arg-His-Arg-Asp-Thr-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Ile-Gly-Arg-Phe-NH $_2$

#### MBP 83-99:

H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-NH $_2$

#### MBP 131-145:

H-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser-Ala-His-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-NH $_2$

MBP 140-154:

H-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-Ala-Gln-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys-Ile-Phe-NH<sub>2</sub>

5 Los términos "MBP 30-44", "MBP 83-99", "MBP 131-145" y "MBP 140-154" comprenden péptidos modificados. Por ejemplo, los péptidos pueden estar mutados, mediante inserción, delección o sustitución de aminoácidos, siempre que la especificidad de unión MHC del péptido no modificado se conserve, junto con su capacidad para ser presentado a una célula T. El péptido puede, por ejemplo, tener 5, 4, 3, 2, o 1 ó 0 mutaciones de la secuencia no modificada.

10 Alternativamente (o además), pueden realizarse modificaciones sin cambiar la secuencia aminoácida del péptido. Por ejemplo, pueden incluirse los D-aminoácidos u otros aminoácidos no naturales, el enlace normal amídico puede reemplazarse por enlaces de estructura éster o alquilo, sustituyentes N- o C-alquilo, modificaciones de la cadena lateral, pudiéndose incluir restricciones tales como puentes disulfuro o uniones éster o de cadenas laterales amídicas. Dichos cambios pueden conducir a una mayor estabilidad *in vivo* del péptido, y a una duración más larga de su vida.

15 La modificación de los epítomos puede llevarse a cabo en predicciones para una inducción más eficiente de las células T, obtenidas utilizando el programa "Peptide Binding Predictions", concebido por K. Parker (NIH), que puede encontrarse en [http://www-bi-mas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://www-bi-mas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (véase también Parker. K.C *et al*, 1994. J. Immunol. 152:163).

20 Los péptidos MBP pueden formularse en la composición en forma de sales o en forma neutra. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales ácidas de adición (formadas con grupos amino libres del péptido) y que están formadas con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, o ácidos fosfóricos, o ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilos libres pueden obtenerse a partir asimismo de las bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sódica, potásica, amónica cálcica, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaina.

25  
30 COMPOSICIÓN

La composición de la presente invención puede ser para utilización terapéutica o profiláctica.

35 La composición puede prepararse como un inyectable, ya como solución líquida o como suspensión; también puede prepararse una forma sólida apropiada para la solución en, o la suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación puede asimismo emulsificarse, o encapsularse los péptidos en liposomas. Los principios activos pueden mezclarse con los excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con ellos. Los excipientes apropiados, son, por ejemplo, agua, soluciones salinas, (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol, o similares y sus combinaciones.

40 Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, y/o agentes tampones de pH. Las sales tampón incluyen fosfato, citrato, acetato. El ácido clorhídrico y el hidróxido sódico pueden utilizarse para el ajuste del pH. Para la estabilización, pueden utilizarse disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

45 En la composición, la proporción relativa de los péptidos (MBP 30-44; MBP 83-99, MBP 131-145; MBP 140-154) puede ser de aproximadamente 1:1:1:1. Alternativamente, las proporciones relativas de cada péptido pueden alterarse, por ejemplo, para centrar la respuesta tolerogénica en un subconjunto particular de las células T autorreactivas, o si se encuentra que un péptido ejerce mejor su función mejor que los otros, en particular los tipos HLA.

50 Después de la formulación, la composición puede incorporarse a un recipiente estéril que es entonces precintado y almacenado a baja temperatura, por ejemplo 4°C, o puede ser liofilizado.

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

60 La composición puede administrarse de una forma conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (si es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o rectal, o utilizando un "implante" (por ejemplo, utilizando moléculas de liberación lenta).

65 La composición puede administrarse ventajosamente vía intranasal, subcutánea o intradérmica.

El procedimiento y la composición farmacéutica de la invención pueden utilizarse para tratar a un individuo humano. Típicamente, un médico determinará la dosis real más apropiada para un individuo, que variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular.

- 5 En una forma de realización preferida, puede seguirse un protocolo de "aumento de dosis", si se administran al paciente diversas dosis en concentraciones ascendentes. Tal enfoque se ha utilizado, por ejemplo, para los péptidos fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia del veneno de las abejas (Muller *et al*, (1998), J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754, y Akdis *et al* (1998), J. Clin. Invest. 102:98-106.

## 10 KITS

Convenientemente, los cuatro péptidos MBP pueden administrarse juntos, en forma de una composición mezclada o cóctel. Sin embargo, puede resultar preferido circunstancialmente proporcionar los péptidos de forma separada, en forma de un kit, para la administración simultánea, separada, secuencial o combinada.

- 15 Por ejemplo, el kit puede incluir los cuatro péptidos en recipientes separados, o de dos recipientes, comprendiendo cada uno dos péptidos. El contenido de los recipientes puede, o no, combinarse antes de la administración.

- 20 El kit puede incluir asimismo unos medios de mezcla y/o de administración (por ejemplo, un vaporizador para la administración intranasal, o una jeringuilla y aguja para la dosificación subcutánea/intradérmica. El kit puede incluir también las instrucciones para su utilización.

La composición farmacéutica del kit de la invención puede utilizarse para tratar y/o prevenir una patología.

- 25 En particular, la composición/kit puede utilizarse para tratar y/o prevenir la esclerosis múltiple y/o la neuritis óptica.

## ESCLEROSIS MÚLTIPLE

- 30 La esclerosis múltiple (EM) es la alteración neurológica más habitual entre los adultos jóvenes (de 20 a 40 años), que afecta a aproximadamente 385.000 personas en Europa y a 300.000 en USA. Es una enfermedad degenerativa crónica del sistema nervioso central, en la que tiene lugar una destrucción gradual de la mielina en lugares a través del cerebro y/o de la médula espinal, interfiriendo con la conectividad neural y provocando debilidad muscular, pérdida de coordinación y alteraciones visuales y del habla.

- 35 Después de 10 años, la mitad aproximadamente de los individuos que se diagnosticaron inicialmente de esclerosis múltiple con recidivas-remisiones EM (RREM) descubrieron que la frecuencia de recidivas disminuye, pero que aumenta la incapacidad. Esto se conoce como MS secundaria progresiva (SPEM). Algunos estiman que dentro de 25 años, aproximadamente 90% de la población con RREM progresará al tipo secundario progresivo. Como con la RREM, la EM secundaria progresiva puede variar mucho. Para algunos pacientes, el aumento o la progresión de la incapacidad es muy gradual, y para otros, puede tener lugar más rápidamente. En general, sin embargo, la recuperación de los ataques es más y más incompleta, y los síntomas tienden a aumentar, creciendo la incapacidad. Los ataques clínicos se convierten en menos pronunciados, y las remisiones tienden a desaparecer, pero en este momento se ha destruido más tejido del SNC y el daño que se ha acumulado se aprecia más claramente en los MRI.

- 45 La composición de la invención puede utilizarse para tratar a un paciente que presente un comienzo reciente de EM, RREM o SPEM.

- 50 La composición de la presente invención puede reducir o mejorar uno o varios de los síntomas de EM, que incluyen la pérdida o reducción de la visión, el paso vacilante y desigual, la pronunciación confusa, la frecuencia e incontinencia urinarias, cambios de humor y depresión. La SPEM puede estar asociada con los espasmos musculares y con la parálisis severa.

En particular, la composición puede mejorar la neuritis óptica.

## 55 NEURITIS ÓPTICA

- 60 La neuritis óptica (ON) es una inflamación, acompañada de desmielinización, del nervio óptico que inerva a la retina del ojo. Constituye una afección variable y puede presentarse con algunos de los síntomas siguientes: visión borrosa, pérdida de la agudeza visual, pérdida de alguna o de la totalidad de la visión coloreada, ceguera total o parcial y dolor por detrás del ojo.

- La neuritis óptica es uno de los síntomas que se presentan más frecuentemente de la múltiple esclerosis y es el síntoma más habitual del comienzo de la EM. La ON puede atribuirse, sin embargo, a causas distintas de la EM, tales como la neuropatía óptica isquémica.

