

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 336**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2013 PCT/EP2013/057629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013 E 13715237 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2836229**

54 Título: **Liposomas que contienen fragmentos oligopeptídicos de proteína básica de mielina, una composición farmacéutica y un procedimiento de tratamiento de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

**11.04.2012 US 201213444788**

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

**01.07.2019**

73 Titular/es:

**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)  
Fifth Floor, 15 Whitehall  
London SW1 2DD, GB**

72 Inventor/es:

**GABIVOV, ALEXANDER;  
BELOGUROV, ALEXEY;  
PONOMARENKO, NATALIA;  
SMIRNOV, IVAN;  
BACON, ANDREW y  
GREGORIADIS, GREGORY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 718 336 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

Liposomas que contienen fragmentos oligopeptídicos de proteína básica de mielina, una composición farmacéutica y un procedimiento de tratamiento de esclerosis múltiple

### Antecedentes de la invención

5 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa en que las vainas grasas de mielina alrededor de los axones del cerebro y de la médula espinal están dañadas, lo que da lugar a desmielinización y formación de cicatrices. El daño causado al sistema nervioso central (SNC) provoca un amplio espectro de síntomas neurológicos. Aproximadamente un millón de personas en todo el mundo padece esta enfermedad autoinmunitaria, que tiene una etiología enigmática y una patogenia poco comprendida. Los linfocitos B y T reactivos contra componentes de la membrana mielina median la desmielinización del cerebro y de la médula espinal y parecen ser responsables de una gran parte de la progresión de la enfermedad.

10 La lista de autoantígenos potenciales contra los que son reactivos los linfocitos B y T en pacientes de EM está creciendo progresivamente e incluye varias proteínas asociadas con oligodendrocitos, muy notablemente la proteína básica de mielina (MBP) y la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG). La infiltración del sistema nervioso central por estos macrófagos y linfocitos, a través de la barrera hematoencefálica (BHE), provoca la formación de lesiones desmielinizantes inflamatorias en el cerebro y la médula espinal.

15 Aunque los linfocitos T son responsables de una gran parte del efecto desmielinizante, los linfocitos B desempeñan una función sustancial también. Esto porque los linfocitos B funcionan como células presentadoras de antígeno y células productoras de citocinas, además de su función bien reconocida en la producción de anticuerpos (Hikada y Zouali, Nat Immunol 2010;11:1065-8). una evidencia adicional de la implicación de los linfocitos B en la desmielinización es la detección de anticuerpos catalíticos contra MBP en pacientes con esclerosis múltiple. Estos anticuerpos catalíticos no solamente pueden unirse a su antígeno, sino que también lo escinden (Ponomarenko NA y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:281-6). La evidencia sugiere que hay un fuerte componente ambiental para la progresión de EM, en que los autoanticuerpos con reactividad cruzada por antígenos neuronales y víricos contribuyen a la etiología y patogenia de EM (Gabibov AG y col., FASEB J 2011;25:4211-21).

20 Se han propuesto muchos tratamientos para EM, incluyendo: (i) administración de acetato de glatiramer (GA); (ii) administración de "ligandos peptídicos alterados" (APL) que interactúan con receptores de linfocitos T (TCR); (iii) administración de IFN $\beta$ ; (iv) administración de anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-CD25 y anti-CD52; (v) diversos tratamientos orales; (vi) vacunación con linfocitos T inactivados o regiones hipervariables de TCR; (vii) inducción de tolerancia del sistema inmunitario mediante la administración de autoantígenos o vacunación de ADN; y (viii) tratamiento de reducción dirigida a linfocitos B.

25 No obstante, a pesar de los datos clínicos, inmunológicos y bioquímicos prometedores, ninguno de los tratamientos existentes puede curar o prevenir la progresión de EM. Por tanto, hay una gran necesidad en la técnica de estrategias terapéuticas para EM eficaces.

### Breve resumen de la invención

35 En un aspecto, la presente invención satisface una necesidad en el campo de la medicina de composiciones eficaces y procedimientos de tratamiento de la esclerosis múltiple (EM), proporcionando una composición terapéutica de péptidos MBP inmunodominantes ligados a un vector para su administración a un sujeto que lo necesite. En una realización específica, la composición comprende péptidos MBP inmunodominantes encapsulados en un liposoma manosilado. Como se muestra en el presente documento, la administración de estas composiciones mejora la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental en curso en un modelo de rata con EM de EAE inducida.

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que determinados péptidos MBP son epítomos de linfocitos B principales en pacientes que padecen esclerosis múltiple. Se descubrió que la administración de formulaciones liposómicas de estos péptidos, pero no los péptidos libres, a modelos de roedor de EM provocaba una reducción estadísticamente significativa en la parálisis. Sin limitarse a teoría alguna, es posible que la formulación liposómica de estos péptidos provoque un suministro mejorado de estos péptidos a las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos B y/o células presentadoras de antígeno) y/o mejore la captación de estos péptidos en las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos B y/o células presentadoras de antígeno).

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona, entre otros aspectos, composiciones y procedimientos para tratar la esclerosis múltiple. Las composiciones comprenden uno o más de los péptidos MBP identificados ligados a un vector (por ejemplo, un liposoma manosilado).

50 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en medicina, consistiendo la composición en dos péptidos de proteína básica de mielina (MBP) ligados a un vector, consistiendo el primer péptido MBP en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y consistiendo el segundo péptido MBP en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y comprendiendo el vector un liposoma que tiene un resto de dirección expuesto en superficie que comprende un residuo de manosa manDOG.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el péptido MBP está ligado covalentemente al vector. En otra realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el péptido MBP no está ligado covalentemente al vector.

5 En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el vector comprende un resto de dirección. En una realización específica de las composiciones proporcionadas anteriormente, el vector es un resto de dirección.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el resto de dirección aumenta: (a) el suministro del péptido MBP a una célula inmunitaria; o (b) la captación del péptido MBP en una célula inmunitaria, en comparación con un péptido MBP ligado a un vector en ausencia de un resto de dirección.

10 En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el resto de dirección comprende un residuo de manosa. En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la célula inmunitaria es un linfocito B. En otra realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, la célula inmunitaria es una célula presentadora de antígeno (APC).

15 En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el péptido o péptidos MBP no están ligados covalentemente al liposoma. En otra realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el péptido o péptidos MBP están encapsulados por el liposoma.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el liposoma tiene un diámetro promedio de 100 nm a 200 nm.

En una realización de las composiciones proporcionadas anteriormente, el residuo de manosa es manDOG.

20 En una realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la composición se administra al paciente al menos una vez a la semana. En otra realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la composición se administra al paciente al menos dos veces a la semana. En otra realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la composición se administra al paciente diariamente.

En una realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la composición se administra por administración tópica, administración entérica o administración parenteral.

25 **Breve descripción de los dibujos**

30 **Figura 1.** Las ratas DA con EAE inducida son los modelos de roedor más relevantes de EM en términos de patrón de unión de autoanticuerpos anti-MBP. (A) Autoanticuerpos en suero de pacientes con EM y modelos de roedor que desarrollan encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (ratas DA, ratones SJL y C57BL/6) se unen de forma reproducible a MBP en ELISA. Se usó suero de ratones BALB/c como control negativo. (B) Diseño de colección de epítomos de MBP. Tinción de Coomassie representativa e hibridación de transferencia de Western de mAb anti-c-myc y anti-MBP con la colección de epítomos de MBP. El Ab anti-c-myc se une a todos los miembros de la colección de epítomos de MBP debido a la presencia del epítipo abordado en todas las proteínas de fusión (esquema en la superior) lo que sugiere, por tanto, la exposición y accesibilidad de todos los péptidos MBP, ubicados directamente a anteriores al epítipo c-myc. El Ab monoclonal anti-MBP (clon F4A3, epítipo de MBP RHGFLPRHR (SEQ ID NO: 20)) reacciona con MBP completa y sus péptidos MBP2 y MBP3 según se predice. (C) Patrón de unión de anticuerpos en suero para la colección de epítomos de MBP de acuerdo con ELISA. De acuerdo con nuestros datos, las ratas DA que desarrollan EAE son las más relevantes para el modelo de roedor de EM. La secuencia de MBP con péptidos presentados en esta colección de epítomos se muestra en la parte inferior (SEQ ID NO: 17). Cada décimo residuo de aminoácido está marcado en negrita. Los corchetes representan péptidos inmunodominantes MBP-1/-2/-3, seleccionados para el cribado de eficacia de tratamiento.

45 **Figura 2.** Caracterización de especificidad y afinidad de anticuerpos policlonales de ratas DA, inmunizadas con MBP(63-81). (A) El panel superior muestra que los tres fragmentos de MBP se reconocen por autoAb en suero de ratas DA con EAE inducida. Se determinaron péptidos inmunodominantes de acuerdo con el ELISA de unión de autoAb con la colección de epítomos y el cálculo teórico adicional basado en la suposición de sus secuencias solapantes. Adicionalmente, la colección de epítomos de MBP se hibridó con el mAb F4A3 anti-c-myc y anti-MBP para verificar el ensayo de unión (panel inferior). (B) Características cuantitativas del reconocimiento de epítomos determinados por autoAb, medido por la técnica de SPR. Se muestran los péptidos respectivos y las constantes de disociación eficaces. Los epítomos exactos se muestran en negrita, ND = no determinado.

50 **Figura 3.** Representación esquemática de la técnica de liposomación usada para encapsular péptidos inmunodominantes de MBP en liposomas SUV manosilados. (Parte superior izquierda) Mezcla de lípidos (PC de huevo con un 1 % de DOG manosilado) en cloroformo. (Parte superior central) Formación de capas lipídicas irregulares durante la evaporación del disolvente orgánico. (Parte superior derecha) Primera rehidratación que da lugar a la formación de liposomas MLV de múltiples capas. El diámetro promedio de las partículas es entre 1-5 µm. (Parte inferior izquierda) Secado por congelación de los liposomas SUV, obtenidos de liposomas MLV por homogeneización a alta presión, y mezcla de péptidos con exceso de azúcar. (Parte inferior central) Los péptidos están ubicados entre liposomas SUV colapsados. (Parte inferior derecha) Encapsulación de péptidos durante la

segunda rehidratación en los liposomas SUV con un tamaño de aproximadamente 60-80 nm y un 1,0 % de residuos de manosa en la superficie. Se ejecutaron procesamientos por Visual Science Company.

**Figura 4.** Los péptidos MBP inmunodominantes atrapados en liposomas mejoran la encefalomyelitis autoinmunitaria experimental en ratas DA. Todos los grupos en consideración (A-G) se examinaron en términos de puntuación media de enfermedad, tasa de gliosis/desmielinización. El grupo de control no tratado (vehículo) se muestra por la línea en negrita oscura (A) y se repitió en cada gráfico para comparación. Se usaron tres fragmentos inmunodominantes de MBP encapsulada en liposomas SUV manosilados para el tratamiento de EAE en ratas DA: MBP(46-62) fue la más eficaz en disminuir la puntuación de enfermedad máxima durante el primer ataque (B), MBP(124-139) (C) y MBP(147-170) (D) evitaron el desarrollo de la fase de remisión. La administración de una mezcla de los péptidos MBP inmunodominantes MBP(46-62), MBP(124-139) y MBP(147-170) atrapados en liposomas mejoró significativamente en la EAE prolongada (E), copaxona (F), y el péptido libres MBP(46-62) (G) se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. La puntuación media de enfermedad se muestra para cada grupo. La diferencia estadísticamente significativa se muestra por la línea en negrita clara. El perfil representativo de la rata individual seleccionada se muestra por la línea fina. La tinción con hematoxilina y eosina representativa se muestra en el panel de la derecha.

**Figura 5.** Péptidos MBP inmunodominantes atrapados en liposomas disminuyen el título de autoanticuerpos anti-MBP en suero y regulan por disminución el perfil de citocinas Th1 en el SNC. (A) Concentración en suero de autoAb anti-MBP en ratas DA con EAE tratadas con MBP1 SUV, MBP1/2/3 SUV y copaxona en comparación con ratas no tratadas y no inmunizadas. Tinción azul de Luxol rápido representativa (B), inmunotinción para las citocinas Th1 IFN $\gamma$  (B) e IL2 (C), e inmunotinción de BDNF (D) en secciones cerebrales de ratas DA tratadas con MBP1 SUV (parte inferior derecha), MBP1/2/3 SUV (parte inferior izquierda) y copaxona (parte superior derecha), en contraste con ratas no tratadas (parte superior izquierda).

**Figura 6.** Puntuación media de parálisis para modelos de EM de rata con EAE inducida. Se asignó una puntuación de parálisis diariamente a cada rata durante los periodos del estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento (total 35 días). Se separaron 54 ratas DA con EAE inducida equitativamente en 9 grupos. Los grupos I-VII se trataron con las formulaciones 1-7, el grupo VIII se trató con copaxona (grupo de control positivo), al grupo IX se le administró una inyección de agua (grupo de control negativo). Las puntuaciones de parálisis se registraron diariamente y se presentan como valores medios para los grupos I-V (A) y los grupos VI-IX (B). Se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con los controles, para el grupo IV (tratado con la formulación 4) en los días 3 y 4 después del tratamiento (n=6, \* p < 0,05). La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 7.** Pesos corporales medios (g) de modelos de EM de rata con EAE inducida. Se registró el peso corporal de todos los animales durante todos los periodos de estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento (total 35 días). Se separaron 54 ratas DA con EAE inducida equitativamente en 9 grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos corporales de las ratas tratadas con formulaciones de péptido MBP y los grupos de control. La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 8.** Tinción con hematoxilina y eosina (HyE) de médula espinal de modelos de EM de rata con EAE. Imágenes a 10x y 40x de aumento de médula espinal aislada de ratas con EAE inducida tratadas con: (A) (rata 35; grupo II), (rata 53; grupo IV), (rata 69; grupo IX); (B) (rata 71; grupo VIII), (rata 77; grupo III), (rata 79; grupo V); y (C) (rata 81; grupo I), (rata 95; grupo VII), (rata 2003; grupo VI).

**Figura 9.** Diseño experimental. Configuración experimental, incluyendo las identidades de los péptidos, el contenido liposómico y la dosificación para todas las formulaciones experimentales ensayadas en los ejemplos 12, 13 y 14. MBP1 (SEQ ID NO: 1); MBP1FL (SEQ ID NO: 9); MBP1FR (SEQ ID NO: 10); MBP2 (SEQ ID NO: 2); MBP3 (SEQ ID NO: 3).

**Figura 10.** Puntuación media de parálisis para modelos de EM de rata con EAE inducida. Se asignó una puntuación de parálisis diariamente a cada rata durante los periodos del estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento (total 36 días). Se separaron 54 ratas DA con EAE inducida en 10 grupos. Los grupos I-VIII se trataron con las formulaciones MBP F 1-8, el grupo IX se trató con copaxona (grupo de control positivo), al grupo X se le administró una inyección de agua (grupo de control negativo). Se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con los controles, para los grupos III y IV (tratados con una dosis de 200 mg) en los días 2 y 3 después del tratamiento (n=5, \* p < 0,05). La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 11.** Pesos corporales medios (g) de modelos de EM de rata con EAE inducida. Se registró el peso corporal de todos los animales durante todos los periodos de estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento (total 36 días). Se separaron 54 ratas DA con EAE inducida equitativamente en 10 grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos corporales de las ratas tratadas con formulaciones de péptido MBP y los grupos de control. La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 12.** Puntuación media de parálisis para modelos de EM de rata con EAE inducida. Se asignó una puntuación de parálisis diariamente a cada rata durante los periodos del estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento. Se separaron 42 ratas DA con EAE inducida en 7 grupos. Los grupos II-V se trataron con las formulaciones MBP F I-IV, los grupos VI y VII se trataron con copaxona (150 µg y 450 µg, respectivamente; grupos de control positivos), y al grupo I se le administró una inyección de agua (grupo de control negativo). Se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con el control negativo, para: grupo II (tratado con formulación liposómica de MBP1; relación 1:330 de péptido a lípido) en los días 1-4 después del tratamiento (n=6, \*p < 0,005); grupo III (tratado con formulación liposómica de MBP1/2/3; relación 1:330 de péptido a lípido) en el día 1 después del tratamiento (n=6, \*p < 0,05); y grupo V (tratado con formulación liposómica de MBP1/2/3; relación 1:110 de péptido a lípido) en los días 1-3 después del tratamiento (n=6, \* p < 0,05). La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 13.** Pesos corporales medios (g) de modelos de EM de rata con EAE inducida. Se registró el peso corporal de todos los animales durante todos los periodos de estudio: aclimatación, inducción de EAE, tratamiento y postratamiento. Se separaron 42 ratas DA con EAE inducida equitativamente en 7 grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos corporales de las ratas tratadas con formulaciones de péptido MBP y los grupos de control. La desviación típica se indica con barras de error.