- 65 La ON se presenta unilateralmente (sólo en un ojo) en el 70% de los casos.

De modo muy típico, la Neuritis óptica afecta en primer lugar a la gente de entre 15 y 50 años de edad. En este grupo de edad, los estudios indican que más del 50% de los pacientes sufrirán la esclerosis múltiple en un plazo de 15 años. Como con la EM, las mujeres presentan aproximadamente dos veces más que los hombres, más probablemente, la ON, y la prevalencia entre los pueblos caucásicos es mayor que en otros grupos étnicos.

Los síntomas principales de la neuritis óptica son:

- Pérdida de la agudeza visual (vista borrosa)
- Dolor ocular.
- Discromatopsia (visión reducida de los colores)
- Fosfenos de movimiento y sonido (sensaciones de relampagueo visual obtenidas mediante movimientos oculares de lado a lado o de sonido).
- Síntoma de Uhthoff, el empeoramiento de los síntomas con el calor o con el agotamiento.

El tratamiento de ON con una composición según la presente invención puede prevenir, reducir o mejorar cualquiera de estos síntomas. Para controlar la progresión de ON, puede medirse convenientemente la agudeza visual utilizando un esquema Snellens.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes son proporcionados a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención. La invención se refiere particularmente a las formas de realización específicas que se describen en estos ejemplos.

Para la finalidad de los ejemplos, pueden utilizarse, para los péptidos MBP, los nombres siguientes:

Péptido MBP	Nombre en los Ejemplos (intercambiables)	
30-44	ATX-EM-01	<i>apitope</i> EM 1
83-99	ATX-EM-07	<i>apitope</i> EM7
131-145	ATX-EM-04	<i>apitope</i> EM4
140-154	ATX-EM-06	<i>apitope</i> EM6

La composición de los cuatro péptidos se denomina ATX-EM-1467.

### Ejemplo 1: Identificación de los epítomos de las células T con la proteína básica de la mielina limitada a HLA-DQ6.

Los genes MHC de tipo II confieren susceptibilidad a la esclerosis múltiple (Nepom y Ehrlich (1991), Ann.Rev.Immunol. 9:493-525). En los caucásicos en la Europa del Norte y Central, Australia y América del Norte, la asociación está relacionada con la molécula HLA-DR2 (DR2a [DRB5\*0101] y DR2b [DRB1\*1501] de MHC. Haines *et al* (1998), Human Mol. Genet. 7:1229-1234). Aunque los alelos DR2 y DQ6 de MHC se encuentran en loci distintos, existe entre los dos alelos un significativo equilibrio inestable de unión. La concordancia entre los dos alelos es del 99%, mucho mayor que lo esperado si los alelos se hubieran reasociado aleatoriamente. Por lo tanto, surge la posibilidad de que ciertos epítomos de células T con EM, puedan estar limitados a HLA-DQ6, más que a HLA-DR2.

El objetivo de este estudio consistió en identificar si los epítomos MBP de las células T humanas son presentados por la molécula HLA-DQ6 a los clones de células T aislados de los pacientes EM HLA-DR2 positivos. La activación de las células T se detectó mediante su proliferación, utilizando la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina radioactiva.

#### Antígenos peptídicos

Los péptidos MBP 30-44, 130-144 y 139-153 se sintetizaron utilizando L-aminoácidos y química F-moc estándar en un sintetizador peptídico múltiple Abimed AEM 422.

#### Células presentadoras de antígeno

Las células-L transfectadas con HLA-DQ6, HLA-DR2a o HLA-DR2b, o las células Mgar (EACC, Porton Down, Reino Unido), que expresan 1 HLA-DQ, DP y DR, se utilizaron como APC.

#### Clones de células T

Los clones EM-49:D3 y EM 17:A2 de células T se generaron a partir de los pacientes EM y el clon N5:19 se generó a partir de un individuo normal. Los tres clones se aislaron de los individuos DR2 positivos.

Ensayo de presentación antigénica

Las células que presentaban antígenos se incubaron con las distintas concentraciones del péptido y las células T apropiadas. La proliferación y, por tanto, la activación de las células T, se midió mediante la incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina, expresándose como el índice de estimulación (SI=contajes corregidos por minuto (ccpm) del cultivo que contiene el péptido/ccpm del cultivo sin péptido).

Resultados

Cuando el péptido MBP 30-44 fue presentado por las células L transfectadas con HLA-DQ6, el clon EM 49:D3 de células T dio lugar a una respuesta proliferativa muy intensa (1,5 veces superior a las células control Mgar) a la concentración peptídica más alta (Figura 1). Cuando MBP 130-144 fue presentado por las células L transfectadas con HLA-DQ6, se indujo una respuesta incluso mayor en las células EM 17:A2-T (un aumento de 3,24 veces en la proliferación, comparado con las células de control Mgar-Figura 2).

Un tercer clon de células T aislado a partir de un individuo DR2 N5:19 respondió al epítipo principal MBP:140-154 y a una serie de péptidos con 15 unidades poliméricas que se traslapan y cubren esta región (138-156). El péptido 139-153 estimuló la proliferación del clon de las células T N5:19 cuando fue presentado por las células L por HLA-DR2a, pero no por las células T transfectadas por HLA-DR2b (Figura 3).

Conclusión

Los clones de células T aislados de los individuos HLA-DR2 positivos, responden a los epítopos MBP limitados a HLA-DQ6 de las células T. Esto implica que la asociación de HLA-DR2 con la esclerosis múltiple no se limita a la restricción de DR2 de los epítopos MBP de las células T, sino también a que DQ6 esté limitado.

En la composición de MBP de la presente invención, dos de los péptidos se unen a HLA-DQ6 (MBP 30-44 y 131-145) y dos se unen a HLA-DR2 (MBP 140-154 y 83-99), Por tanto, la terapia peptídica con estos *apitopes* puede dirigirse bien a individuos HLA-DR2 o HLA-DQ6.

**Ejemplo 2: Inducción de la tolerancia con el *apitope* EM6 en un ratón transgénico HLA:DR2.**

El estudio se concibió para demostrar que un *apitope* EM6, cuando se presentaba mediante una molécula MHC de tipo II, puede inducir tolerancia inmunológica en un modelo de humanizado murino de esclerosis múltiple. El *apitope* EM6 es un *apitope* seleccionado a partir de los epítopos de las células T de MBP correspondientes a MBP 140-154, y es presentado mediante MHC de tipo II en las células de presentación, pudiendo estimular las células T sin ser procesado (véase el documento WO 03/064464). El modelo murino utilizado fue transgénico para la molécula MHC humana HLA:DR2 (DRB1\*1501) (Madsen *et al* (1999), Nature Genetics 23: 343-347).

La inducción de energía o de cambios en la población celular CD4+ T en un ratón después de administración de un *apitope* puede controlarse por una reducción en la proliferación de las células T cuando se estimulan *in vivo* con un antígeno.

Síntesis peptídica

El *apitope* EM6 (péptido MBP 140-154) se sintetizó utilizando L-aminoácidos y química F-moc estándar en un sintetizador peptídico múltiple Abimed AEM 422.

Ratones e inducción de la tolerancia

En el estudio, se utilizaron ratones transgénicos HLA DR2 con una edad de 8 a 12 semanas. Se indujo tolerancia en los ratones mediante un pretratamiento con 100 µg de *apitope* EM6 en 25 µl de solución salina tamponada de fosfato (PBS) o 25 µl de PBS solo por vía intranasal, en los días -8,-6 y -4, antes de la inmunización en el día 0.

Después de la inducción de tolerancia, los ratones se inmunizaron subcutáneamente con 100 µl de una emulsión que contenía un volumen idéntico de adyuvante completo de Freund (CFA) y PBS que contenía 200 µg de *apitope* EM6 y 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* eliminado mediante calor. Un grupo control de los animales, a los que previamente se les indujo tolerancia intranasalmente con PBS, se inmunizaron sin el péptido.

A los 10 días de la inmunización subcutánea, los nódulos linfáticos poplíteos e inguinales drenantes se extrajeron, determinándose la activación de las células T verificando la proliferación de las células T en respuesta a varias concentraciones del *apitope* EM6. La proliferación se determinó incorporando [<sup>3</sup>H] timidina, que se expresó como índice de estimulación (SI=contajes corregidos por minuto (ccpm) del cultivo que contiene el péptido/ccpm del cultivo



sin péptido).

#### Resultados

5 El grupo A de ratones que fue inducido a tolerancia con PBS e inmunizado entonces con *apitope* EM6, respondió a la estimulación antigénica cuando se volvieron a estimular con *apitope* EM6 de una forma dependiente de la dosis (figura 4). Con un aumento de la concentración del péptido, SI aumentó una media de 2,5 a 10. Todos los ratones en este grupo demostraron que el PBS administrado intranasalmente no pudo inducir tolerancia para el *apitope* EM6.

10 Contrariamente a esto, el pretratamiento intranasal con el *apitope* EM6 tuvo un profundo efecto en la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulada con este péptido. Los linfocitos de los ratones del grupo B no pudieron responder en ningún grado significativo, incluso a la alta concentración peptídica de 150 µg/ml (media 3 de SI, figura 4). Estos datos sugieren que el *apitope* EM6 indujo tolerancia en los linfocitos de los ratones HLA-DR2.

15 Los linfocitos extraídos de los ratones que se habían pretratado e inmunizado con PBS (Grupo C), no mostraron ninguna respuesta al *apitope* EM6 (figura 4). Esta falta de respuesta al péptido dentro del Grupo C, confirma que la respuesta proliferativa vista en el Grupo A, constituyó verdaderamente una respuesta a la inmunización con el *apitope* EM6.

#### Conclusión

Estos datos apoyan la hipótesis de que un péptido MBP (*apitope* EM6) que no requiere procesamiento y se une a las moléculas HLA:DR2 MHC de tipo II, puede inducir tolerancia cuando se administra intranasalmente.

#### **Ejemplo 3: Inducción de la tolerancia con el *apitope* EM7 (MBP 83-99) en los ratones doblemente transgénicos que muestran HLA:DR2 y el receptor de las células T (MBP) 82-100**

Este estudio investiga la capacidad del *apitope* EM7 (péptido MB 83-99) para inducir tolerancia en ratones doblemente transgénicos que expresan HLA:DR2 junto con el receptor de las células T para el péptido (MBP) 82-100 de la proteína básica de la mielina unida a HLA:DR2.

Los esplenocitos de estos animales doblemente transgénicos proliferan *in vitro* en respuesta al *apitope* EM7. La reducción de la anulación de la respuesta esplenocítica *in vitro* a un *apitope* después de su administración repetida *in vivo*, indica que se consiguió un estado de tolerancia.

La inducción de la tolerancia se ha conseguido mediante la utilización de tanto la vía nasal como de las subcutáneas-intradérmicas de la administración del *apitope*.

#### Inducción de la tolerancia

Se utilizaron grupos de 6 ó 7 ratones doblemente transgénicos emparejados según el sexo (de 8-12 semanas de edad). En el primer experimento, un grupo se trató intranasalmente diez veces con 100 µg del *apitope* EM7, en 25 µl de PBS a intervalos regulares durante tres semanas. El grupo de control recibió sólo PBS. En el segundo experimento, se proporcionó la misma cantidad del péptido mediante administración subcutánea/intradérmica en 100 µl de PBS. El grupo de control recibió el mismo volumen de PBS.

#### Ensayo de proliferación

Tres días después de la última administración del péptido o PBS, se recolectaron los bazos y se prepararon las suspensiones celulares. Se cultivaron los esplenocitos con 0,5 ó 5 µg/ml del *apitope* EM7, y se evaluaron con respecto a la proliferación mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina después de 48, 72 y 96 horas de cultivo. Los resultados se expresan como índices de estimulación (SI=contajes por minuto (cpm) del cultivo que contiene antígeno/contajes por minuto sin antígeno).

#### Medición de las citoquinas

En el segundo experimento, donde la inducción a la tolerancia se indujo mediante la vía subcutánea/intradérmica, los sobrenadantes del cultivo celular de los esplenocitos se recuperaron a las 48 y 72 horas del cultivo, y se evaluaron en cuanto a la presencia de IFN-γ e interleuquina-2 (IL-2), utilizando un ensayo enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

#### Resultados

En los tres momentos que se investigaron, los esplenocitos de los ratones tratados con PBS tanto por la vía intranasal como por la subcutánea-intradérmica, mostraron una intensa proliferación al *apitope* EM7, aumentando la magnitud de la respuesta con la concentración peptídica. Se observó una sorprendente reducción en la proliferación

en los cultivos de esplenocitos de ratones tratados con el *apitope* EM7 por ambas vías de administración. Tal como se muestra en la figura 5, después de 72 horas el SI promedio que se observó con los cultivos que contenían 5 µg/ml del *apitope* EM7 fue de 17 en los ratones tratados intranasalmente con el *apitope* EM7. En los cultivos correspondientes de los ratones de control tratados con PBS, se observó un SI promedio de 89. De modo similar, tal como se aprecia en la Figura 6, la administración del *apitope* EM7 por la vía subcutánea-intradérmica, dio lugar a una disminución en el SI promedio, desde 124 en los animales tratados con PBS a 49 en los animales tratados con el *apitope* EM7.

Los niveles de IFN $\gamma$  y de IL-2 que se detectaron en los sobrenadantes del cultivo de 48 horas, se muestran en la Figura 7. Se aprecia que el tratamiento repetido *in vivo* con el péptido, da lugar a una reducción impresionante en la reducción de ambas citoquinas, acompañando a la reducción en la respuesta proliferativa.

### Conclusión

Estos resultados indican que la tolerancia al *apitope* EM7 puede inducirse con éxito en un modelo murino diseñado para imitar el sistema humano, apoyando su potencial para utilizarlo en la terapia de la esclerosis múltiple. Además, su eficacia se mantiene cuando se administra por la vía subcutánea/intradérmica, la vía de elección para el hombre.

Aunque la eficacia *in vivo* de los *apitopes* EM6 y EM7 se ha demostrado, no es posible actualmente demostrar la eficacia de los *apitopes* EM1 y EM4. Esto se debe a la falta de expresión de la molécula HLA-DQ6 por parte de los ratones transgénicos. Los ratones que expresan la molécula se han creado, pero se ha encontrado que no pueden generar células CD4-T en el timo, y, por tanto, no organizan una respuesta inmunitaria al antígeno en el contexto de HLA-DQ6.

### **Ejemplo 4: Estudio de aumento de dosis con una composición de cuatro péptidos MBP.**

La combinación de cuatro péptidos (MBP 30-44, 131-145, 140-154 y 83-99) se utilizó como un estudio abierto de aumento de dosis de ATX-EM-1467 en pacientes con esclerosis múltiple progresiva secundaria.

Los pacientes se controlaron a las cuatro semanas y a los tres meses después de la dosis final del estudio para la agudeza visual (es decir, reducción en la neuritis óptica), parámetros inmunológicos e inflamación del SNC.

### **Ejemplo 4A - Control de la agudeza visual**

La neuritis óptica (ON) es una inflamación, con desmielinización acompañante, del nervio óptico que inerva la retina ocular. La ON constituye uno de los síntomas que más habitualmente se presentan en la esclerosis múltiple, y es el síntoma inicial más habitual en esta enfermedad.

Los síntomas típicos de ON incluyen: visión borrosa, pérdida de agudeza visual, pérdida de algo o de toda la visión de los colores, ceguera parcial o total y dolor en la parte posterior del ojo.

Se investigó el efecto del tratamiento con ATX-EM-1467 sobre la neuritis óptica resultante del proceso neuroinflamatorio implicado en la MS. La ATX-EM-1467 se administró siguiendo el protocolo de aumento de dosis que se ha indicado anteriormente, determinándose, por tanto, la agudeza visual del paciente un mes después del tratamiento, utilizando un esquema estándar de Snellens (Figura 8).