**Figura 14.** Alineación de secuencia de 7 isoformas de corte y empalme de MBP. UniProt ID N.º: P02686 (SEQ ID NO: 13); P02686-2 (SEQ ID NO: 14); P02686-3 (SEQ ID NO: 15); P02686-4 (SEQ ID NO: 16); P02686-5 (SEQ ID NO: 17); P02686-6 (SEQ ID NO: 18); y P02686-7 (SEQ ID NO: 19).

## **Descripción detallada de la invención**

### **I. Introducción**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa grave que tiene un fondo autoinmunitario. Aunque se conocen varios tratamientos para controlar la esclerosis múltiple, no existe una cura para la enfermedad. Además, los tratamientos actuales tienen eficacia limitada y pueden provocar efectos secundarios indeseados. Por consiguiente, el desarrollo de estrategias novedosas para el tratamiento de EM es de gran importancia. Se informa aquí de composiciones y uso de epítomos de linfocitos B de la proteína básica de mielina (MBP) encapsulados en liposomas manosilados unilaminares pequeños (SUV) como un fármaco eficaz para el tratamiento de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratas DA, un modelo aceptado en la técnica para EM humana.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones terapéuticas de péptidos MBP antigénicos ligados a un vector, que son útiles para el tratamiento de esclerosis múltiple. En una realización específica, las composiciones terapéuticas comprenden uno, dos o tres péptidos MBP antigénicos ligados a un vector (por ejemplo, un liposoma) que comprende opcionalmente un resto de dirección (por ejemplo, un lípido manosilado). Cuando se administran a un paciente con esclerosis múltiple, las composiciones terapéuticas mejoran las capacidades cognitivas y alivian los síntomas de la parálisis. Por consiguiente, la presente invención también proporciona procedimientos para el tratamiento, control y profilaxis de la esclerosis múltiple en un sujeto que lo necesite.

Usando una colección de epítomos de la proteína básica de mielina, se analizó el patrón de unión de anticuerpos de suero (autoAb) de pacientes con EM recidivante-remite y se compararon con autoAb anti-MBP de ratones Swiss James Lambert (SJL), ratones C57 black 6 (C57BL/6) y ratas Dark Agouti (DA) con EAE. Se descubrió que las ratas DA con EAE eran los modelos de roedor con EM más relevantes basándose en los espectros de autoAb contra fragmentos de MBP. Se usaron tres fragmentos inmunodominantes de MBP encapsulados en liposomas SUV manosilados para el tratamiento de EAE en ratas DA. MBP(46-62) fue el más eficaz en disminuir la puntuación de enfermedad máxima durante el primer ataque, mientras que MBP(124-139) y MBP(147-170) evitaron el desarrollo de una fase de exacerbación. La administración de una mezcla de péptidos MBP inmunodominantes atrapados en liposomas mejora significativamente EAE prolongada por regulación por disminución de las citocinas Th1 y la inducción de la producción de BDNF en el SNC. Los efectos sinérgicos de los péptidos MBP disminuyen el curso global de la enfermedad con un primer ataque moderado y un rápido resultado desde la exacerbación, lo que sugiere una modalidad terapéutica novedosa para el tratamiento de EM.

### **II. Definiciones**

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una estructura molecular que puede asociarse con una carga (por ejemplo, moléculas pequeñas terapéuticas o de diagnóstico, péptidos, ácidos nucleicos y agentes biológicos proteínicos). En una realización, un vector es una estructura molecular que alberga o guía una carga terapéutica (por ejemplo, un péptido MBP) administrada a un sujeto que lo necesite. Un vector puede, pero no necesariamente: mejorar un efecto terapéutico conferido por la carga; mejorar o dirigir el suministro de la carga a una ubicación *in vivo* o tipo celular; mejorar la captación de la carga en las células o células particulares *in vitro* o *in vivo*; aumentar la semivida *in vivo* de la carga; proteger la carga de interacciones *in vivo* indeseadas; o reducir la tasa de eliminación de la carga del torrente sanguíneo y/o del organismo de un sujeto. En una realización, el vector comprende una nanopartícula, como se define a continuación, que puede encapsular, integrar, fijar a la carga.

Opcionalmente, el vector, por ejemplo, el vehículo de nanopartícula, puede comprender además un resto de dirección. En otra realización, el vector es un resto de dirección que está ligado directamente (covalente o no covalentemente) a la carga. Los ejemplos no limitantes de vectores incluyen: nanopartículas, tales como liposomas, micelas, micelas de copolímero de bloque, polimerosomas, niosomas, nanoburbujas recubiertas con lípido y dendrímeros; vehículos sólidos, tales como partículas metálicas y partículas de sílice; restos de azúcar, tales como manosa, un derivado de manosa, un análogo de manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa, derivados de manosa o análogo de manosa; péptidos, tales como un ligando de receptor celular; polipéptidos, tales como un anticuerpo o fragmento funcional del mismo; y ácidos nucleicos, tales como un aptámero o Spiegelmer®.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de dirección" se refiere a un agente que mejora la eficacia de una carga terapéutica o de diagnóstico cuando está asociado con la carga, en comparación con la eficacia de la carga en solitario. En una realización, un resto de dirección mejora el suministro de la carga asociada a una ubicación *in vivo* o tipo celular; y/o mejora la captación de la carga en una célula o ubicación *in vivo*. El resto de dirección puede estar ligado covalente o no covalentemente a la carga (por ejemplo, un péptido MBP), incluyendo mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacción electrostática, interacción hidrófoba o atrapamiento físico. En determinadas realizaciones, la unión puede estar mediada mediante un conector u otra estructura de vector. Los ejemplos de restos de dirección incluyen un resto de azúcar (por ejemplo, manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa), un péptido (por ejemplo, un ligando de receptor celular), un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo) y un ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®).

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector que comprende un resto de dirección" se refiere a una estructura molecular que mejora el suministro de una carga a una célula y/o mejora la captación de la carga en la célula. En una realización, el vector comprende un resto de dirección que está ligado covalente o no covalentemente a un vehículo de nanopartícula que puede transportar una carga (por ejemplo, un péptido MBP u otro agente terapéutico). Opcionalmente, el vector que comprende un resto de dirección incluye un vehículo de nanopartícula que puede albergar la carga. En otra realización, un vector que comprende un resto de dirección que consiste en un resto de dirección que está ligado directamente, de forma covalente o no covalente, a una carga (por ejemplo, un péptido MBP u otro agente terapéutico). En una realización específica, un vector que comprende un resto de dirección es el resto de dirección.

Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a un vector con un diámetro promedio de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm, que está ligado a la carga, por ejemplo, un péptido (por ejemplo, un péptido MBP), ácido nucleico, resto terapéutico o resto de diagnóstico. Las nanopartículas pueden ser huecas (por ejemplo, teniendo una cubierta exterior y un núcleo poco profundo), sólidas o multiestratificadas. La carga (por ejemplo, un péptido MBP) puede estar inmovilizada por, integrada en o encapsulada por la nanopartícula. Se conocen muchas nanopartículas en la técnica (véase, por ejemplo, Elizondo y col., *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011; 104:1-52) e incluyen un liposoma, una micela, una micela de copolímero de bloque (revisado en Kataoka y col., *Adv Drug Deliv Rev.* 23 de marzo de 2001;47(1):113-31), un polimerosoma (revisado en Christian y col., *Eur J Pharm Biopharm.* marzo de 2009; 71(3):463-74), un niosoma (revisado en Kazi y col., *J Adv Pharm Technol Res.* octubre de 2010; 1(4):374-80), una nanoburbuja recubierta con lípido (Unger y col., *Adv Drug Deliv Rev.* 7 de mayo de 2004;56(9):1291-314), un dendrímero, una partícula metálica (por ejemplo, una partícula de óxido de hierro o partícula de oro) y una partícula de sílice.

En una realización, una nanopartícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm. En otra realización, una nanopartícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 nm. En otra realización, una nanopartícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nm. En otra realización, una nanopartícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 75 nm a aproximadamente 300 nm. En otra realización más, una nanopartícula tiene un diámetro promedio de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm. En determinadas realizaciones, los liposomas pueden incluir lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, lípidos zwitteriónicos, lípidos neutros o combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" se refiere a cualquier estructura encerrada por una bicapa lipídica (es decir, lámina). El término liposoma abarca liposomas de vesícula multilaminar (MLV) que varían de tamaño de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , liposomas de vesícula unilaminar pequeña (SUV) que varían de tamaño de aproximadamente 0,02  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 0,05  $\mu\text{m}$ , y liposomas de vesícula unilaminar grande que varían de tamaño de aproximadamente 0,06  $\mu\text{m}$  y hasta. Como se usa en el presente documento, el término "multilaminar" se refiere a una estructura lipídica que contiene más de dos capas lipídicas. Por consiguiente, el término "unilaminar" se refiere a una estructura lipídica que contiene dos capas lipídicas, es decir, una única bicapa lipídica. En general, cuando está presente en un entorno acuoso, la parte hidrófila (por ejemplo, grupo de cabeza polar del lípido) de la mayoría de los lípidos que comprende una bicapa lipídica estarán ubicados en la superficie de la estructura (es decir, la cara exterior o interior de la bicapa y las partes hidrófobas (por ejemplo, grupos hidrocarburo saturados o insaturados) de la mayoría de los lípidos que comprende una bicapa lipídica estarán ubicados en el interior de la bicapa.

Como se usa en el presente documento, el término "micela" se refiere a cualquier estructura encerrada por una monocapa lipídica. En general, cuando está presente en un entorno acuoso, la parte hidrófila (por ejemplo, grupo de cabeza polar del lípido) de la mayoría de los lípidos que comprende una micela estarán ubicados en la superficie de la estructura y las partes hidrófobas (por ejemplo, grupos hidrocarburo saturados o insaturados) de la mayoría de los lípidos que comprende una micela estarán ubicados en el interior de la estructura. En determinadas realizaciones, un liposoma puede encapsularse dentro de una micela más grande. Asimismo, en determinadas realizaciones, una micela puede encapsularse dentro de un liposoma más grande.

Como se usa en el presente documento, la expresión "liposoma manosilado" se refiere a un liposoma que comprende uno o más residuos de manosa, derivado de manosa o análogo de manosa, asociado con el exterior de la bicapa lipídica. En una realización, un liposoma manosilado comprende un lípido conjugado con uno o más residuos de manosa, derivados o análogos. En una realización específica, el residuo de manosa, derivado o análogo se conjugará con un grupo de cabeza polar u otra estructura lipídica ubicada generalmente en el lado externo de una bicapa lipídica presente en un entorno acuoso (por ejemplo, la superficie externa y/o interna de un liposoma). Preferentemente, al menos un porcentaje de los residuos de manosa, derivados o análogos conjugados con un liposoma manosilado estarán expuestos a un entorno externo del liposoma y, por tanto, serán accesibles para interactuar con, por ejemplo, células inmunitarias. En una realización, un liposoma manosilado comprende un lípido monomanosilado. En una realización específica, el lípido monomanosilado es lípido ManDOG (véase, Ponpipom, M. M. y col., J. Med. Chem. 1981, 24, 1388; y Espuelas y col., Bioorg Med Chem Lett. 4 de agosto de 2003;13(15):2557-60). La estructura de un lípido ManDOG se proporciona en la figura 3. En otra realización, un liposoma manosilado comprende un lípido de tetramanosil-3-L-lisina-dioleoil glicerol (Espuelas y col., *supra*). Ejemplos no limitantes de derivados y análogos de manosa incluyen 1-deoximanojirimicina, metil-a-D-manopiranosido, 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), 2-desoxi-2-fluoro-manosa (2-FM) y 2-desoxi-2-cloro-manosa (2-CM), cualquiera de los cuales pueden conjugarse con un lípido.

En determinadas realizaciones, al menos un 0,01 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otra realización, al menos un 0,1 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otra realización, al menos un 1 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otras realizaciones más, al menos un 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa.

Como se usa en el presente documento, el término "lípido" se refiere a moléculas hidrófobas o anfífilas que pueden formar estructuras de monocapa o bicapa en un entorno acuoso, por ejemplo, una micela o liposoma. Los lípidos incluyen grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos. Los lípidos usados para formar nanopartículas, tales como liposomas y micelas, pueden modificarse o conjugarse adicionalmente a un resto de dirección. Ejemplos no limitantes de restos de dirección que pueden conjugarse a los lípidos incluyen: restos de azúcar (por ejemplo, manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa), péptidos (por ejemplo, un ligando de receptor celular), polipéptidos (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo) y ácidos nucleicos (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®).

Como se usa en el presente documento, el término "colesterol" se refiere a un alcohol esteroideo (esterol) de origen natural que tiene cuatro anillos condensados, así como sus ésteres con ácidos grasos de cadena larga, y análogos de los mismos que retienen la capacidad de modular la fluidez de membrana. El colesterol y los ésteres de colesterol son componentes de las lipoproteínas plasmáticas y la membrana celular exterior de las células animales, y tienen la capacidad de modular la fluidez de membrana. Los análogos de colesterol que retienen la capacidad de modular la fluidez de membrana son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gimpl, G., y col., (1997) Biochemistry 36:10959-10974) e incluyen, por ejemplo, 5-colesteno, 5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona, 4-colesten-3-ona y 5-colesten-3-ona. El colesterol y los análogos de colesterol son componentes liposómicos comunes que pueden conferir fluidez adicional a una monocapa o bicapa lipídica que forma una micela o liposoma.

Como se usa en el presente documento, los términos "ligado" y "conjugado" se usan indistintamente y se refieren a una asociación covalente o no covalente entre dos restos, por ejemplo, entre un agente terapéutico y un vector o resto de dirección. Los enlaces formados entre los dos restos, aunque no son de naturaleza necesariamente covalente, ayudan a mantener la asociación entre los restos. Ejemplos no limitantes de enlaces que pueden usarse para asociar dos restos, por ejemplo, un péptido MBP y un resto de dirección, incluyen: interacciones covalentes (es decir, un enlace químico covalente formado directamente entre el primer resto y el segundo resto y mediante una molécula conectora); interacciones iónicas (por ejemplo, un enlace iónico formado directamente entre el primer resto y el segundo resto o mediante una molécula conectora); interacciones electrostáticas (por ejemplo, atracción de dos cargas opuestas); interacciones hidrófobas; interacciones mantenidas juntas mediante fuerzas de Van der Waals; e interacciones mantenidas juntas mediante atrapamiento físico (por ejemplo, encapsulación o inclusión de una molécula de carga dentro de una nanopartícula). En una realización, una molécula de carga (por ejemplo, un péptido MBP) encapsulada dentro de un vector (por ejemplo, un liposoma) está ligada a un resto de dirección (por ejemplo, un residuo de manosa) que se fija al exterior del vector.