Los resultados muestran una mejoría clínicamente significativa en la agudeza visual un mes después del tratamiento. Esto se demostró en el análisis del examen de la agudeza visual inicial que se realizó mediante un cribado con la prueba que se realizó al mes siguiente. El cribado inicial de las mediciones de la vista 6/24 y 6/9 (en el ojo derecho e izquierdo respectivamente) mejoraron a 6/9 (ojo derecho) y 6/6 (ojo izquierdo) después del tratamiento. La visión del ojo del paciente no había cambiado previamente durante los últimos dos años.

### **Ejemplo 4B-Control de los parámetros inmunológicos.**

Tal como se ha expuesto anteriormente, se investigó en pacientes con EM el efecto de la terapia peptídica con un cóctel que contenía cuatro péptidos *apitope*<sup>TM</sup> de la proteína básica de la mielina (ATX-EM-1467). Cada paciente se sometió a un cribado al comenzar la prueba, hasta 14 días antes de la dosis final (visita 1). La primera dosis de 25 µg de ATX-EM-1467 se administró en la visita 2, 50 µg en la visita 3, 100 µg en la visita 4, 400 µg en la visita 5 y 800 µg en las visitas 6 y 7. Se llevó a cabo un examen ulterior al cabo de un mes, y tres seguimientos mensuales (visitas 8 & 9). La tabla siguiente resume el protocolo y muestra el número de visitas realizadas a la clínica por cada paciente, junto a la dosis del péptido y la muestra sanguínea.

TABLA 1

NÚMERO DE VISITA	DOSIS DE ATX-EM-1467 (µg)	COMENTARIO
1	-	Visita de precibado. 50 ml de la muestra sanguínea recogida para inmunología
2	25	No se recogió muestra para inmunología
3	50	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología
4	100	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología
5	400	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología
6	800	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología
7	800	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología
8	-	50 ml de la muestra sanguínea para inmunología tomadas cuatro semanas después de la visita 7.

5 Las muestras sanguíneas se recogieron en las visitas 1 y en las 3 a 9, y se ensayaron con respecto a las respuestas inmunitarias a distintos antígenos que incluían el derivado de la proteína purificada (PPD) del *Mycobacterium tuberculosis*, como un control positivo, la proteína básica de la mielina purificada humana (MBP) y ATX-EM-1467. Las respuestas inmunitarias que debían determinarse incluían la proliferación *in vitro* de las células T, la secreción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos tisulares y la generación del ARN citoquinico.

10 Resultados

15 Se apreció una respuesta significativa a MBP, con un pico en la proliferación en la visita 3 (Figura 9). Este se correlacionó con un pico en la secreción del interferón gamma. De forma importante, sin embargo, el nivel de secreción del interferón gamma cayó después de la tercera visita y alcanzó el nivel anterior en la visita 8. Los niveles de IL-10 no cambiaron significativamente hasta la visita 7, en cuyo momento se apreció un aumento significativo en la secreción de esta citoquina. Los niveles de IL-4, IL5 y TNF alfa eran de aproximadamente el anterior en respuesta a MBP en todos los tiempos.

20 No se observaron respuestas proliferativas o un aumento en las respuestas de la citoquina a ATX-EM-1467 (Figura 10)

Conclusión

25 En la visita tres se observó una respuesta a MBP, demostrando un punto culminante en la secreción de IL-2 y de interferón gamma que se correlaciona con un pico en la proliferación en este momento. Este aumento en la respuesta se cree que es atribuible a la administración de péptidos.

30 Sin embargo, de manera importante, al aumento transitorio en la secreción de citoquinas siguió una vuelta a los niveles de base del interferón gamma. También ocurrió un aumento significativo en la secreción de IL-10 después de la segunda administración de ATX-EM-1467 a la dosis más alta. Previamente, se ha informado de que, en los modelos animales, es efectiva la inmunoterapia específica con los péptidos sintéticos, dando lugar a la inducción de las células T regulatorias que segregan IL-10. La inducción de las células T regulatorias que segregan IL-10 en los ratones, implica una respuesta transitoria a los péptidos, con secreción del interferón gamma a bajos niveles (Burkhart *et al*, 1999 *Int. Immunol* 11: 1625-1634; Sundstedt *et al.*, 2003 *J Immunol* 170:1240-1248). Esto es seguido por una disminución en el interferón gamma y un aumento concomitante en IL10. La cinética de la secreción citoquinica mostrada después del tratamiento con ATX-EM-1467 reproduce efectivamente el patrón observado previamente en los ratones experimentales, sugiriendo que ATX-EM-1467 puede inducir las células T regulatorias que secretan IL-10.

40 **Ejemplo 4C- La respuesta a MBP es significativamente descenso-regulada a la baja mediante el tratamiento con ATX-EM-1467.**

45 Seis pacientes con múltiple esclerosis progresiva secundaria (SPEM) se apuntaron a y finalizaron un ensayo clínico de fase I/IIa siguiendo el protocolo de aumento de dosis que se proporciona en el Ejemplo 4B.

El genotipado HLA mostró que los seis pacientes que se apuntaron al ensayo clínico representaban una amplia variedad de haplotipos de HLA, incluyendo el haplotipo HLA-DR15 asociado a EM. La amplia distribución de HLA-DRB1 representada por los pacientes que se apuntaron a esta prueba implica que ATX-EM-1467 será seguro y bien tolerado en los pacientes EM sin tener en cuenta su genotipo HLA-DR.

50 El tratamiento de los pacientes con ATX-EM-1467 no generó anticuerpos anti-peptídicos. Esto indica que la utilización de ATX-EM-1467 es segura y correlaciona con la falta de complicaciones del sitio de la inyección o las manifestaciones alérgicas asociadas con el ensayo.

Un completo análisis de las respuestas de las células T mostró que:

- 5 a) El tratamiento con ATX-EM-1467 no tuvo un efecto inmunosupresor no específico. Esto se muestra claramente por el hecho de que la respuesta inmunitaria al derivado proteico purificado, un antígeno de la *Mycobacterium tuberculosis*, se mantuvo (datos no representados).
- 10 b) El tratamiento con ATX-EM-1467, utilizando el protocolo, no condujo a una respuesta inmunitaria agresiva a ATX-EM-1467 o a la proteína básica de mielina (datos no representados).
- 15 c) La comparación de la respuesta proliferativa de las células T antes del (visita 1) y después del tratamiento (visita 8) con ATX-EM-1467, reveló una reducción significativa en la respuesta a la proteína básica de la mielina (figura 11). Los tres individuos que respondieron a MBP en V1, mostraban todos una reducción en la respuesta a la proteína por V8. Considerando todos los pacientes en conjunto, existe evidencia para una reducción significativa en la respuesta a MBP desde V1 a V8 (P=0,0313).

## Materiales y Métodos

### Formulaciones y dosis

20 Cada uno de los cuatro péptidos se prepara independientemente bajo contrato utilizando la síntesis peptídica en fase sólida, purificándose utilizando HPLC. Se guardan liofilizados.

25 La ATX-EM-1467 es una mezcla 1:1:1:1 de *apitopes* EM1, EM4, EM6 y EM7 en solución salina tamponada de fosfato para administración intradérmica.

30 Dos intensidades de ATX-EM-1467, denominadas ATX-EM-1467A y ATX-EM-1467B, que contenían 4 mg/ml y 0,5 mg/ml del péptido, respectivamente, se prepararon para permitir el aumento de la dosis. El régimen utiliza cinco inyecciones de aumento de dosis, (25, 50, 100, 400 y 800 µg de dosis total) que se administran de 7 a 14 días aparte. Los pacientes reciben entonces una segunda dosis de 800 µg, 7 a 14 días después de la primera dosis de 800 µg.

35 Después de recibir la totalidad de las seis dosis de la medicación del estudio, se evalúa al paciente a las cuatro semanas y a los tres meses después de esa dosis final.

### Ensayo de agudeza visual

40 Se utilizó un esquema Snellens de tamaño estándar para llevar a cabo el ensayo, con una ligera iluminación posterior y situándose el paciente a 6 metros de distancia (Figura 8).

Cada ojo se examinó separadamente con respecto a la línea más baja en el esquema que el paciente podía leer. Esto se anotaba entonces como agudeza visual=6/(la línea que el paciente ha podido leer).

### Inmunoensayos

#### i) Proliferación de las células T

50 Se dispuso PBMC crioconservado en cultivos de 1 ml que contenían  $1,5 \times 10^6$  células en  $\alpha$ -MEM, en placas para cultivos tisulares de 48 pocillos (Nunc International, Costar, Corning Inc, New York, USA). Se controlaron las respuestas a MBP y a los antígenos peptídicos a diversas concentraciones durante un período de tiempo de 10 días. Los pocillos control no contenían antígenos. Después de 20 horas o de 2, 4, 6, 8 y 10 días de cultivo, de cada uno de los cultivos de 1 ml se eliminaron alícuotas duplicadas de 100 µl de la suspensión celular, con objeto de medir la proliferación en respuesta al antígeno mediante la absorción de [<sup>3</sup>H] timidina.

#### ii) Medición de las citoquinas secretadas (IL-2 e IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ ): Ensayo citométrico del conjunto de microesferas:

60 Los niveles citoquímicos del sobrenadante del cultivo se determinaron el ensayo citométrico de microesferas (Becton Dickenson Biosciences, Cowley, Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la obtención de los datos de las muestras utilizando el FACS Calibur (BD Biosciences), se generaron los resultados de forma gráfica y tabular utilizando software BD CBA. Los niveles cuantificables mínimos de citoquina fueron los siguientes: IL-2 e IL-4, 2,6 pg/ml-1, IL-5 2,4 pg/ml-1, IL-10 y TNF- $\alpha$  2,8 pg/ml-1, IFN- $\gamma$  7,1 pg/ml-1.

### PCR cuantitativa en tiempo real para medir el ARN de las citoquinas (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ )

65 Para el análisis de IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , se llevaron a cabo reacciones PCR en un volumen final de 20 µl que

5 contenía una mezcla de ADNc, tampón PCR, 6,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP, cebadores directo e inverso (concentraciones de cebador directo: IL-2 300 nM, IL-10 600 nM, IFN- $\gamma$  600 nM, TNF- $\alpha$  600 nM, concentraciones de  
 10 cebador inversos: IL-2 600 nM, IL-10 900 nM, IFN- $\gamma$  900 nM, TNF- $\alpha$  600 nM), sonda FAM-TAMRA de 200 nM, y 0,05  $\mu$ l-1 de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de ciclación fueron: una etapa inicial de  
 15 desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, seguido por 35 ciclos con 15 s a 94°C y 1 min a 60°C. Para la  $\beta$ -2 microglobulina, la mezcla PCR anteriormente descrita se suplementó con 0,1  $\mu$ M de cebadores directo e inverso, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, cuantificándose con SYBR Verde I (Moleculares Probes Inc, dilución X30000 del stock). Después de una etapa de desnaturalización de un 1 minuto a 95°C, continuó la amplificación con 35 ciclos de 15 s a 94°C, 1 min a 61°C y 1 min a 72°C. Las reacciones PCR y la detección de la fluorescencia de los amplicones generados se realizó en un sistema Opticon 2 (MJ Research, USA). La fluorescencia de base se estableció haciendo mediciones desde el ciclo 1 al 10. Los valores Ct se calcularon determinando el punto en el cual la fluorescencia sobrepasa de 8 a 10 veces la desviación estándar del valor basal. Se ensayaron las muestras por duplicado, calculándose el número de copias a partir de una curva estándar para cada ADN diana. Las diferencias en el número de entrada de copias de ARN y la síntesis de ADNc se corrigieron normalizando la expresión citoquímica a la expresión de la  $\beta$ -2 microglobulina.

#### Tipado de HLA

20 El análisis de la expresión del gen HLA se llevó a cabo mediante un polimorfismo de conformación monocatenaria estándar, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa sobre al ADN extraído de leucocitos de la sangre periférica. El tipo HLA de cada paciente se utilizó para la interpretación de los resultados de los ensayos inmunológicos.

#### Ensayos anticuerpo antipeptidos séricos

25 Se recubrieron placas de 96 pocillos con 1-10  $\mu$ g/ml de cada *apitope* EM1, EM4, EM6 o EM7 a pH 9,6, durante la noche, a 4°C. Se lavaron las placas cuatro veces con solución salina tamponada de fosfato, pH 7,2, Tween (PBS-Tween) al 0,05%, bloqueándose los pocillos con FCS al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluyeron los sueros 1:100 en PBS-Tween y se incubaron en pocillos duplicados durante una hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, se añadió a cada pocillo el conjugado IgG anti-humana de cabra-peroxidasa de rábano (Sigma) diluido 1:12000 en PBS, incubándose las placas durante una hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, se añadieron 0,4 mg/ml de diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma) más peróxido de hidrógeno al 30%, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. El desarrollo del color se detuvo con 2,0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50  $\mu$ l) y valores de densidad óptica (OD) medidos a 490 nm con un lector ELISA de placa. Los resultados se proporcionaron como OD para suero diluido 1:100.

#### Escaneado por MRI

40 La inflamación en el SNC se investiga utilizando un escaneado mediante MRI potenciado por gadolinio. Se examina el volumen y el número de lesiones que experimentaron una potenciación y se compara con el escaneado de base.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende los péptidos de la proteína básica de la mielina siguientes:
  - 5 MBP 30-44;  
MBP 83-99;  
MBP 131-145; y  
MBP 140-154.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, constituida esencialmente por los péptidos de la proteína básica de la mielina siguientes
  - 15 MBP 30-44;  
MBP 83-99;  
MBP 131-145; y  
MBP 140-154.
- 20 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, para su utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad.
- 25 4. Composición según la reivindicación 1 ó 2, para su utilización en el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple.
- 30 5. Composición según la reivindicación 1 ó 2, para su utilización en el tratamiento o la prevención de la neuritis óptica asociada con la esclerosis múltiple.
- 35 6. Utilización de una composición según la reivindicación 1 ó 2, en la preparación de un medicamento para tratar la esclerosis múltiple.
- 40 7. Utilización de una composición según la reivindicación 1 ó 2, en la preparación de un medicamento para tratar la neuritis óptica asociada con la esclerosis múltiple.
- 45 8. Composición para su utilización según la reivindicación 3 ó 4, para la administración siguiendo un protocolo de aumento de la dosis.
9. Composición para su utilización según la reivindicación 3 ó 4, para la administración a un individuo HLA-DQ6 o HLA-DR2 positivo.
10. Kit que comprende los péptidos de la proteína básica de la mielina siguientes:
  - 40 MBP 30-44;  
MBP 83-99;  
MBP 131-145; y  
MBP 140-154
- 45 para la administración simultánea, por separado o secuencial