Como se usa en el presente documento, la expresión "incluido dentro" se refiere a la ubicación de una molécula de carga con respecto a un vector, en que la molécula de carga está ubicada dentro de la matriz de la estructura de vector. Por ejemplo, una carga peptídica se dice que está incluida dentro de un vector liposómico o de micela cuando el péptido, o una parte del mismo, está ubicado dentro de una bicapa (liposoma) o monocapa (micela) lipídica. Las moléculas de carga incluidas dentro de un vector pueden estar asociadas covalente o no covalentemente con la matriz de vector (por ejemplo, una cubierta polimérica) o un subcomponente de la matriz de vector (por ejemplo, un lípido presente en una bicapa lipídica de un liposoma), por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacción electrostática, interacción hidrófoba o atrapamiento físico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "encapsulado en" se refiere a la ubicación de una molécula de carga con respecto a un vector, en que la molécula de carga está encerrada o contenida dentro del interior de una estructura de vector. Por ejemplo, se dice que una carga peptídica está encapsulada en un vector liposómico cuando el péptido está ubicado interno a una bicapa lipídica del liposoma, protegida de ese modo del entorno externo al liposoma. Las moléculas de carga encapsuladas en un vector pueden estar asociadas covalente o no covalentemente con el vector (por ejemplo, una cubierta polimérica) o un subcomponente de la matriz de vector (por ejemplo, un lípido presente en una bicapa lipídica de un liposoma), por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacción electrostática, interacción hidrófoba o atrapamiento físico.

En determinadas realizaciones, el interior de un vector liposómico o de micela comprenderá un entorno acuoso. Por consiguiente, una carga hidrófila, tal como un péptido o ácido nucleico, puede estar solvatada parcial o completamente dentro del interior del vector. En otras realizaciones, el interior de un vector liposómico o de micela puede comprender un entorno no acuoso, por ejemplo, puede consistir en un disolvente polar. Por consiguiente, una carga hidrófoba, tal como una molécula pequeña no polar, puede estar solvatada parcial o completamente dentro del interior del vector.

Como se usa en el presente documento, el término "fijarse a" se refiere a la ubicación de una molécula de carga con respecto a un vector, en que la molécula de carga está ligada a la estructura de vector en uno o más puntos. La fijación de una molécula de carga puede hacerse covalentemente (por ejemplo, mediante un enlace químico) o no covalentemente (por ejemplo, mediante hibridación de ácidos nucleicos). Las moléculas de carga pueden fijarse al exterior o interior de un vector (por ejemplo, una cubierta polimérica) o un subcomponente de la matriz de vector (por ejemplo, un lípido presente en una bicapa lipídica de un liposoma). Una molécula de carga fijada a una estructura de vector en un punto de adhesión, por lo demás, puede estar libre de moverse en el espacio (por ejemplo, por lo demás solvatada por el entorno externo o interno al vector). Las moléculas de carga fijadas a un vector pueden estar asociadas covalente o no covalentemente con el vector (por ejemplo, una cubierta polimérica) o un subcomponente de la matriz de vector (por ejemplo, un lípido presente en una bicapa lipídica de un liposoma), por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacción electrostática o interacción hidrofóbica.

Como se usa en el presente documento, los términos "aptámero", "SPIEGELMER®", y "ligando de ácido nucleico" se usan indistintamente y se refieren a un oligonucleótido que no es de origen natural (típicamente de 15 a 250 nucleótidos de longitud) que se une específicamente a una diana particular. Los aptámeros son ácidos nucleicos que comprenden una estructura secundaria específica que confiere especificidad por una molécula diana (por ejemplo, un marcador o receptor de superficie celular). Los aptámeros pueden comprender además una estructura terciaria y, posiblemente cuaternaria, específica que contribuye además a la afinidad entre el ácido nucleico y la molécula diana. Cuando está presente en una estructura tridimensional apropiada, un aptámero se une específicamente a una diana particular. Los aptámeros abarcan secuencias de ácidos nucleicos naturales (por ejemplo, dA, dT, dC, dG, rA, rU, rC y rG), así como ácidos nucleicos no naturales (por ejemplo, dU, dl, rT, rl) y ácidos nucleicos modificados. Los SPIEGELMER® son aptámeros formados con ácidos L-nucleicos, en lugar de los ácidos D-nucleicos de origen natural. Los aptámeros y los SPIEGELMER® pueden incluir una mezcla de ácidos L- y D-nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que es inmunológicamente reactivo con un antígeno particular. El término "inmunoglobulina", como se usa en el presente documento, abarca moléculas intactas de diversos isotipos, así como fragmentos con capacidad de unión a antígeno, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. Véase, por ejemplo, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3.<sup>a</sup> Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también abarca fragmentos de Fv monocatenarios (scFv) recombinantes. El término abarca además moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y biespecíficas en, por ejemplo, Kostelny y col., (1992) J. Immunol. 148:1547; Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579; Hollinger y col., 1993, Proc Natl Acad Sci USA. 15 de julio de 1993;90(14):6444-8; Gruber y col., (1994) J. Immunol. 5368; Zhu y col., (1997) Protein Sci 6:781; Hu y col., (1996) Cancer Res. 56:3055. El término anticuerpo también abarca, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en que (a) la región constante, o una parte de la misma, está alterada, remplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco y similares; o (b) la región variable, o una parte de la misma, está alterada, remplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales Fv de la inmunoglobulina humana están reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o estructurales importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales (FR) son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)). La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-327 (1988); y Verhoeyen y col., Science 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4 816 567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a una molécula (por ejemplo, un resto de dirección) que se une a una diana particular (por ejemplo, un marcador o receptor de superficie celular) con una afinidad al menos 2 veces mayor, en comparación con una molécula no dirigida. En determinadas realizaciones, una molécula se une específicamente con una afinidad al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 5000 veces, 10 000 veces o mayor, en comparación con una molécula no dirigida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células inmunitarias" se refiere a células que son de origen hematopoyético y que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T; linfocitos citotóxicos naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "linfocito B" se refiere a un linfocito producido en la médula ósea de la mayoría de mamíferos, que funciona en el sistema inmunitario humoral. Durante las diversas fases de desarrollo, los linfocitos B se mencionan como: linfocitos B progenitores (o pre-pro); prolinfocitos B tempranos (o pre-pre); prolinfocitos B tardíos (o pre-pre); prelinfocitos B grandes; prelinfocitos B pequeños; linfocitos B inmaduros; y linfocitos B maduros, cada uno de los cuales está abarcado por la expresión linfocito B. Los marcadores fenotípicos de superficie celular que pueden usarse para diferenciar los linfocitos B de otros linfocitos (por ejemplo, linfocitos T) incluyen: moléculas MHC de clase II, CD19 y CD21. La expresión "linfocitos B" abarca linfocitos B plasmáticos, linfocitos B de memoria, linfocitos B-1, linfocitos B-2, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B foliculares.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula presentadora de antígeno" y "APC" se usan indistintamente y se refieren a células presentadoras de antígeno especializadas (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "marcador de superficie celular", "receptor de superficie celular", y "moléculas de superficie celular" se refieren a una estructura antigénica presente en la superficie de una célula. El antígeno de superficie celular puede ser un antígeno específico de célula, un antígeno específico de célula inmunitaria, un antígeno específico de linfocito B, un antígeno que presenta antígeno específico de célula, un antígeno específico de linfocito, un antígeno asociado con esclerosis múltiple, un receptor (por ejemplo, un receptor del factor de crecimiento), un epítipo superficial, un antígeno que se reconoce por una célula efectora inmunológica específica tal como un linfocito T, y un antígeno que se reconoce por una célula efectora inmunológica no específica tal como una célula macrófago o un linfocito citotóxico natural. Los ejemplos de "antígenos de superficie celular" incluyen marcadores fenotípicos de: células NK (por ejemplo, CD16 y CD56); linfocitos T auxiliares (por ejemplo, TCR $\alpha\beta$ , CD3 y CD4); linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, TCR $\alpha\beta$ , CD3 y CD8); linfocitos T  $\gamma\delta$  (por ejemplo, TCR $\gamma\delta$  y CD3); y linfocitos B (MHC de clase II, CD 19 y CD21). Las moléculas de superficie celular también pueden incluir carbohidratos, proteínas, lipoproteínas, glucoproteínas o cualquier otra molécula presente en la superficie de una célula de interés.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "proteína básica de mielina" y "MBP" se usan indistintamente y se refieren a una proteína codificada por un gen de proteína básica de mielina humana (MBP; ID de gen de NCBI: 4155). *In vivo*, surgen múltiples isoformas de la proteína MBP por corte y empalme alternativo (para una revisión, véase, Harauz y col., Biochemistry, 1 de septiembre (2009);48(34):8094-104), cada una de las cuales está abarcada por la expresión "proteína básica de mielina". Se proporciona una alineación de siete secuencias de MBP representativas en la figura 14. Como se usa en el presente documento, la numeración de aminoácidos de

péptidos MBP se refiere a la secuencia de aminoácidos de la isoforma predominante de MBP encontrada en la mielina madura (isoforma de corte y empalme 5; ID de UniProt n.º: P02686-5), una proteína de 18,5 kDa que consiste en 171 aminoácidos (SEQ ID NO: 17).

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones "esclerosis múltiple," y "EM" se usan indistintamente y se refieren a una enfermedad inflamatoria en que las vainas grasas de mielina alrededor de los axones del cerebro y la médula espinal están dañadas y/o reducidas, dando lugar a desmielinización y formación de cicatrices, así como una amplio espectro de signos y síntomas (para una revisión, véase, Compston y Coles, Lancet. 25 de octubre de 2008;372(9648): 1502-17). Se han clasificado varios subtipos de EM, incluyendo recidivante remitente (RRMS), secundaria progresiva (SPMS), primaria progresiva, (PPMS) y progresiva recidivante (PRMS), cada una de las  
10 cuales está abarcada por la expresión esclerosis múltiple.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente y se refieren a un individuo que necesita o busca tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede haberse diagnosticado con o en riesgo de desarrollar esclerosis múltiple (EM) o un subtipo de la misma. Un paciente con esclerosis múltiple puede referirse a un individuo que se ha diagnosticado con EM y está recibiendo tratamiento para EM, ha recibido previamente  
15 tratamiento para EM o nunca ha recibido tratamiento para EM, un individuo que está en riesgo de recaer de EM, o un individuo en riesgo de EM (por ejemplo, un individuo que está genéticamente predispuesto a EM).

Como se usa en el presente documento, los términos "terapia" "tratamiento" de esclerosis múltiple se usan indistintamente y se refieren a cualquier paliación o mejora de una afección fisiológica o psicológica indeseable resultante de EM. Por ejemplo, la reducción en la gravedad o frecuencia de: hipoestesia; parestesia; debilidad muscular; clono; espasmos musculares; parálisis; ataxia; disartria; disfagia; nistagmo; neuritis óptica (por ejemplo, fosfenos o diplopía); fatiga; dolor agudo o crónico; dificultades de la vejiga e intestino; alteración cognitiva; depresión; fenómeno de Uhthoff; y signo de Lhermitte. En una realización, puede usarse la escala del estado de discapacidad ampliada (EDSS) como una medida de la progresión de la enfermedad y la gravedad en los pacientes con EM (véase, Kurtzke JF, Neurology 1983;33:1444-52). Por consiguiente, en una realización, tratamiento se refiere a un  
20 acto de mejorar la EDSS de un paciente.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "prevención," y "tratamiento profiláctico" de la esclerosis múltiple se usan indistintamente y se refieren a tratamientos terapéuticos que reducen el riesgo, la gravedad o aparición de síntomas clínicos de EM. La profilaxis puede ser parcial o completa. La profilaxis parcial puede provocar la aparición retardada o progresión retardada de un estado patológico o síntoma en un paciente en riesgo de desarrollar EM o incurrir en recidiva de EM. Aunque no se ha identificado un componente genético causante estricto de EM, se han identificado varios factores genéticos correlacionados con un riesgo aumentado de desarrollar esclerosis múltiple, incluyendo los SNP identificados en Hafler DA y col., (N Engl J Med. 30 de agosto de 2007;357(9):851-62) tales como rs3135388 (alelo A; gen HLA-DRA), rs12722489 (alelo C; gen IL2RA), rs2104286 (alelo T; gen IL2RA), rs6897932 (alelo C; gen IL7R), rs6498169 (alelo G; KIAA0350), rs6604026 (alelo C; RPL5),  
30 rs10984447 (alelo A; gen DBC1), rs12044852 (alelo C; gen CD58), rs7577363 (alelo A; gen ALK), rs7536563 (alelo A; gen FAM69A), rs11164838 (alelo C; gen FAM69A), rs10975200 (alelo G; gen ANKRD15), rs10735781 (alelo G; gen EVI5), rs6680578 (alelo T; gen EVI5), rs4763655 (alelo A; gen KLRB1), rs12487066 (alelo T; gen CBLB) y rs1321172 (alelo C; gen PDE4B).

Como se usa en el presente documento, los términos "dosis", y "dosificación" se usan indistintamente y se refieren a la cantidad de un principio activo administrado en un único punto temporal. En el contexto de la presente invención, una dosis puede referirse a la cantidad de un péptido MBP administrada a un sujeto. Una dosificación también puede referirse a la cantidad de una preparación de vector de un péptido MBP administrada a un sujeto, por ejemplo, una preparación liposómica de uno o una combinación de péptidos MBP. La dosificación administrada a un paciente variará dependiendo de varios factores, incluyendo: frecuencia de administración; gravedad de la afección (por ejemplo, esclerosis múltiple); subtipo de la afección (por ejemplo, EM recidivante remitente, EM secundaria progresiva, EM primaria progresiva y EM progresiva recidivante); fase de la afección (por ejemplo, ataque inicial, recidiva y remisión); tamaño y tolerancia del sujeto; vía de administración empleada; riesgo de efectos secundarios; riesgo de interacciones adversas de fármacos; y respuesta a tratamientos previos, cada uno de los cuales puede determinarse fácilmente por un médico experto. La expresión "forma de dosificación" se refiere al formato particular del agente farmacéutico, por ejemplo, una formulación líquida para administración subcutánea o formulación de gel para liberación controlada mediante un depósito.  
40  
45  
50

Como se usa en el presente documento, la expresión "dosis terapéuticamente eficaz", y "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente y se refieren a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y se podrá averiguar por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Augsburg y Hoag, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 3.ª Ed. 2008); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (3.ª Ed., 2008); Pickar, Dosage Calculations (8.ª Ed., 2007); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.ª Ed., 2005, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).  
55

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una formulación adecuada para su administración a un sujeto, que contiene un agente terapéutico y opcionalmente uno o más de los  
60

siguientes: un vector; un resto de dirección; un agente tamponante; un sal; un agente de conservación (por ejemplo, un antioxidante o agente antimicrobiano); un agente osmótico; un agente espesante; y cualquier otro excipiente o vehículo adecuado para el suministro del agente terapéutico mediante una vía particular de administración.

5 Como se usa en el presente documento, el término "control" se refiere a una muestra, nivel o resultado fenotípico que sirve como referencia para la comparación con un resultado de ensayo, por ejemplo, un beneficio terapéutico conseguido por un tratamiento particular. El término control abarca tanto controles positivos (por ejemplo, un valor o resultado que se espera para un tratamiento dado) y controles negativos (por ejemplo, un valor o resultado que se esperaría en ausencia de tratamiento).

10 Un control positivo puede referirse a un resultado conseguido por la administración de un agente terapéutico que se sabe que proporciona un efecto beneficioso para un estado patológico o síntoma. Por ejemplo, el resultado conseguido por la administración de copaxona a un sujeto diagnosticado con EM, o un modelo animal de EM, puede usarse como control positivo para un tratamiento experimental de EM. En este sentido, un tratamiento experimental que provoca un resultado similar o mejor, en comparación con un resultado conseguido con la administración de copaxona, se consideraría un buen candidato para el tratamiento de EM.

15 Un control negativo puede referirse a un resultado conseguido en ausencia de tratamiento para un estado patológico o síntoma. Por ejemplo, la administración de agua o vector vacío a un sujeto diagnosticado con EM, o un modelo animal de EM, puede usarse como control negativo para un tratamiento experimental de EM. En este sentido, un tratamiento experimental que produce un resultado similar al conseguido con un control negativo no se consideraría un buen candidato para el tratamiento de EM. Aunque un tratamiento experimental que produzca un mejor resultado, en comparación con el resultado conseguido con el control negativo, se consideraría un buen candidato para el tratamiento de EM.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma mono catenaria o bicatenaria y, salvo que se indique específicamente de otro modo, abarca polinucleótidos que contienen análogos conocidos de nucleótidos de origen natural que pueden funcionar de una manera similar que los nucleótidos de origen natural. Se entenderá que cuando una molécula de ácido nucleico está representada por una molécula de ADN, esta también incluye moléculas de ARN que tienen la secuencia de ARN correspondiente en que "U" (uridina) reemplaza "T" (timidina).