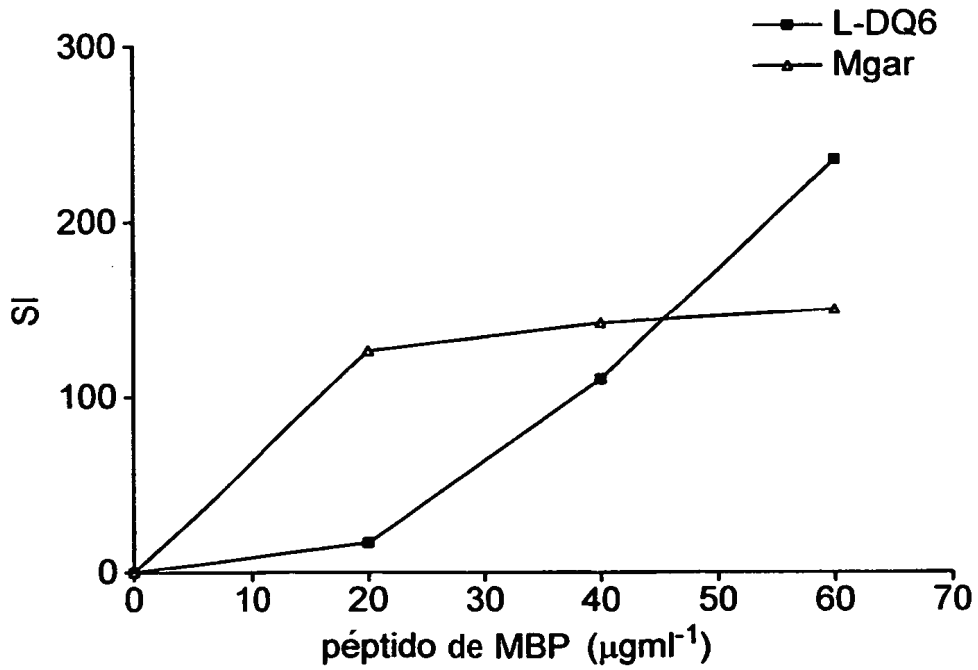


FIG. 1

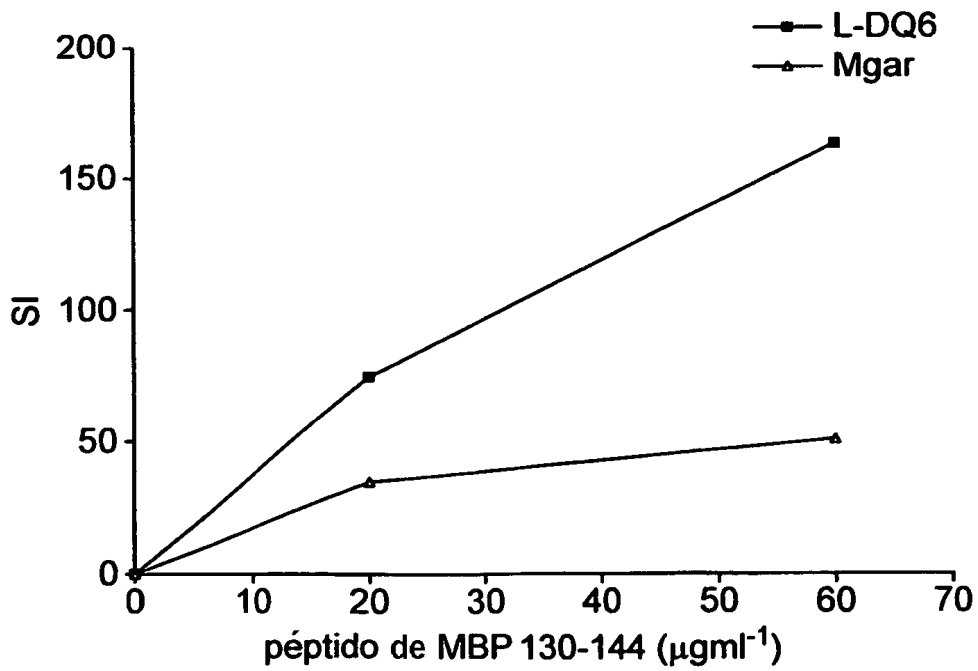


FIG. 2

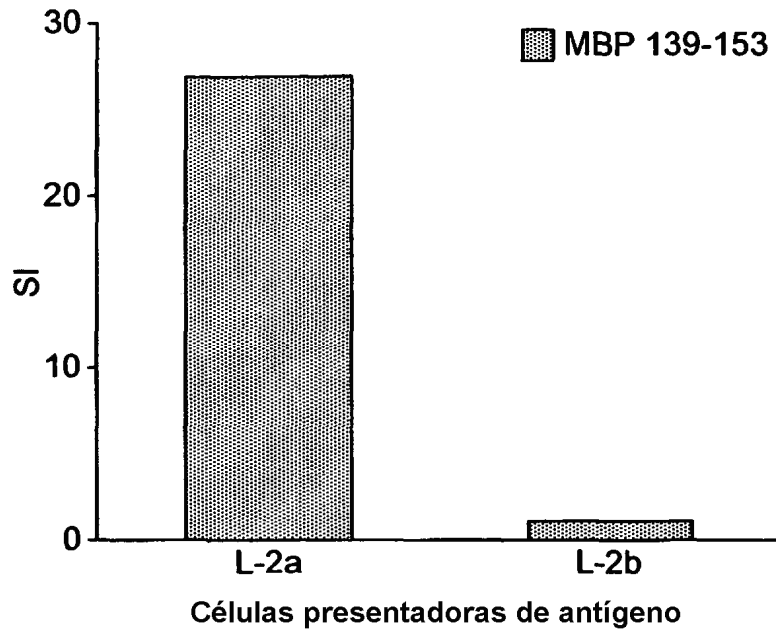


FIG. 3

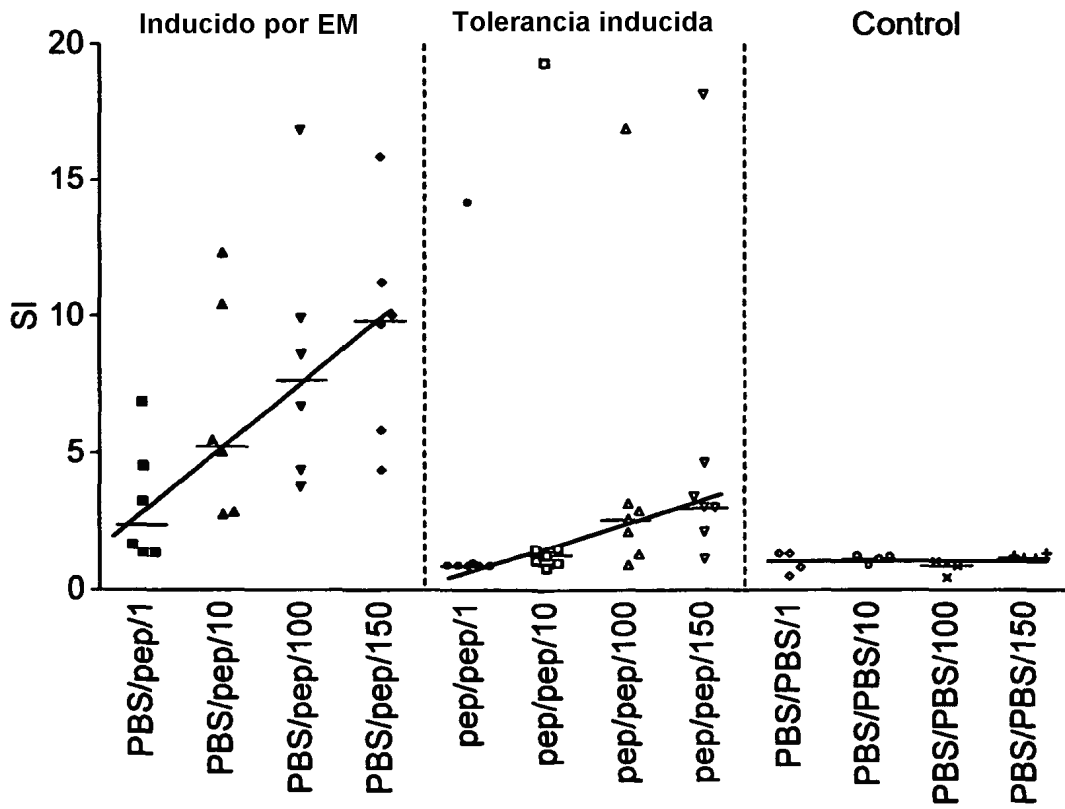