30 Como se usa en el presente documento, los términos "proteína", "péptido", y "polipéptido" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de cuatro o más residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más residuos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. La expresión "péptido recombinante" se refiere a un péptido que se produce por la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido a partir de una molécula de ADN recombinante.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido sintético" se refiere a un péptido que se produce por medios químicos, por ejemplo, por síntesis de péptidos en fase líquida o en fase sólida. Los péptidos sintéticos incluyen polímeros de aminoácidos en que uno o más residuos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

40 Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y no naturales, incluyendo análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural incluyen aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, 5-hidroxitriptófano, lantionina. Los aminoácidos de origen natural pueden incluir, por ejemplo, D- y L-aminoácidos. Los aminoácidos usados en el presente documento también pueden incluir aminoácidos no naturales. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, cualquier carbono que esté unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina o metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácido se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos pueden mencionarse en el presente documento por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB.

55 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico o peptídica que altere, añada o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" en la que la alteración provoca una sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente

equivalentes son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son adicionales y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M). Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984).

Como se usa en el presente documento, los términos "idéntico" e "identidad" cuando se usan en referencia a dos o más secuencias polinucleotídicas o dos o más secuencias polipeptídicas, se refieren a los residuos en las secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se usa en referencia a un péptido, se reconoce que una o más posiciones de residuos que por lo demás son idénticas pueden diferir en una sustitución de aminoácido conservativa, en que un primer residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas similares tal como una carga similar, o carácter hidrófobo o hidrófilo y, por lo tanto, no cambia sustancialmente las propiedades funcionales del péptido. Cuando las secuencias peptídicas difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse a la alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Dicho ajuste puede hacerse usando procedimientos bien conocidos, por ejemplo, puntuando una sustitución conservativa como un emparejamiento incorrecto parcial en lugar de completo, aumentado de ese modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de sustituciones conservativas puede calcularse usando cualquier algoritmo bien conocido (véase, por ejemplo, Meyers y Miller, *Comp. Appl. Biol. Sci.* 4:11-17, 1988; Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:2444 (1988); Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-244, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989; Corpet y col., *Nucl. Acids Res.* 16:10881-10890, 1988; Huang, y col., *Comp. Appl. Biol. Sci.* 8:155-165, 1992; Pearson y col., *Meth. Mol. Biol.*, 24:307-331, 1994). La alineación también puede realizarse por inspección visual simple y alineación manual de las secuencias.

Se reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteren, añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (por ejemplo, menos de un 15 %, menos de un 10 % o menos de un 5 %) e una secuencia peptídica pueden considerarse variaciones modificadas de forma conservativa, con la condición de que las alteraciones provoquen la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

Las sustituciones de aminoácido conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dependiendo de la funcionalidad del aminoácido particular, es decir, catalíticamente importante, estructuralmente importante, estéricamente importante, diferentes agrupaciones de aminoácidos pueden considerarse sustituciones conservativas entre sí. La tabla 1 proporciona agrupaciones de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas basándose en la carga y polaridad del aminoácido, la hidrofobia del aminoácido, la exposición superficial/naturaleza estructural del aminoácido y la propensión de la estructura secundaria del aminoácido.

**Tabla 1.** Agrupaciones de sustituciones de aminoácido conservativas basándose en la funcionalidad del residuo en la proteína.

Característica importante	Agrupaciones conservativas
Carga/polaridad	1. H, R y K 2. D y E 3. C, T, S, G, N, Q e Y 4. A, P, M, L, I, V, F y W
Hidrofobia	1. D, E, N, Q, R y K 2. C, S, T, P, G, H e Y 3. A, M, I, L, V, F y W
Exposición estructural/superficial	1. D, E, N, Q, H, R y K 2. C, S, T, P, A, G, W e Y 3. M, I, L, V y F
Propensión de estructura secundaria	1. A, E, Q, H, K, M, L y R 2. C, T, I, V, F, Y y W 3. S, G, P, D y N
Conservación evolutiva	1. D y E

(continuación)

Característica importante	Agrupaciones conservativas
	2. H, K y R
	3. N y Q
	4. S y T
	5. L, I y V
	6. F, Y y W
	7. A y G
	8. M y C

5 Dos o más secuencias de aminoácidos o dos o más secuencias de nucleótidos se consideran "sustancialmente idénticas" si las secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos comparten al menos un 60 % de identidad de secuencia entre sí, o con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación dada. Por tanto, las secuencias sustancialmente idénticas incluyen aquellas que tienen, por ejemplo, al menos un 60 % de identidad de secuencia, al menos un 65 % de identidad de secuencia, al menos un 70 % de identidad de secuencia, al menos un 75 % de homología de secuencia, al menos un 80 % de homología de secuencia, al menos un 85 % de identidad de secuencia, al menos un 90 % de identidad de secuencia, al menos un 95 % de identidad de secuencia o al menos un 99 % de identidad de secuencia. En determinadas realizaciones, las secuencias sustancialmente idénticas tendrán al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 10 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En una realización, las secuencias comparten de un 60 % a un 95 % de identidad de secuencia. En otra realización, las secuencias comparten de un 65 % a un 90 % de identidad de secuencia. En otra realización, las secuencias comparten de un 70 % a un 85 % de identidad de secuencia. En otras realizaciones más, las secuencias comparten de un 65 % a un 15 95 % de identidad de secuencia, de un 70 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 75 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 80 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 85 % a un 95 % de identidad de secuencia o de un 90 % a un 95 % de identidad de secuencia.

20 En determinadas realizaciones, dos polipéptidos se considerarán sustancialmente idénticos si comparten secuencias peptídicas centrales idénticas o casi idénticas que son eficaces para proporcionar beneficio terapéutico. Por ejemplo, cuando una primera secuencia peptídica central proporciona beneficio terapéutico independientemente de la presencia de aminoácidos adicionales ubicados en dirección 5' (es decir, extremo Na la secuencia central) o en dirección 3' (es decir, extremo C a la secuencia central), un polipéptido que comprende una segunda secuencia peptídica central que comparte al menos un 80 % de identidad con la primera secuencia peptídica central puede 25 considerarse sustancialmente idéntica. Esto es cierto incluso cuando la secuencia polipeptídica completa no comparte al menos un 80 % de identidad con la secuencia de referencia. Por ejemplo, dos polipéptidos terapéuticos que tienen las secuencias de aminoácidos:  $(R^1)_a-P_1-(R^2)_b$  y  $(R^3)_c-P_2-(R^4)_d$ , pueden considerarse sustancialmente idénticos si (i)  $P_1$  y  $P_2$  son al menos un 80 % idénticos, y (ii)  $P_1$  y  $P_2$  son suficientes para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto que lo necesita, independientemente de las secuencia de aminoácidos de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ .

30 En determinadas realizaciones, secuencias peptídicas centrales sustancialmente idénticas compartirán al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En una realización específica, las secuencias peptídicas 35 centrales compartirán al menos un 85 % de identidad de secuencia (es decir, de un 85 % a un 100 % de identidad). En otra realización específica, las secuencias peptídicas centrales compartirán al menos un 90 % de identidad de secuencia (es decir, de un 90 % a un 100 % de identidad). En otra realización específica, las secuencias peptídicas centrales compartirán al menos un 95 % de identidad de secuencia (es decir, de un 95 % a un 100 % de identidad). En otra realización específica más, las secuencias peptídicas centrales compartirán un 100 % de identidad de secuencia, independientemente de la identidad de secuencia global de dos polipéptidos que se comparan. En una 40 realización, las secuencias peptídicas centrales comparten de un 60 % a un 95 % de identidad de secuencia. En otra realización, las secuencias peptídicas centrales comparten de un 65 % a un 90 % de identidad de secuencia. En otra realización, las secuencias peptídicas centrales comparten de un 70 % a un 85 % de identidad de secuencia. En otras realizaciones más, las secuencias peptídicas centrales comparten de un 65 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 70 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 75 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 80 % a un 95 % de identidad de secuencia, de un 85 % a un 95 % de identidad de secuencia o de un 90 % a un 45 95 % de identidad de secuencia.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "ventana de comparación" se refiere a un tramo contiguo de aminoácidos o nucleótidos sobre la que se compara la secuencia de dos polipéptidos o polinucleótidos para la identidad o similitud de secuencia. Con respecto a péptidos terapéuticos, una ventana de comparación puede ser de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En una realización, una ventana de comparación puede ser de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En otra realización más, una ventana de comparación puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 20

aminoácidos de longitud. Dependiendo de los factores, tales como la longitud de los polipéptidos que se están comprando, la ventana de comparación puede ser, por ejemplo, de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos de longitud. En una realización particular, la ventana de comparación es la longitud completa de una secuencia de aminoácidos de referencia.

La alineación de secuencias puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y la mejor alineación (es decir, que produce el máximo porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos procedimientos seleccionados. El algoritmo BLAST es muy adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia (Altschul y col., J Mol. 215: 403-410, (1990)). Varios programas informáticos que incorporan el algoritmo BLAST están disponibles al público mediante el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estos programas incluyen los programas informáticos blastp, blastn, blastx, tblastn, tblastx y PSI-blast.

### III. Péptidos MBP

#### A. Introducción

En un aspecto, la presente invención proporciona péptidos de proteína básica de mielina (MBP) útiles para tratar o prevenir la recidiva de esclerosis múltiple (EM). Como se muestra en la figura 1C, se identificaron dos regiones inmunodominantes de MBP en un modelo de EM de rata DA con EAE inducida, que se correlaciona con la respuesta inmunológica a MBP en pacientes humanos diagnosticados con esclerosis múltiple recidivante-remitente (RRMS): MBP(43-64) y MBP(115-170). Se descubrió que se generaban autoanticuerpos IgG policlonales contra estas regiones en el modelo de rata DA con EAE inducida (figura 2), lo que sugiere que estas regiones contienen epítopos de linfocitos B importantes para la patología de EM. Por consiguiente, Los péptidos que comprenden parte o la totalidad de estas regiones pueden ser útiles para el tratamiento o la prevención de EM. En una realización específica, el péptido MBP comprende un epítipo de linfocitos B.

En un aspecto de la invención, se proporcionan péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente idénticas a las regiones inmunodominantes identificadas de MBP para el tratamiento de EM. En una realización específica, se proporcionan péptidos MBP que comprenden al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12) para el tratamiento de EM. En general, un péptido MBP consistirá en de 6 a 100 aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 50 aminoácidos de longitud. En otra realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 25 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones más, el péptido MBP consistirá en aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos. En una realización específica, un péptido MBP consiste en de 6 a 40 aminoácidos de longitud.

En una realización, un péptido MBP comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, un péptido MBP comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otras realizaciones, un péptido MBP comprende al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otras realizaciones más, un péptido MBP comprende al menos 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más aminoácidos consecutivos de MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En una realización, el péptido MBP está ligado a un vector, que incluye un resto de dirección. En una realización específica, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

En otro aspecto, un péptido MBP comprende de 6 a 25 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, un péptido MBP comprende de 10 a 20 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, un péptido MBP comprende de 6 a 40 o de 6 a 35 o de 6 a 30 o de 6 a 20 aminoácidos consecutivos de MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otras realizaciones más, un péptido MBP comprende de 6 a 20 o de 6 a 18 o de 6 a 16 o de 6 a 14 o de 6 a 12 o de 6 a 10 o de 6 a 8 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En una realización, el péptido MBP está ligado a un vector. En una realización específica, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

En una realización específica, el péptido MBP comprende la secuencia: GGDRGAPKRGSGKDSHH (MBP(46-62); SEQ ID NO: 1). En una realización, MBP(46-62) está ligado a un vector. En una realización específica, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

En otra realización específica, el péptido MBP comprende la secuencia: GFGYGGGRASDYKSAHK (MBP(124-139); SEQ ID NO: 2). En una realización, MBP(124-139) está ligado a un vector. En una realización específica, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

5 En otra realización específica, el péptido MBP comprende la secuencia: QGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR (MBP(147-170); SEQ ID NO: 3). En una realización, MBP(147-170) está ligado a un vector. En una realización específica, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

## B. Sustituciones de aminoácidos

10 Los péptidos MBP proporcionados en el presente documento pueden comprender además una o más sustituciones de aminoácidos respecto a la secuencia de MBP de tipo silvestre (SEQ ID NO: 17). En una realización, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácido conservativa. Por ejemplo, aminoácidos que tienen hidrofobia similar (por ejemplo, Leu e Ile) pueden sustituirse fácilmente entre sí. La tabla 1 proporciona agrupaciones de aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas basándose en la carga y polaridad del aminoácido, la hidrofobia del aminoácido, la exposición superficial/naturaleza estructural del aminoácido y la propensión de la estructura secundaria del aminoácido. En otra realización, la sustitución de aminoácidos no es una sustitución de aminoácidos conservativa.

15 En una realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica de al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica de al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica de al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica de al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En otras realizaciones más, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica de al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12).

20 En una realización específica, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % identidad de secuencia. con la SEQ ID NO: 1.

25 En una realización específica, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones más, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % identidad de secuencia. con la SEQ ID NO: 2.

30 En una realización específica, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones más, el péptido MBP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % identidad de secuencia. con la SEQ ID NO: 3.

### C. Regiones flanqueantes peptídicas

Las células presentadoras de antígeno (APC) tales como linfocitos  $\beta$ , células dendríticas y macrófagos estimulan una respuesta inmunitaria por internalización, procesamiento y presentación de antígenos exógenos (por ejemplo, en respuesta a una infección patogénica) o propios (por ejemplo, en una enfermedad autoinmunitaria) procesados para estimular diversos tipos de linfocitos T. Sin limitarse a teoría alguna, como las APC pueden internalizar y procesar antígenos grandes en péptidos antigénicos más pequeños reconocidos por la maquinaria de los linfocitos T, un péptido MBP, descrito en el presente documento conteniendo al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) o MBP(115-170), puede tener aminoácidos adicionales en el extremo N o C, es decir, residuos flanqueantes.

Los residuos flanqueantes de MBP pueden incluir regiones flanqueantes naturales presentes en la proteína MBP de tipo silvestre (por ejemplo, aminoácidos en el extremo N para los residuos 43 y 115 de MBP y/o aminoácidos en el extremo C para los residuos 64 y 170 de MBP) o, como alternativa, pueden comprender una secuencia exógena o aleatoria. En una realización, los residuos flanqueantes del extremo N y/o C pueden conferir una propiedad beneficiosa al péptido MBP. Por ejemplo, los residuos de aminoácido flanqueantes pueden: estabilizar el péptido; dirigir el péptido a una ubicación intracelular o extracelular específica; mejorar las propiedades de carga del vector del péptido; o mejorar o dirigir el procesamiento o la presentación del antígeno en una célula inmunitaria (por ejemplo, un linfocito B o APC).

En una realización, un péptido MBP comprende además de 1 a 50 aminoácidos adicionales en el extremo N o extremo C del péptido. En otra realización, el péptido MBP comprende además de 1 a 25 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, el péptido MBP comprende además de 1 a 10 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otras realizaciones más, el péptido MBP comprende además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido.

En una realización específica, un péptido MBP que contiene la secuencia: GGDRGAPKRGSGKDSHH (MBP(46-62); SEQ ID NO: 1) comprende además de 1 a 50 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(46-62) comprende además de 1 a 25 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(46-62) comprende además de 1 a 10 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otras realizaciones más, un péptido MBP(46-62) comprende además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido.

En una realización específica, un péptido MBP que contiene la secuencia: GFGYGGRASDYKSAHK (MBP(124-139); SEQ ID NO: 2) comprende además de 1 a 50 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(124-139) comprende además de 1 a 25 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(124-139) comprende además de 1 a 10 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otras realizaciones más, un péptido MBP(124-139) comprende además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido.