FIG. 4



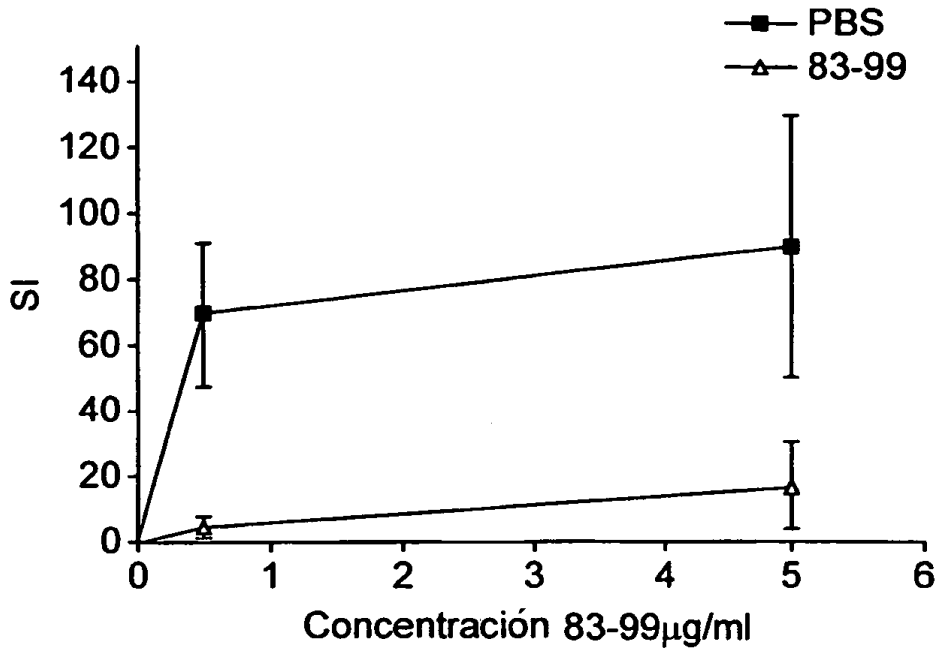


FIG. 5

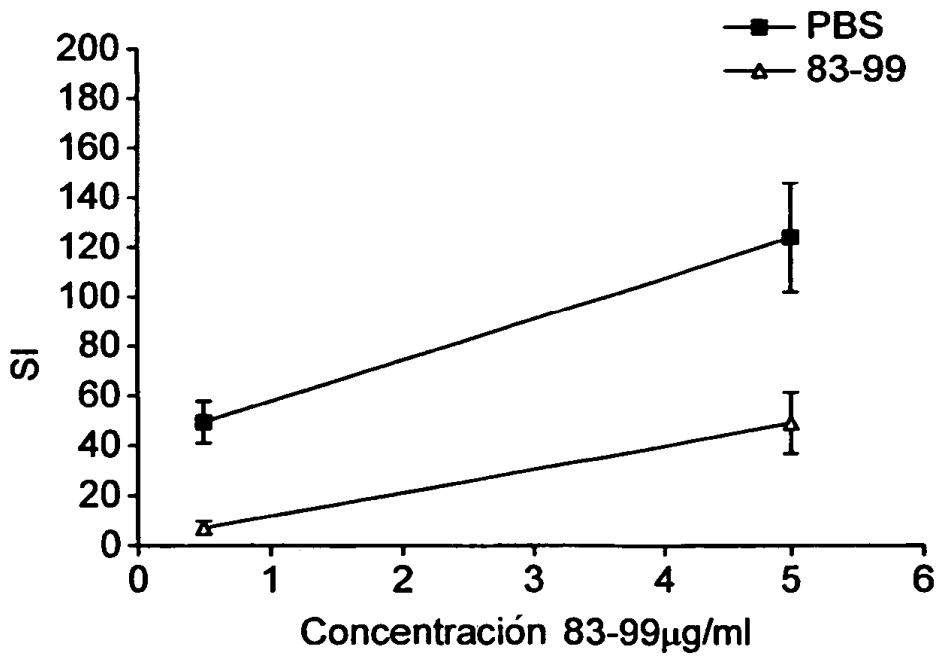
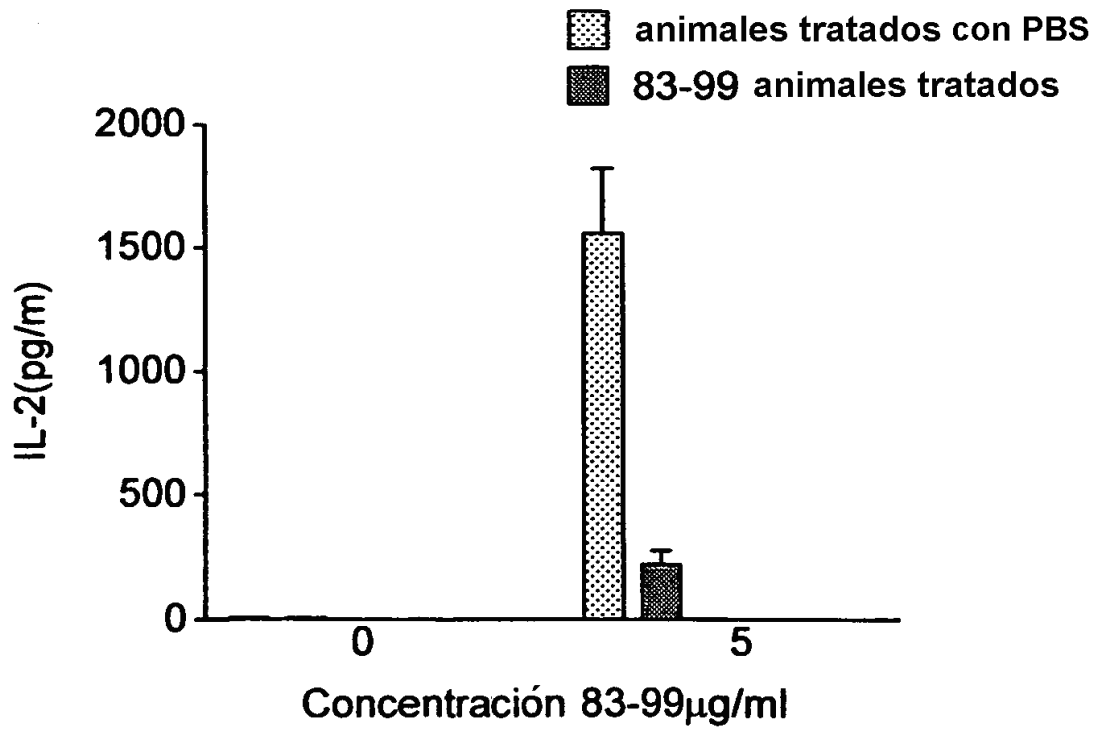
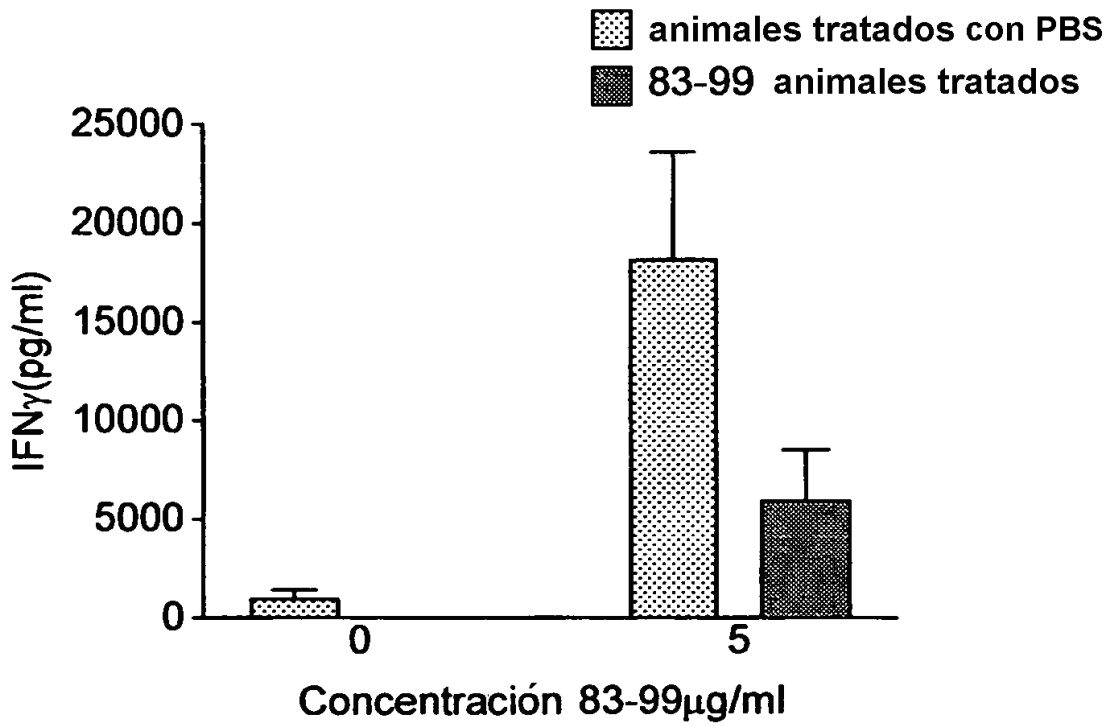