En una realización específica, un péptido MBP que contiene la secuencia: QGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR (MBP(147-170); SEQ ID NO: 3) comprende además de 1 a 50 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(147-170) comprende además de 1 a 25 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otra realización, un péptido MBP(147-170) comprende además de 1 a 10 aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido. En otras realizaciones más, un péptido MBP(147-170) comprende además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C del péptido.

Un péptido MBP proporcionado en el presente documento puede describirse en términos de una secuencia peptídica central ( $P_x$ ), una secuencia flanqueante en el extremo N opcional ( $R^n$ ) y una secuencia flanqueante en el extremo C opcional ( $R^c$ ). En determinadas realizaciones, el número total de aminoácidos en las partes  $P_x$ ,  $R^n$  y  $R^c$  de un péptido MBP es de menos de 250. En otra realización, el número total de aminoácidos es de menos de 100. En otra realización, el número total de aminoácidos es de menos de 50. En otras realizaciones más, el número total de aminoácidos es de menos de 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 o 7. En una realización, el número total de aminoácidos es de 6 a 250. En otra realización, el número total de aminoácidos es de 6 a 100. En otra realización, el número total de aminoácidos es de 6 a 50. En otras realizaciones más, el número total de aminoácidos es de 10 a 250, de 10 a 100, de 10 a 50, de 15 a 250, de 15 a 200, de 15 a 175, de 15 a 150, de 15 a 125, de 15 a 100, de 15 a 90, de 15 a 80, de 15 a 75, de 15 a 70, de 15 a 65, de 15 a 60, de 15 a 55, de 15 a 50, de 15 a 45, de 15 a 40, de 15 a 35, de 15 a 30, de 15 a 25 o de 15 a 20.

En una realización, la secuencia peptídica central ( $P_x$ ) tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) o MBP(115-170), preferentemente al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(46-62), MBP(124-139) o MBP(147-170). En realizaciones específicas,  $P_x$  tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60 %, 65, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a una de las SEQ ID NO: 1-3.

En una realización,  $R^n$  y  $R^c$  son individualmente de entre 1 y 250 aminoácidos. En una realización particular, la combinación de  $R^n$  y  $R^c$  es de entre 1 y 250 aminoácidos. En una realización, un péptido MBP tiene tanto una región flanqueante en el extremo N ( $R^n$ ) como una región flanqueante en el extremo C ( $R^c$ ). En otra realización, el péptido MBP tiene una región flanqueante en el extremo N ( $R^n$ ) pero no una región flanqueante en el extremo C ( $R^c$ ). En otra realización, el péptido MBP tiene una región flanqueante en el extremo C ( $R^c$ ) pero no una región flanqueante en el extremo N ( $R^n$ ).

#### D. Síntesis de péptidos

Un péptido MBP desvelado en el presente documento puede sintetizarse por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, incluyendo síntesis de péptidos en fase sólida. Los procedimientos en fase sólida convencionales para sintetizar péptidos pueden empezar con anhídridos de aminoácido N-alfa protegidos que se preparan en forma cristalizada o se preparan recientemente en solución, y se usan para la adición sucesiva de aminoácidos en el extremo N. En cada adición de residuo, el péptido creciente (en un soporte sólido) se trata con ácido para eliminar el grupo N-alfa protector, se lava varias veces para eliminar el ácido residual y para promover la accesibilidad del extremo del péptido al medio de reacción. El péptido entonces se hace reaccionar con un anhídrido simétrico de aminoácido N protegido activado, y el soporte sólido se lava. En cada etapa de adición de residuo, la reacción de reacción de aminoácidos puede repetirse para un total de dos o tres reacciones de adición diferentes, para aumentar el porcentaje de moléculas peptídicas en crecimiento que se hacen reaccionar. Típicamente, se usan de 1 a 2 ciclos de reacción para las primeras doce adiciones de residuo, y de 2 a 3 ciclos de reacción para los residuos restantes.

Después de completarse las cadenas peptídicas en crecimiento, la resina de péptido protegido se trata con un ácido fuerte tal como ácido fluorhídrico líquido o ácido trifluoroacético para desbloquear y liberar los péptidos del soporte. Para preparar un péptido amidado, el soporte de resina usado en la síntesis se selecciona para suministrar una amida en el extremo C, después de la escisión del péptido de la resina. Después de la eliminación del ácido fuerte, el péptido puede extraerse en solución de ácido acético 1 M y liofilizarse. El péptido puede aislarse mediante una separación inicial por filtración en gel, para eliminar los dímeros peptídicos y polímeros de mayor peso molecular, y también para eliminar las sales indeseadas. El péptido parcialmente purificado puede purificarse adicionalmente por cromatografía de HPLC preparativa, y la pureza y la identidad del péptido se confirman mediante análisis de composición de aminoácidos, espectrometría de masas y mediante HPLC analítica (por ejemplo, en dos sistemas de disolvente diferentes).

Asimismo, los péptidos MBP desvelados en el presente documento pueden prepararse por expresión en una célula huésped adecuada, seguida de purificación del cultivo celular. Se conocen muchos sistemas en la técnica para la expresión de péptidos. Los ejemplos de cepas huésped adecuadas incluyen: especies fúngicas o de levadura tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* y *Hansenula*; especies bacterianas tales como *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Anabaena*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Actinomyces* y *Comamonas*; células de mamífero tales como líneas celulares humanas, líneas celulares de hámster y líneas celulares de roedor; y líneas celulares de insecto tales como sistemas de expresión basados en baculovirus.

#### IV. Vectores de péptido MBP

##### A. Introducción

Los péptidos MBP de la presente invención se ligan a un vector para su administración a un sujeto que lo necesite. La selección de un vector apropiado se basará en muchos factores, tales como: la vía particular de administración empleada; la dosificación de péptido a suministrar; la frecuencia de dosificación; la eficacia de tratamientos previos; la gravedad de la enfermedad o síntoma que se está tratando; y la fase en curso de la enfermedad en el sujeto.

La carga de péptido MBP puede ligarse al vector de un modo covalente o no covalente. Por ejemplo, el péptido MBP puede asociarse con el vector mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacciones electrostáticas, interacción hidrófoba, fuerza de Van der Waals, incluirse en, fijarse a o atraparse físicamente por el vector.

En una realización, el vector ligado al péptido MBP es una nanopartícula. Los ejemplos no limitantes de nanopartículas incluyen: liposomas, micelas, micelas de copolímero de bloque; polimerosomas; niosomas; nanoburbujas recubiertas con lípido; dendrímeros; partículas metálicas (por ejemplo, una partícula de óxido de hierro o partícula de oro); y partículas de sílice. La carga de péptido puede encapsularse en, incluirse en, transportarse sobre la superficie de o fijarse al vector de nanopartícula.

El uso de nanopartículas para el suministro de un agente terapéutico proporciona varias ventajas, en comparación con la administración del agente terapéutico en solitario. Por ejemplo, pueden usarse nanopartículas para proteger de otro modo los agentes terapéuticos lábiles, tales como péptidos o polinucleótidos nativos, de la agresión intracelular y/o extracelular. Las nanopartículas también funcionan reduciendo o eliminando los efectos tóxicos causados por el agente terapéutico. Por tanto, pueden suministrarse dosis mayores de un agente terapéutico potencialmente dañino o tóxico mediante una formulación de nanopartículas.

Las nanopartículas pueden ligarse a polímeros no inmunógenos solubles en agua o de alto peso molecular para aumentar la semivida en suero del liposoma (por ejemplo, véanse, las patentes de Estados Unidos n.º 5 013 556, 5 676 971 y 6 132 763). Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua adecuados incluyen: poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefiíco), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiacrilamida), poli(hidroxiacrilmetacrilato), poli(sacáridos), poli( $\alpha$ -hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrililmorfolina), polímeros de poli(óxido de alquileno), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), polisacáridos, tales como ácido polisiálico o carboximetilcelulosa, dextrano, almidón o derivados de almidón tales como hidroxietil almidón (HES), ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

En determinadas realizaciones, el vector del péptido MBP se liga adicionalmente a un resto de dirección. En otras realizaciones, el vector ligado al péptido MBP es un resto de dirección. En una realización específica, el resto de dirección (i) aumenta el suministro de un péptido MBP a una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria), en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria), en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En una realización específica, el resto de dirección se une específicamente a una clase o tipo de células, por ejemplo, a células inmunitarias que comprenden un antígeno de superficie celular particular.

## B. Liposomas

En una realización específica, el vector de péptido MBP es un liposoma. El uso de liposomas para el suministro de agentes terapéuticos es bien conocido en la técnica (para una revisión, véanse, Chrai, R. Murari y I. Ahmad. Liposomes (a review). Part two: Drug delivery systems. *BioPharm.* 15(1):40,42-43,49 (2002)). Los ejemplos de composiciones de liposoma incluyen las patentes de Estados Unidos n.º: 4 983 397, 6 476 068, 5 834 012, 5 756 069, 6 387 397, 5 534 241, 4 789 633, 4 925 661, 6 153 596, 6 057 299, 5 648 478, 6 723 338 y 6 627 218; las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º: 2003/0224037, 2004/0022842, 2001/0033860, 2003/0072794, 2003/0082228, 2003/0212031, 2003/0203865, 2004/0142025 y 2004/0071768; las publicaciones de patente internacional: WO 00/74646, WO 96/13250 y WO 98/33481; Papahadjopolulos D. y col., (*Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1991) 88: 11460-11464), Allen y Martin (*Semin Oncol* (2004) 31: 5-15 (supl. 13)), y Weissig y col. (*Pharm. Res.* (1998) 15: 1552-1556).

En algunas realizaciones, el liposoma incluye un fosfolípido, por ejemplo, una fosfatidilcolina. El fosfolípido puede ser de origen natural, semisintético o sintético. En algunas realizaciones, el fosfolípido es una fosfatidilcolina que no es de origen natural. En algunas realizaciones, el fosfolípido es catiónico. En otras realizaciones, el fosfolípido es aniónico. En otras realizaciones más, el fosfolípido es neutro. Los fosfolípidos ejemplares incluyen fosfatidilcolinas (PC), ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

En algunas realizaciones, el fosfolípido es una fosfatidilcolina. Los ejemplos no limitantes de fosfatidilcolina incluyen: 2,3-dipalmitoil-sn-glicero-l-fosfatidilcolina; distearoil fosfatidilcolina (DSPC); dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC); dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC); fosfatidilcolina de huevo (EPC); y fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC).

En algunas realizaciones, el liposoma comprende un lípido catiónico. Como se usa en el presente documento, los lípidos catiónicos se refieren a moléculas compuestas de al menos una, y muy típicamente dos, cadenas de ácido graso y un grupo de cabeza polar cargado positivamente. Los lípidos catiónicos típicos tienen cadenas de ácido graso dodecilo ( $C_{12}$ ) o hexadecilo (cetilo,  $C_{16}$ ), aunque la expresión "lípido catiónico" también pretende abarcar lípidos con cadenas de ácido graso de otras longitudes. Los ejemplos no limitantes de lípidos catiónicos incluyen: DOTAP (1,2-diacil-3-trimetilamonio propano), DOPE (dioleoil fosfatidiletanolamina), DOTMA (cloruro de [2,3-bis(oleil)propil]trimetil amonio), DOGS (dioctadecil amido glicil espermina), DODAB (bromuro de dioctadecil diamonio), DODAC (cloruro de dioctadecil diamonio), DOSPA (2,3 dioleoiloxi-N-[esperminacarboxaminoetil]-N-N-dimetil-1-propanaminio), DC-Chol ( $3\beta$ [N-(n',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol, dioleoil), DOIC (cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)-etil]-2-oleoil-3-(2-hidroxietil) imidazolinio), DOPC (dioleoil fosfatidilcolina) y DMRIE (bromuro de dimiristooxipropil dimetil hidroxietil amonio).

En determinadas realizaciones, el liposoma comprenderá además colesterol, un análogo de colesterol y/o un derivado de colesterol que confiere fluidez adicional a la bicapa lipídica del liposoma. Los ejemplos no limitantes de análogos de colesterol y derivados que pueden usarse en los liposomas proporcionados en el presente documento incluyen 5-colesteno, 5-pregnen- $3\beta$ -ol-20-ona, 4-colesten-3-ona y 5-colesten-3-ona. En determinadas realizaciones, el colesterol estará presente en un liposoma a una concentración de aproximadamente un 0,01 % en moles a

aproximadamente un 25 % en moles. En determinadas realizaciones, el colesterol está presente a una concentración de aproximadamente un 0,1 % en moles y aproximadamente un 10 % en moles en el liposoma. En otras realizaciones más, la concentración de colesterol en un liposoma es de aproximadamente un 0,01 % en moles, 0,02 % en moles, 0,03 % en moles, 0,04 % en moles, 0,05 % en moles, 0,06 % en moles, 0,07 % en moles, 0,08 % en moles, 0,09 % en moles, 0,1 % en moles, 0,2 % en moles, 0,3 % en moles, 0,4 % en moles, 0,5 % en moles, 0,6 % en moles, 0,7 % en moles, 0,8 % en moles, 0,9 % en moles, 1 % en moles, 2 % en moles, 3 % en moles, 4 % en moles, 5 % en moles, 6 % en moles, 7 % en moles, 8 % en moles, 9 % en moles, 10 % en moles, 11 % en moles, 12 % en moles, 13 % en moles, 14 % en moles, 15 % en moles, 16 % en moles, 17 % en moles, 18 % en moles, 19 % en moles, 20 % en moles, 21 % en moles, 22 % en moles, 23 % en moles, 24 % en moles, 25 % en moles o mayor.

En una realización particular, el liposoma incluye un lípido ligado a un resto de dirección. Los ejemplos no limitantes de restos de dirección que pueden ligarse a un lípido usado para la formación de un liposoma incluyen: restos de azúcar (por ejemplo, manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa, análogos o derivados del mismo); péptidos (por ejemplo, un ligando de receptor celular), polipéptidos (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo); y ácidos nucleicos (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®).

En una realización, el lípido ligado a un resto de dirección se incluye a una concentración final de al menos un 0,01 % del contenido de lípido total del liposoma. En otra realización, la concentración de lípido ligado al resto de dirección en el liposoma es de un 0,1 % del contenido de lípido total. En otra realización, la concentración del lípido ligado al resto de dirección en el liposoma es de un 1 % del contenido de lípido total. En otra realización, la concentración del lípido ligado al resto de dirección es de al menos un 5 % o al menos un 10 % del contenido de lípido total del liposoma. En otras realizaciones más, la concentración del lípido ligado al resto de dirección es de aproximadamente un 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % del contenido de lípido total del liposoma.

En una realización específica, el liposoma comprende un lípido ligado a uno o más residuos de manosa (es decir, un liposoma manosilado). Los ejemplos no limitantes de lípidos manosilados incluyen: lípido ManDOG (Espuelas y col., *Bioorg Med Chem Lett.* 4 de agosto de 2003; 13(15):2557-60); lípido tetramanosil-3-L-lisina-dioleoil glicerol (Espuelas y col., supra); y fosfatidilinositoles manosilados (Barratt y col., (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 862:153-164).

En determinadas realizaciones, los liposomas descritos en el presente documento tienen un diámetro promedio de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nm. Por ejemplo, el diámetro medio del liposoma puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 225 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 175 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 300 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 225 nm, de aproximadamente 75 a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 225 nm, de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nm. En una realización particular, el diámetro promedio del liposoma será de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm.

Los liposomas pueden prepararse por varias técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo extrusión, evaporación en fase inversa, sonicación, agitación y autoensamblaje en solución acuosa (para una revisión, véase, Torchilin VP, Weissig V (2003) *Liposomes: a practical approach*. Practical approach series, Vol. 264, 2.<sup>a</sup> edición, Oxford University). Además, es bien sabido que también pueden usarse procedimientos para preparar liposomas para preparar composiciones de cargas encapsuladas liposómicamente.

Los ejemplos no limitantes de procedimientos para preparar composiciones liposómicas se describen en las publicaciones de patente internacional: WO 1999/65465 y WO 2010/052326; las patentes de Estados Unidos n.º: 7 381 421, 7 604 803, 8 075 896, 7 790 696, 7 384 923, 7 008 791 y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 2009/0068254 y 2008/0317838. Un esquema ejemplar para formar una composición liposómica de uno o más péptidos consiste en un procedimiento de cinco etapas: etapa 1) formación de capas lipídicas irregulares deshidratadas por evaporación de disolvente orgánico (lípidos en cloroformo); etapa 2) rehidratación de capas lipídicas irregulares deshidratadas que da lugar a la formación de liposomas MLV multiestratificados; etapa 3) generación de liposomas SUV a partir de liposomas MLV, por homogeneización a alta presión; etapa 4) deshidratación, por liofilización, de una mezcla de liposomas SUV con una mezcla de uno o más péptidos junto con un exceso de azúcar; y etapa 5) rehidratación de la mezcla deshidratada de liposomas SUV con la mezcla de uno o más péptidos junto con un exceso de azúcar en los liposomas SUV con un tamaño de aproximadamente 100-200 nm.

## 60 V. Restos de dirección

**A. Introducción**

Para potenciar su efecto terapéutico, las composiciones de péptido MBP descritas en el presente documento pueden ligarse a un resto de dirección. El resto de dirección puede ligarse covalente o no covalentemente a un péptido MBP, por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace iónico, interacción electrostática, interacción hidrofóbica o atrapamiento físico. En determinadas realizaciones, La unión puede estar mediada mediante un conector o estructura de vector. Los ejemplos de restos de dirección incluyen un resto de azúcar (por ejemplo, manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa, análogos o derivados del mismo), un péptido (por ejemplo, un ligando de receptor celular), un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo) y un ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®).

5 Cuando se asocia, un resto de dirección mejora la eficacia de un péptido MBP, en comparación con la eficacia de la carga en solitario. En una realización, un resto de dirección mejora el suministro del péptido MBP asociado a una ubicación *in vivo* o tipo celular; y/o mejora la captación del péptido MBP en una célula o ubicación *in vivo*. En una realización particular, el resto de dirección mejora el suministro del péptido MBP asociado a una célula inmunitaria (por ejemplo, un linfocito B o APC); y/o mejora la captación del péptido MBP en una célula inmunitaria (por ejemplo, un linfocito B o APC).

10 Cuando se liga covalente o no covalentemente a uno o más péptidos MBP, un resto de dirección puede: (i) aumentar el suministro de un péptido MBP a una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria) en al menos un 10 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección; y/o (ii) aumentar la captación del péptido MBP en una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria) en al menos un 10 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En una realización específica, la célula inmunitaria es un linfocito B o célula presentadora de antígeno (APC). En una realización, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula en al menos un 25 % en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otra realización, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula en al menos un 50 %, 75 % o 100 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otra realización más, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula, en al menos 2 veces en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otras realizaciones más, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula, en al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces o 1000 veces en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección.

**B. Restos de azúcar**

En una realización, el resto de dirección comprende un resto carbohidratado (por ejemplo, un residuo de azúcar). En determinadas realizaciones, el resto de azúcar puede ser un monosacárido, un disacárido o un polisacárido. El resto de azúcar puede ser de origen natural, un análogo de un azúcar de origen natural o un derivado de un azúcar de origen natural. Los ejemplos no limitantes de restos de azúcar que pueden usarse como resto de dirección incluyen: manosa, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, ribosa, galactosamina, glucosamina, ácido siálico, N-acetilglucosamina, sacarosa, lactulosa, lactosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, kojibiosa, nigerosa, isomaltosa,  $\beta,\beta$ -trehatosa,  $\alpha,\beta$ -trehatosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, melibiulosa, rutinosa, rutinulosa, xilobiosa, análogos de los mismos o derivados de los mismos.

Ejemplos no limitantes de derivados y análogos de manosa incluyen 1-deoximanojirimicina, metil-a-D-manopiranosido, 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), 2-desoxi-2-fluoro-manosa (2-FM) y 2-desoxi-2-cloro-manosa (2-CM), cualquiera de los cuales pueden conjugarse con un lípido.

**VI. Composiciones terapéuticas****A. Introducción**

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición terapéutica para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM), que comprende un péptido de proteína básica de mielina (MBP), como se define en el presente documento, ligado a un vector. En una realización, el péptido MBP comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12). En general, el péptido MBP consistirá en de 6 a 100 aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 50 aminoácidos de longitud. En otra realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 25 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones más, el péptido MBP consistirá en aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos. En una realización, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el vector comprende un resto de dirección y es un liposoma manosilado.

**B. Composiciones de vector**

En una realización, la composición comprende al menos dos péptidos MBP, cada uno de los cuales está ligado a un vector. En una realización, ambos péptidos MBP están ligados a un único vector (por ejemplo, encapsulados dentro de un único liposoma). En otra realización, cada péptido MBP está ligado a un vector diferente (por ejemplo, encapsulados en liposomas diferentes) y los complejos de MBP-vector respectivos se mezclan antes de la administración.

En una realización, la composición comprende un primer péptido MBP que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 ligado a un primer vector y un segundo péptido MBP que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2 ligado a un segundo vector. En una realización específica, el primer péptido MBP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el segundo péptido MBP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización más específica, el primer péptido MBP consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el segundo péptido MBP consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición comprende un primer péptido MBP que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 ligado a un primer vector y un segundo péptido MBP que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3 ligado a un segundo vector. En una realización específica, el primer péptido MBP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el segundo péptido MBP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En una realización más específica, el primer péptido MBP consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el segundo péptido MBP consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de esclerosis múltiple, comprendiendo la composición un péptido MBP como se define en el presente documento, comprendiendo el péptido ligado a un vector un resto de dirección. En una realización específica, el vector que comprende un resto de dirección aumenta: (i) el suministro del péptido a una célula inmunitaria; o (ii) la captación del péptido en una célula inmunitaria, en comparación con un péptido ligado a un vector en ausencia de un resto de dirección. En una realización específica, el vector comprende un liposoma. En otra realización específica, el resto de dirección comprende un lípido manosilado.

En determinadas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, el vector está ligado de forma covalente o no covalente a un resto de dirección. En una realización, el resto de dirección (i) aumenta el suministro de un péptido MBP a una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria), en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria), en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En una realización específica, la célula es una célula inmunitaria. En una realización más específica, la célula inmunitaria es un linfocito B o una célula presentadora de antígeno (APC).

### C. Composiciones de vector liposómicas

En realizaciones específicas de la invención, las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento comprenden vectores liposómicos. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de EM, que comprende un péptido MBP encapsulado liposómicamente. En una realización específica, el liposoma está ligado a un resto de dirección. En una realización más específica, el resto de dirección es un lípido manosilado presente en la bicapa del liposoma.

En una realización específica, el liposoma está ligado a un resto de dirección de manosa, *es decir*, es un liposoma manosilado. En determinadas realizaciones, al menos un 0,01 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otra realización, al menos un 0,1 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otra realización, al menos un 1 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa. En otras realizaciones más, al menos un 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los lípidos que comprenden un liposoma manosilado estarán conjugados con al menos un residuo de manosa.

Pueden formularse composiciones liposómicas de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Las formulaciones liposómicas pueden comprender uno o más de: un agente tamponante (por ejemplo, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, tampón borato o tampón tartrato); un azúcar (por ejemplo, trehalosa, maltosa, sacarosa, lactosa, manosa, dextrosa o fructosa); un alcohol de azúcar (por ejemplo, sorbitol, maltitol, lactitol, manitol o glicerol), un alcohol (por ejemplo, etanol o t-butanol); una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro potásico, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio); un antioxidante (por ejemplo, glutatión).

### D. Resto de dirección

En determinadas realizaciones, el resto de dirección es un resto de azúcar (por ejemplo, manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa); un péptido (por ejemplo, un ligando de receptor celular), polipéptidos

(por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo); o ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®). En una realización específica, el resto de dirección es un residuo de manosa.

En una realización, el resto de dirección: (i) aumenta el suministro de un péptido MBP a una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria) en al menos un 10 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección; y/o (ii) aumenta la captación del péptido MBP en una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria) en al menos un 10 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En una realización específica, la célula inmunitaria es un linfocito B o célula presentadora de antígeno (APC). En una realización, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula en al menos un 25 % en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otra realización, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula en al menos un 50 %, 75 % o 100 %, en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otra realización más, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula, en al menos 2 veces en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección. En otras realizaciones más, el resto de dirección (i) aumenta el suministro; y/o (ii) aumenta la captación de un péptido MBP en una célula, en al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces o 1000 veces en comparación con un péptido MBP no ligado al resto de dirección.

En un aspecto, la invención proporciona una composición para el tratamiento de EM, que comprende un péptido MBP, como se define en el presente documento, ligado covalentemente a un resto de dirección (por ejemplo, en el que el vector es un resto de dirección). En determinadas realizaciones, el resto de dirección está ligado covalentemente directamente al péptido MBP. El resto de dirección puede estar ligado, por ejemplo, en el extremo N o C de la proteína MBP, en un grupo amina primario de una cadena lateral de lisina, glutamina o asparagina, en un grupo hidroxilo de una cadena lateral de serina o treonina, o en un tiol libre de una cadena lateral de cisteína. En determinadas realizaciones, el resto de dirección ligado directamente al péptido MBP es un resto de azúcar (por ejemplo, un residuo de manosa o un carbohidrato que contiene uno o más residuos de manosa, o análogo del mismo o un derivado del mismo, un péptido (por ejemplo, un ligando de receptor celular), un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero o Spiegelmer®). En una realización específica, el resto de dirección es un residuo de manosa.

### E. Tratamientos de combinación

No existe actualmente cura para la esclerosis múltiple. Sin embargo, se han aprobado varias modalidades terapéuticas para el control de los síntomas asociados con EM. Estos tratamientos incluyen: fingolimod, un modulador del receptor de esfingosina 1-fosfato que secuestra los linfocitos en los ganglios linfáticos, evitando que contribuyan a una reacción autoinmunitaria; interferón  $\beta$ -1a y  $\beta$ -1b, que probablemente funciona reduciendo la tasa de recidivas de EM, y ralentiza la progresión de discapacidad en pacientes con EM mediante sus propiedades antiinflamatorias; acetato de glatiramer (copaxona), un inmunorregulador que no es interferón, no esteroideo, que es un polímero aleatorio de cuatro aminoácidos predominantes encontrados en MBP, glutamina (Glu), lisina (Lys), alanina (Ala) y tirosina (Tyr); mitoxantrona, un inhibidor de topoisomerasa de tipo II usado para el tratamiento de EM progresiva secundaria; y natalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra la molécula de adhesión celular  $\alpha$ 4-integrina.

Adicionalmente, el uso de los siguientes tratamientos puede proporcionar algún beneficio terapéutico para pacientes diagnosticados con, o en riesgo de desarrollar, EM: (i) administración de acetato de glatiramer (GA) que está aprobado para el tratamiento de EM recidivante remitente (RRMS). GA es un copolímero aleatorio sintético de Glu, Lys, Ala y Tyr, que induce una población de linfocitos T reguladores Th2 con la capacidad de cruzar la BHE y producir citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-6, IL-10 y el factor de crecimiento de nervios derivado de cerebro (Aharoni R. y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:14157-62); (ii) administración de los llamados "ligandos de péptido alterado" (APL) que interactúan con receptores de linfocitos T (TCR). los APL llevan restos de unión a TCR modificados (Luca ME y col., J Neuroimmunol 2005;160:178-87), mutados (Katsara M. y col., J Med Chem 2009;52:214-8) o restringidos (Warren KG y col., Eur J Neurol 2006;13:887-95) y pueden activar parcialmente los linfocitos T, cambiando el fenotipo Th1 a Th2 y en algunos casos induciendo anergia de linfocitos T. El péptido MBP MBP/82-98, un APL derivado del fragmento encefalitogénico de MBP, muestra inhibición prometedora de la progresión de EM en pacientes con el haplotipo HLA-DR2-DR4. Sin embargo, una composición farmacéutica basada en este péptido fracasó en ensayo clínico en fase III (Fontoura y Garren, Results Probl Cell Differ 2010;51:259-85). Una mutación doble del péptido MBP(83-99) induce respuestas de IL-4 y antagoniza las respuestas de IFN-gamma (Katsara M. y col., J Neuroimmunol 2008;200:77-89); (iii) administración de IFN $\beta$ ; (iv) Ab monoclonales tales como rituximab (anti-CD20) dirigido a linfocitos B (Hauser SL y col., N Engl J Med 2008;358:676-88), daclizumab (anti-CD25, subunidad alfa del receptor IL-2) que reduce los linfocitos T activados (Rose JW y col., Ann Neurol 2004;56:864-7) y alemtuzumab (anti-CD52, glucoproteína de función desconocida presentada en todos los linfocitos maduros y monocitos) (Coles A. y col., Clin Neurol Neurosurg 2004;106:270-4); (v) tratamientos orales tales como FTY720 en forma fosforilada (inhibidor de receptores acoplados a proteína G asociados a SP1), teriflunomida (inhibidor de la proliferación de linfocitos T), BG-12 (inductor de citocinas Th2), laquinimod (inhibidor del tráfico de linfocitos T y macrófagos en el SNC, activador del cambio Th2/Th3), cladribina (sustrato para desoxicitidina cinasa, que interfiere con la reparación de ADN y la muerte de linfocitos) (todo revisado en Fontoura y Garren, Results Probl

Cell Differ 2010;51:259-85); (vi) inyección o vacunación de linfocitos T inactivados mediante regiones hipervariables de TCR para estimular las células CD8+ contrarreguladoras específicas de TCR; (vii) inducción de tolerancia del sistema inmunitario: inducción de "tolerancia nasal" o "tolerancia oral" por autoantígenos, o vacunación de ADN por el plásmido BHT-3009 que codifica la molécula MBP completa y activa inducción de tolerancia significativa tanto de linfocitos T como de autoanticuerpos hacia varios antígenos de mielina. (viii) Tratamiento novedoso de reducción dirigido a linfocitos B específicos recientemente propuesto (Stepanov AV y col., PLoS One; 6:e20991).

En un aspecto, la presente invención proporciona tratamiento de combinación para pacientes diagnosticados con o en riesgo de esclerosis múltiple. En una realización, el tratamiento comprende la coadministración de una composición de péptido MBP descrita en el presente documento y un agente terapéutico identificado previamente, por ejemplo, fingolimod, interferón  $\beta$ -1a, interferón  $\beta$ -1b, acetato de glatiramer, mitoxantrona, un inhibidor de topoisomerasa de tipo II usado para el tratamiento de EM progresiva secundaria y un anticuerpo anti- $\alpha$ 4-integrina.

En una realización, la coadministración comprende la administración simultánea o secuencial de un péptido MBP antigénico ligado a un vector y el segundo agente terapéutico. En otra realización, la coadministración comprende la administración de un primer ciclo terapéutico completo con un primer fármaco, la composición de péptido MBP o el tratamiento alternativo, seguido de la administración de un régimen terapéutico completo con el otro tratamiento. En esta realización, la administración de los dos fármacos no se solapa, en su lugar, los tratamientos tienen ciclos opuestos entre sí.

## VII. Tratamiento de esclerosis múltiple

### A. Introducción

En un aspecto, la presente invención proporciona péptido MBP de epítipo de linfocitos B ligado de un vector, como se describe en el presente documento, para su uso en procedimientos para tratar esclerosis múltiple (EM) en un sujeto que lo necesita. En una realización específica, el procedimiento comprende administrar un péptido MBP encapsulado liposómicamente que comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica a una de las SEQ ID NO: 1 a 3 a un sujeto que lo necesita.

En una realización, el procedimiento comprende administrar un péptido de proteína básica de mielina (MBP) terapéutico que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de MBP(43-64) (SEQ ID NO: 11) o MBP(115-170) (SEQ ID NO: 12) ligado a un vector (por ejemplo, un liposoma). En general, el péptido MBP consistirá en de 6 a 100 aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 50 aminoácidos de longitud. En otra realización, el péptido MBP consistirá en de 6 a 25 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones más, el péptido MBP consistirá en aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos. En una realización, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el vector es un liposoma manosilado.