FIG. 6



**FIG. 7**

A

36

D F

24

H Z P

18

T X U D

12

Z A D N H

9

P N T U H X

6

U A Z N F D T

5

N P H T A F X U

4

X D F H P T Z A N

3

F A X T D N H U P Z

FIG. 8

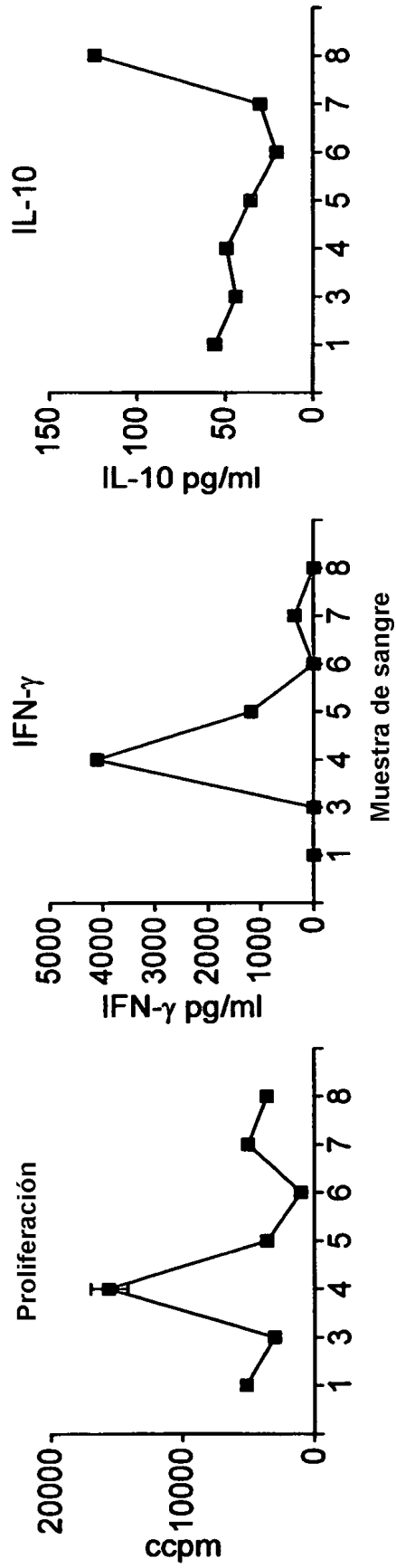


FIG. 9

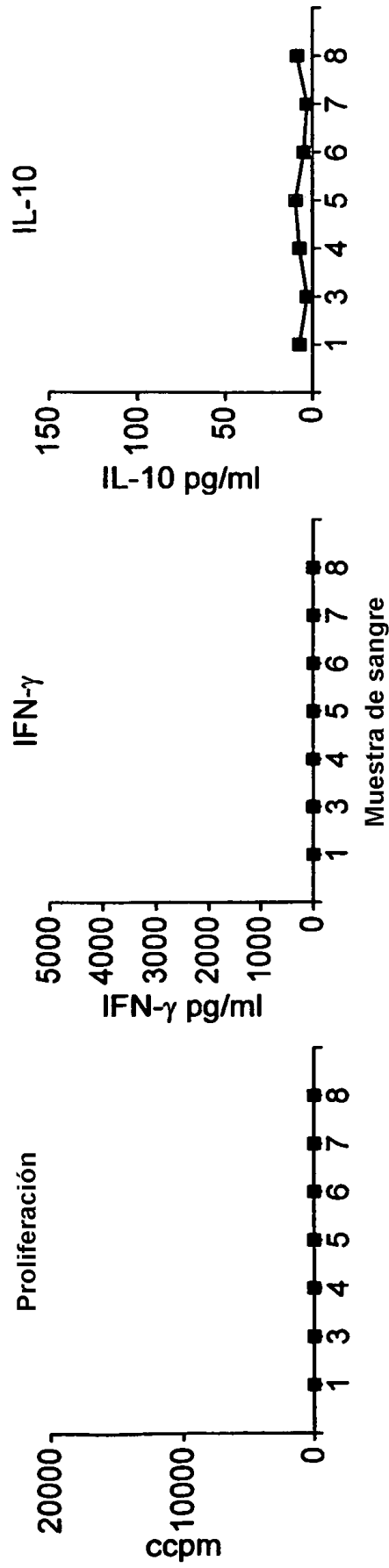
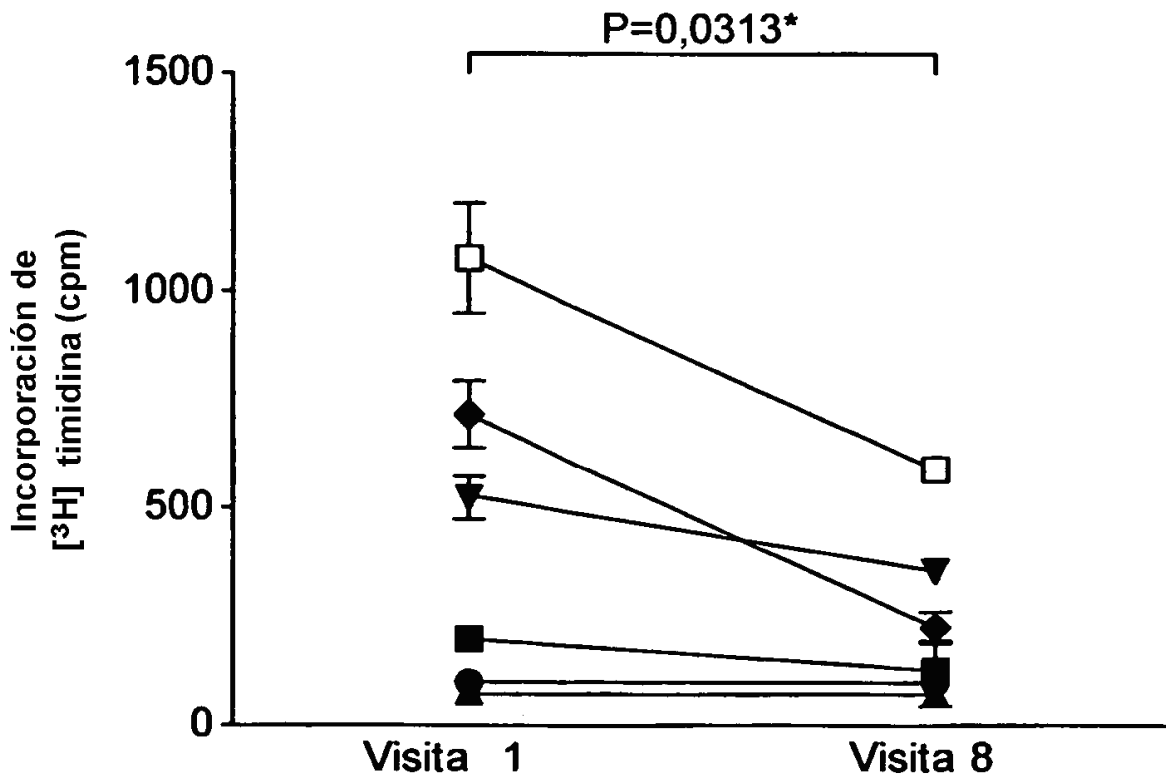


FIG. 10



\*Prueba del rango con signo de Wilcoxon (de una cola)

FIG. 11