En una realización específica, el procedimiento comprende administrar al menos dos péptidos MBP, comprendiendo cada péptido MBP respectivo al menos 6 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, los péptidos MBP ligados a un vector. En una realización más específica, los péptidos MBP comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1-3. En una realización más específica, los péptidos MBP consisten cada uno en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1-3. En una realización, el vector es un liposoma. En una realización más específica, el liposoma es un liposoma manosilado.

En determinadas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado con esclerosis múltiple. En una realización, el sujeto se ha diagnosticado con esclerosis múltiple recidivante remitente (RRMS). En otra realización, el sujeto se ha diagnosticado con esclerosis múltiple secundario progresiva (SPMS). En otra realización, el sujeto se ha diagnosticado con esclerosis múltiple primaria progresiva (PPMS). En otra realización, el sujeto se ha diagnosticado con esclerosis múltiple progresiva recidivante (PRMS).

En una realización, el tratamiento comprende la administración de una composición de péptido MBP durante o inmediatamente después de un ataque sintomático agudo. En una realización, el ataque sintomático agudo es un ataque inicial. En otra realización, el ataque sintomático agudo es un ataque recidivante. En determinadas realizaciones, al sujeto se le pueden coadministrar corticoesteroides intravenosos (por ejemplo, metilprednisolona) durante el ataque sintomático agudo. En determinadas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado con EM primaria progresiva, secundaria progresiva o recidivante remitente. En una realización, el tratamiento reducirá la gravedad del ataque agudo o mejorará uno o más síntomas físicos o fisiológicos en el sujeto.

En otra realización, el tratamiento comprende la administración de una composición de péptido MBP durante un periodo de remisión de EM en el sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado con EM secundaria progresiva o recidivante remitente. En una realización, el tratamiento evitará la aparición de un ataque agudo, retardará la aparición de un ataque agudo, reducirá la gravedad de un ataque agudo posterior o mejorará uno o más síntomas físicos o fisiológicos en el sujeto.

En otra realización, el tratamiento comprende la administración de una composición de péptido MBP durante un periodo de declive progresivo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto se ha diagnosticado con EM secundaria progresiva, primaria progresiva o progresiva recidivante. En una realización, el tratamiento evitará la aparición de un ataque agudo, retardará la aparición de un ataque agudo, reducirá la gravedad de un ataque agudo posterior, reducirá la progresión de la enfermedad, detendrá la progresión de la enfermedad o mejorará uno o más síntomas físicos o fisiológicos en el sujeto.

En otra realización más, el tratamiento comprende la administración de una composición de péptido MBP a un sujeto diagnosticado con un riesgo aumentado de desarrollar EM. En determinadas realizaciones, el sujeto tendrá uno o más factores de riesgo de EM, incluyendo: una historia familiar de EM, la presencia, regulación por aumento o regulación por disminución de un biomarcador de enfermedad (por ejemplo, interleucina-6, óxido nítrico y óxido nítrico sintasa, osteopontina, fetuína-A y autoanticuerpos anti-MBP) y un marcador genético de EM. En determinadas realizaciones, la administración profiláctica de una composición de péptido MBP a un sujeto que lo necesita evitará la enfermedad, retardará la aparición de la enfermedad, evitará un ataque agudo inicial, retardará la aparición de un ataque agudo inicial, reducirá la gravedad de la enfermedad o reducirá la gravedad de un ataque agudo inicial.

En determinadas realizaciones, el sujeto se habrá tratado previamente para EM. En otras realizaciones, el sujeto no habrá recibido tratamiento previo para EM.

## B. Administración

Las composiciones de péptido MBP de la presente invención pueden administrarse de acuerdo con cualquier vía de administración conocida, por ejemplo, tópica, entérica, parenteral, intravenosa, subcutánea, subdérmica, intramuscular, intraperitoneal, inhalación, epidural, por canulación (por ejemplo, intravenosa, nasal, oral o por cánula intercraneal), administración directamente al sistema nervioso central o cualquier otra vía similar de administración. La vía de administración elegida para un tratamiento terapéutico particular dependerá, por ejemplo, de la composición farmacéutica, la dosificación de agente terapéutico a suministrar, el estado de la patología que se está tratando; los resultados proporcionados por los ensayos clínicos tales como la eficacia de una formulación particular y el perfil de seguridad para una formulación particular, y el cumplimiento esperado del paciente. En una realización específica, la composición de péptido MBP se administra por vía subcutánea.

En determinadas realizaciones, una composición de péptido MBP se administra de modo que la composición se suministra o acumula en el sistema nervioso central. En una realización, la composición se administra directamente al sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, por administración epidural a la médula, intranasal (para una revisión, véase, Liu X., Expert Opin Drug Deliv. diciembre de 2011; 8(12):1681-90 y Wen MM., Discov Med. junio de 2011; 11(61):497-503), o implante de un sistema de suministro de fármaco (para una revisión véase, Tresco y Winslow, Crit Rev Biomed Eng. 2011; 39(1):29-44).

Como la administración directa de agentes terapéuticos al SNC presenta muchos problemas, incluyendo el riesgo de infecciones potencialmente mortales, la composición también puede administrarse externa al SNC. Los agentes terapéuticos suministrados de esta manera deben pasar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) para entrar en el SNC. Se han propuesto varias estrategias para potenciar el paso de agentes terapéuticos a través de la BHE (véase, Hossain S y col. Curr Drug Deliv. Diciembre de 2010; 7(5):389-97). Por ejemplo, el uso de sistemas de vector que presentan ligandos de receptor de BHE, péptidos o anticuerpos específicos para la BHE en su superficie (para una revisión véase, Costantino L., Future Med Chem. Noviembre de 2010; 2(11):1681-701 y Craparo y col., CNS Neurosci Ther. Diciembre de 2011; 17(6):670-7) o un péptido quimérico que comprende un péptido MBP fusionado a un vector de transporte de BHE tal como un péptido endógeno, proteína modifica o anticuerpo monoclonal (MAb) peptidomimético que experimenta RMT mediante la BHE en sistemas de receptor endotelial endógeno (véase, Pardridge, W.M., Mol. Interv., 2003, 3(2), 90-105).

En una realización, el tratamiento comprende la administración periódica, por ejemplo, una vez al mes, dos veces al mes, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, en días alternos, cada día o dos veces al día, durante un periodo dado de tiempo. Dependiendo del régimen terapéutico y el estado patológico del paciente, un ciclo de tratamiento puede continuar durante al menos un mes, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Cuando sea apropiado, el ciclo de tratamiento puede continuar durante al menos un año, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años. El efecto del tratamiento en el paciente puede controlarse y ajustarse según lo necesario, por ejemplo, para mejorar la eficacia o reducir los efectos secundarios, por un médico experto.

La dosificación administrada a un paciente variará dependiendo de varios factores, incluyendo: frecuencia de administración; gravedad de la afección (por ejemplo, esclerosis múltiple); subtipo de la afección (por ejemplo, EM recidivante remitente, EM secundaria progresiva, EM primaria progresiva y EM progresiva recidivante); fase de la afección (por ejemplo, ataque inicial, recidiva y remisión); tamaño y tolerancia del sujeto; vía de administración empleada; riesgo de efectos secundarios; riesgo de interacciones adversas de fármacos; y respuesta a tratamientos previos, cada uno de los cuales puede determinarse fácilmente por un médico experto.

Como se ha analizado anteriormente, muchos factores contribuirán a lo que constituye una dosificación apropiada, incluyendo la frecuencia de administración. En una realización, una composición de péptido MBP proporcionada en

el presente documento puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. En otras realizaciones, la dosificación puede ser de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. En otra realización, la dosificación puede ser de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. En otra realización, la dosificación puede ser de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En otra realización, la dosificación puede ser de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En otra realización más, la dosificación puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg. En otras realizaciones más, la dosificación puede ser de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 mg/kg o de aproximadamente 200 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. En una realización, la dosificación se administra diariamente. En otra realización, la dosificación se administra en días alternos, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días o cada seis días. En una realización, la dosificación se administra una vez a la semana. En otra realización, la dosificación se administra una vez cada dos semanas. En otras realizaciones, la dosificación se administra cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once semanas.

### 15 **VIII. Ejemplos**

#### ***Ejemplo 1 - Preparación de liposomas que contienen péptidos MBP por sonicación***

Se disolvieron 45 g de una mezcla de fosfolípido que contiene 1 parte en peso de lípido DOG manosilado (ManDOG) y 99 partes en peso de 2,3-dipalmitoil-sn-glicero-l-fosfatidilcolina en 450 ml de cloroformo y se colocaron en un matraz de evaporador de vacío de 1 l. El cloroformo se evaporó al vacío para formar una película lipídica en las paredes del matraz. Después de la evaporación, el matraz se llenó con gas nitrógeno y se introdujeron lentamente en el mismo 800 ml de agua para inyección (WFI). El matraz se colocó en el baño ultrasónico durante 30 minutos para alterar los liposomas preformados. Los liposomas se volvieron a formar después de la sonicación, produciendo una emulsión acuosa de liposomas.

Después se disolvieron 0,75 g de una mezcla de péptido MBP que contenía GGDRGAPKRGSGKDSHH (SEQ ID NO: 1; MBP1), GFGYGGGRASDYKSAHK (SEQ ID NO: 2; MBP2) y QGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO: 3; MBP3) y un exceso de lactosa (relación de lactosa a lípido de 3:1) en cantidades iguales en 40 ml de agua para inyección. La emulsión de liposomas se añadió a la solución de péptido MBP y la mezcla se agitó durante 30 minutos, produciendo una emulsión de liposomas con tamaños entre 100 nm y 200 nm y péptidos MBP sin encapsular. Entonces la emulsión resultante de liposomas monolaminares se liofilizó.

La siguiente etapa fue rehidratación en condiciones controladas seguida de lavado de los liposomas SUV resultantes por centrifugación para eliminar los materiales no incorporados. Los gránulos lavados se resuspendieron en PBS hasta el volumen de dosis requerido. La incorporación de péptidos se estimó basándose en HPLC en fase inversa usando gradiente lineal de acetonitrilo aplicado en una columna C18. El diámetro de promedio z y el potencial zeta de los liposomas se midieron en un zetasizer Brookhaven ZetaPlus a 25 °C diluyendo 20 µl de la dispersión al volumen requerido con PBS o medio apropiado. Los liposomas de control sin péptidos (vehículo) y liposomas que carecen de lípido manosilado se obtuvieron de forma idéntica excepto por la adición de péptidos MBP y ManDOG, respectivamente.

#### ***Ejemplo 2 - Preparación de liposomas que contienen péptidos MBP mediante disgregación***

Se disolvieron 45 g de una mezcla de fosfolípido que contiene 1 parte en peso de lípido DOG manosilado (ManDOG) y 99 partes en peso de 2,3-dipalmitoil-sn-glicero-l-fosfatidilcolina en 450 ml de cloroformo y se colocaron en un matraz de evaporador de vacío de 1 l. El cloroformo se evaporó al vacío para formar una película lipídica en las paredes del matraz. Después de la evaporación, el matraz se llenó con gas nitrógeno y se introdujeron lentamente en el mismo 800 ml de agua para inyección. La mezcla resultante se transfirió a un receptor de disgregador de flujo y la presión del volumen sistólico del disgregador se ajustó a 150 MPa. Se añaden 100 ml de la mezcla al disgregador de flujo por carga, y la emulsión liposómica resultante se recoge del receptor de disgregador.

Después se disolvieron 0,75 g de una mezcla de péptido MBP que contenía GGDRGAPKRGSGKDSHH (SEQ ID NO: 1; MBP1), GFGYGGGRASDYKSAHK (SEQ ID NO: 2; MBP2) y QGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO: 3; MBP3) y un exceso de lactosa (relación de lactosa a lípido de 3:1) en cantidades iguales en 40 ml de agua para inyección. La emulsión de liposomas se añadió a la solución de péptido MBP y la mezcla se agitó durante 30 minutos, produciendo una emulsión de liposomas con tamaños entre 100 nm y 200 nm y péptidos MBP sin encapsular. Entonces la emulsión resultante de liposomas monolaminares se liofilizó.

La siguiente etapa fue rehidratación en condiciones controladas seguida de lavado de los liposomas SUV resultantes por centrifugación para eliminar los materiales no incorporados. Los gránulos lavados se resuspendieron en PBS hasta el volumen de dosis requerido. La incorporación de péptidos se estimó basándose en HPLC en fase inversa usando gradiente lineal de acetonitrilo aplicado en columna C18. El diámetro de promedio z y el potencial zeta de los liposomas se midieron en un zetasizer Brookhaven ZetaPlus a 25 °C diluyendo 20 µl de la dispersión al volumen requerido con PBS o medio apropiado. Los liposomas de control sin péptidos (vehículo) y liposomas que carecen de lípido manosilado se obtuvieron de forma idéntica excepto por la adición de péptidos MBP y ManDOG,

respectivamente.

**Ejemplo 3 - Formulación acuosa de liposomas que contienen péptidos MBP**

Se añadieron 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (FBS) a 1000 mg de liposomas de péptido MBP liofilizados, preparados como se describe en el ejemplo 1, en condiciones estériles y se agitó. Entonces se añadió beta-caroteno a la composición a una concentración final de un 0,01 %, como antioxidante. La composición de liposomas entonces se distribuyó en recipientes de vidrio de clase I hidrolíticos en condiciones estériles y una atmósfera de nitrógeno. Los recipientes se precintaron posteriormente con tapones de caucho y se equiparon con tapas de aluminio.

**Ejemplo 4 - Formulación liofilizada de liposomas que contienen péptidos MBP**

A 1000 mg de liposomas de péptido MBP liofilizados, preparados como se describe en el ejemplo 1, se añadieron 2 mg de alfa tocoferol sólido en condiciones estériles. Se distribuyeron 100 mg de la mezcla deshidratada resultante en recipientes de vidrio de clase I hidrolíticos en condiciones estériles y una atmósfera de nitrógeno. Los recipientes se precintaron posteriormente con tapones de caucho y se equiparon con tapas de aluminio. Antes de su uso, la mezcla liposómica de MBP deshidratada se reconstituyó con 1 a 2 ml de WFI por recipiente y se agitó durante 1-2 minutos para formar una emulsión homogénea de liposomas.

**Ejemplo 5 - Tratamiento de EAE en ratas DA con péptidos MBP encapsulados liposómicamente**

Para inducir la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratas DA que tienen una masa de 220-250 g (12-14 meses de edad), se inyectaron por vía subdérmica 10 µg de fragmento peptídico encefalogénico de proteína básico de mielina ARTTHYGSLPQKSQRSQ (SEQ ID NO: 4 Anaspec, EE. UU.) emulsionado en adyuvante completo de Freund (Difco, EE. UU.) a una concentración de un 10 % (m/v) en la pata posterior. Las ratas se pesaron y controlaron para los síntomas neurológicos de EAE diariamente. El perfil de síntomas de EAE de cada rata se puntuó de acuerdo con la siguiente escala: (0) - ausencia de síntomas de EAE; (1) - disminución en la tonicidad de la cola; (2) - disminución en el reflejo de erguirse; (3) - paresia; (4) - parálisis completa; y (5) - agonía o muerte. Los síntomas intermedios se puntuaron aumentando o disminuyendo el valor en 0.5 unidades. Seis días después de la inducción de EAE, los animales se distribuyeron aleatoriamente en varios grupos (12 animales cada uno).

Entre los días seis y once después de la inducción, se inyectó por vía subdérmica a las ratas en cada grupo respectivo la preparación liposómica descrita en el ejemplo 2 (emulsionada en solución salina con fosfato, pH 7,4), una preparación de control positivo de acetato de glatiramer (GA; copaxona, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Israel), un péptido prototipo: DENPVVIIFFKNIVTPRT (SEQ ID NO: 5) o un placebo de solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4). El péptido, acetato de glatiramer y las preparaciones liposómicas se formularon inmediatamente antes de la administración usando solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Se administró diariamente 0,1 ml de cada composición a una concentración de 150 µg por animal. Los resultados de ensayo se presentan en la tabla 2:

**Tabla 2.** El efecto de prototipo, los liposomas desvelados, el placebo y el acetato de glatiramer en el curso de la enfermedad EAE en ratas de la línea DA.

Día después de la inducción de EAE, N.º	Evaluación de la intensidad de los síntomas de EAE, promedio			
	Liposomas desvelados	Prototipo	Placebo	GA
-1	0,00	0,00	0,00	0,00
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,75	0,58	0,50	0,50
9	1,25	1,33	1,50	1,67
10	1,92	2,42	2,33	2,17
11	1,58	2,33	2,42	2,25
12	1,50	2,50	2,34	2,25

(continuación)

Día después de la inducción de EAE, N.º	Evaluación de la intensidad de los síntomas de EAE, promedio			
	Liposomas desvelados	Prototipo	Placebo	GA
13	1,17	2,17	1,92	2,83
14	1,08	2,00	2,17	2,75
15	0,50	1,83	1,92	2,33
16	0,08	1,67	1,58	2,08
17	0,17	1,33	1,93	2,17
18	0,08	1,42	1,83	2,17
19	0,08	1,08	1,75	1,75
20	0,00	0,83	1,67	1,67

Como se muestra en la tabla 2, la administración de la composición liposómica de péptido MBP proporcionó significativamente mayor efecto terapéutico reduciendo la intensidad y tasa de progresión de EAE en ratas DA, en comparación con la administración del péptido prototipo o composiciones de acetato de glatiramer (compárense las puntuaciones de EAE promedio en el día 20).

**Ejemplo 6 - Tratamiento de un sujeto humano de género femenino diagnosticado con esclerosis múltiple con péptidos MBP encapsulados liposómicamente**

Una paciente mujer (edad 30) diagnosticada con esclerosis múltiple (forma cerebromedular, curso progresivo) se trató previamente con corticoesteroide, beta-interferón y acetato de glatiramer, cada uno de los cuales demostró ser ineficaz, ya que su déficit neurológico y deterioro cognitivo siguió progresando. Los niveles en suero de anticuerpos contra MBP en el sujeto se determinaron en  $10^7$  unidades por ml y se midió el índice de estimulación de linfocitos T (SI) del paciente en 6,5.

Con el consentimiento apropiado, se administró por vía subdérmica la composición de tripéptido MBP liposómico preparada como se describe en el ejemplo 3 a una dosificación de 200 mg en semanas alternas durante 6 meses. Durante el curso del tratamiento, se observó regresión del déficit neurológico en 1,5 unidades (escala EDSS). Los niveles en suero de anticuerpos IgG anti-MBP se redujeron hasta niveles no detectables. Y el SI de los linfocitos T se midió después de 6 meses a 2.

Estos resultados demuestran que la EM puede tratarse de forma eficaz en seres humanos mediante la administración de las composiciones de péptido MBP liposómicas descritas en el presente documento.

**Ejemplo 7 - Tratamiento de un sujeto humano de género masculino diagnosticado con esclerosis múltiple con péptidos MBP encapsulados liposómicamente**

Un paciente hombre (edad 36) diagnosticado con esclerosis múltiple (forma cerebromedular, curso remitivo), en la fase de recidiva, se sometió previamente a tratamiento repetido con corticoesteroides. El paciente había presentado síntomas de EM durante 3 años. En el momento del tratamiento, el paciente presentaba: nistagmo lateral cuando miraba a la derecha, reflejo de tendones activo, S < D en las piernas, reflejo abdominal superior activo, reflejo abdominal central e inferior ausente, síntoma de Babinski bilateral, clono del pie (más expresado en pie derecho), sin paresia en las extremidades, tonicidad muscular inalterada, caminar atáxico, pérdida de equilibrio en la postura de Romberg, ataxia cuando realiza el ensayo de hcl-shin y retención de orina. El valor del déficit neurológico del paciente en la escala EDSS fue 6.

El paciente también presentaba blanqueamiento oftálmico de las mitades temporales de las cabezas nerviosas ópticas. Después de estudiar las PBMC del paciente, se determinó la actividad de linfocitos T con respecto a MBP en un índice de simulación (SI) de 7,45. Los niveles de anticuerpos IgG en suero fueron 75 unidades por ml.

Con el consentimiento del paciente, se administró la composición de péptido prototipo una vez cada dos semanas a una dosificación de 500 mg. 7 días después de cada inyección, se tomaron muestras de sangre periférica (venosa) del paciente para determinar los cambios en la actividad de los linfocitos T con respecto a MBP, así como los niveles de autoanticuerpos. Durante el curso de 7 semanas, la presentación clínica del paciente de EM progresó ligeramente. En la semana cuatro, El nivel de autoanticuerpos IgG del paciente aumentó hasta 112 unidades por ml y se duplicó el SI de linfocitos T.

Después del curso inicial de tratamiento con el péptido prototipo, el paciente consintió al tratamiento con la composición de tripéptido MBP liposómico descrita anteriormente. Al paciente se le administraron 100 mg de la composición una vez cada dos semanas durante doce semanas (6 inyecciones en total).

Tras tres semanas con el régimen de tratamiento con tripéptido MBP liposómico, empezaron a aparecer signos de

remisión. En la semana ocho, el nivel de autoanticuerpos IgG del paciente había bajado hasta 25 unidades por ml y el SI de linfocitos T era tres veces inferior al nivel medido antes del tratamiento. Clínicamente, se normalizó la uresis y deambulación del paciente, era capaz de mantener el equilibrio en la postura de Romberg, pasaba fácilmente el ensayo de heel-shin y su valor de déficit neurológico en la escala EDSS bajó hasta 5.

- 5 Estos resultados demuestran que la EM puede tratarse de forma eficaz en seres humanos mediante la administración de las composiciones de péptido MBP liposómicas descritas en el presente documento.

### **Ejemplo 8 - Identificación de un modelo de roedor relevante para esclerosis múltiple**

10 Puede inducirse EAE en muchas especies por inmunización mediante antígenos de mielina, que sirve como modelo para esclerosis múltiple (EM). Estos modelos de EM, aunque se han usado en muchos estudios, no son completamente relevantes para la enfermedad EM. Por ejemplo, varios estudios que muestran eficacia de un tratamiento para EM propuesto en el modelo animal de EAE no han logrado traducirse en un efecto beneficioso, e incluso causan exacerbación, tras el tratamiento de un paciente humano con EM (Hohlfeld y Wekerle, Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:14599-606). Por tanto, se realizó un examen cuidadoso de los modelos de roedor de EAE para identificar un sistema que coincida más estrechamente con los espectros de autoanticuerpos (auto-Ab) contra MBP presentes en los pacientes con EM.

15 Se preparó previamente una colección de epítomos de MBP que representa fragmentos de este neuroantígeno fusionados con la proteína transportadora tiorredoxina (Belogurov AA y col., J Immunol 2008; 180:1258-67). Se informó de que el patrón de auto-Ab que se unen a la colección de epítomos de MBP puede considerarse una característica molecular, o instantánea de respuesta de linfocitos B patógenos en EM. Para identificar el modelo de roedor más relevante para EM, se indujo EAE en tres cepas de roedor: ratones SJL y C57BL/6 y ratas DA (figura 1B). La colección de epítomos de MBP se ensayó por hibridación con mAb anti-MBP y anti-c-myc (figura 1A) para determinar el patrón de unión de autoanticuerpos anti-MBP de los modelos de roedor con EAE inducida. Este patrón de unión entonces se comparó con el patrón de unión de autoanticuerpo anti-MBP determinado para 12 pacientes humanos con EM.

25 Todos los estudios en animales se realizaron en instalaciones de animales del Assaf Harofeh Medical Center (Zerifin, Israel) usando prácticas aprobadas convencionales para los cuidados de animales. La inducción de EAE se realizó en ratas hembra Dark Agouti (DA) de 8-9 semanas. En resumen, a las ratas se les inyectó por vía intradérmica en la base de la cola un volumen total de 200 µl de inóculo, que contenía 50 µg de MBP(63-81) (ANASPEC), en solución salina mezclada (1:1) con CFA, (adyuvante completo de Freund (IFA) Sigma) y 1 mg de MT (cepa H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). Los animales que desarrollaban síntomas de EM se incluyeron en el estudio. Las ratas se trataron con diferentes formulaciones de liposomas (tabla 3), copaxona o placebo (vehículo) en condiciones similares durante 6 días. Todas las formulaciones se administraron por una inyección subcutánea al día. Se hizo seguimiento de los animales hasta el día 28 después de la inducción de EAE. La puntuación de los signos clínicos se realizó diariamente durante todos los periodos del estudio. La graduación de la puntuación fue la siguiente: 0 - Normal, 1 - debilidad de la cola, 2 - debilidad o parálisis de las patas posteriores, 3 - parálisis de las patas posteriores, arrastre de extremidades posteriores, 4 - parálisis completa, incapaz de moverse, 5 - muerte.

30 Ratones SJL hembra SPF, de 6 a 8 semanas de edad, se inmunizaron de acuerdo con el protocolo establecido (Coligan JE, Current protocols in immunology. [Nueva York]: Wiley, 1996, pág. Supl. 19, Unidad 5.1 y Supl. 21, Unidad 2.8) con MBP bovina inyectada a 50 µg por ratón en adyuvante completo de Freund que contenía 2 mg/ml de *M. tuberculosis*. Se inmunizaron ratones C57BL/6 hembra SPF, de 6 a 8 semanas de edad, de acuerdo con el protocolo establecido ((Oliver AR y col., J Immunol 2003; 171:462-8) con dominio extracelular recombinante de MOG inyectado a 100 µg por ratón en adyuvante completo de Freund que contenía 0,5 mg/ml de *M. tuberculosis*. Entre 14 y 28 días después de una segunda inmunización, los ratones con síntomas clínicos pronunciados se sacrificaron y se recogieron sus sueros para el análisis.

45 Se obtuvieron 10 ml de muestras de sangre de 12 pacientes con EM recidivante-remitente del Moscow Multiple Sclerosis Center en el City Hospital n.º 11. Los pacientes con EM eran entre 23 y 61 años de edad (mediana de 32,2 años). Sus puntuaciones de la escala del estado de discapacidad ampliada (EDSS) variaron de 0 a 4 (mediana de 2,0). El EDSS se puntuó en una escala de 0 a 10, indicando los mayores valores mayor discapacidad. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con corticoesteroides durante al menos un mes antes de tomar las muestras de sangre (Kurtzke JF, Neurology 1983;33:1444-52). Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado de acuerdo con las regulaciones del Ministerio de Salud de la Federación Rusa, aprobado por el Comité Ético del City Hospital n.º 11.

50 Para determinar los patrones de unión de autoanticuerpos anti-MBP en sueros de los modelos de roedor con EAE inducida y pacientes humanos con EM, se realizaron experimentos ELISA del siguiente modo. Se recubrieron placas de microvaloración (MaxiSorp-Nunc) con 50 µl de una solución de MBP a 10 µg/ml o péptidos MBP recombinantes en tampón carbonato/bicarbonato 100 mM pH 9,0, en pocillos de columna impares. Las placas se precintaron con sellador de placas ELISA (Costar) y se incubaron a 4 °C durante una noche y después se lavaron (300 µl/pocillo) tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween-20 al 0,15 %. Todos los pocillos se bloquearon entonces con 250 µl de seroalbúmina bovina (BSA) al 2 % (Sigma) en tampón carbonato/bicarbonato pH

9,0 y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0,15 %. Los anticuerpos en suero se diluyeron en PBS que contenía Tween-20 al 0,15 % y BSA al 0,5 % a la dilución final de 1:1000-1:50000, y se añadieron 50 µl de la muestra diluida a cada pocillo de la placa. Se usó anticuerpo monoclonal de rata anti-MBP (ab7349, Abcam) como control. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C, se lavaron tres veces con Tween-20 al 0,15 % con PBS. A cada pocillo, se añadieron 50 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG de rata completo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (A9037, Sigma) diluido 1:4000, en tampón y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de cinco lavados con PBS, Tween-20 al 0,15 %, se añadieron 50 µl de tetrametilbencidina a cada pocillo y se almacenaron en la oscuridad de 5 a 15 min. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de ácido fosfórico al 10 %. Los valores de DO<sub>450</sub> se midieron usando un lector de microplaca Varioscan (Thermo, EE. UU.).

En términos de respuesta de auto-Ab: se identificó una región inmunodominante, MBP(124-147), en ratones C57BL/6; dos en ratones SJL, MBP(24-44) y MBP(72-139); y dos en ratas DA; MBP(40-60) y MBP(107-170). Los dos últimos están correlacionados con los patrones de EM humana, incluyendo dos fragmentos MBP(43-64) y MBP(115-170), que sugiere que la respuesta inmunológica observada en ratas DA con EAE inducida es significativamente relevante como un modelo para EM humana. Se seleccionaron tres péptidos para análisis adicional: MBP(46-62) ("MBP1"); MBP(124-139) ("MBP2"); y MBP(147-170) ("MBP3"), que eran los más inmunodominantes tanto en pacientes con EM como en ratas DA. Significativamente, los linfocitos T CD4+ específicos de mielina de alta avidéz, descritos por Bielekova y col. (Bielekova B y col., J Immunol 2004; 172:3893-904) poseen reactividad hacia los péptidos MBP 111-129 y 146-170, which overlap with the MBP fragments identified in the present study, lo que demuestra la reactividad cruzada entre estos epítomos de linfocitos T y B.

**Ejemplo 9 - Ratas DA con EAE inmunizadas con MBP63-81 liberan autoanticuerpos anti-MBP que reconocen los péptidos MBP encefalitogénicos y del extremo C**

Anteriormente, únicamente GPBP(62-84), y a un menor grado GPBP(68-88), han demostrado poder inducir EAE en ratas DA (Miyakoshi A. y col., J Immunol 2003;170:6371-8). Sin embargo, dado que el péptido encefalitogénico MBP(81-104) desempeña una función significativa en la evaluación de EM (Aharoni R. y col. J Neuroimmunol 1998;91:135-46), se deseaba un protocolo de inmunización que produjera un nivel reproduciblemente alto de autoanticuerpos contra el fragmento de MBP del extremo C y la región encefalitogénica de MBP. Para asegurar que la propagación del epítomo, una característica distintiva de EM, se incluyera en la patogenia de EAE del modelo de roedor, se excluyó homogeneizado de médula espinal del homogeneizado usado en el presente estudio.

En resumen, se inmunizaron ratas DA con el péptido MBP(63-81), para conseguir las patologías de EAE deseadas. El análisis de los anticuerpos en suero de las ratas DA después de la inmunización reveló una respuesta de autoanticuerpos potenciada contra tres fragmentos de MBP: MDHARHGFLPRH (SEQ ID NO: 6); QDENPVVHFFKNIV (SEQ ID NO: 7) y IFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO: 8). La especificidad de los autoanticuerpos IgG policlonales anti-MBP se determinó de acuerdo con la unión con la colección de epítomos de MBP y el cálculo teórico adicional se basó en la suposición de péptidos solapantes (figura 2A). No se identificó actividad significativa de los auto-Ab en suero en ratas DA con EAE contra MBP(63-81). Como el péptido MBP(63-81) se usó como antígeno, esto sugirió la implicación de la propagación del epítomo durante el desarrollo de EAE en las ratas DA. Esta observación también está de acuerdo con hallazgos previos de que MBP(62-75), un péptido encefalitogénico principal en ratas DA, no es inmunodominante como se define por Sercarz y col. (Sercarz EE y col., Annu Rev Immunol 1993; 11:729-66).

Para cuantificar el reconocimiento por auto-Ab de los epítomos de MBP identificados, y para confirmar su secuencia *in vitro*, se determinó la afinidad de anticuerpos policlonales en suero anti-MBP aislados de ratas DA inmunizadas para péptidos MBP biotinilados por resonancia de plasmones superficiales (figura 2B). La constante de disociación eficaz de la proteína MBP de longitud completa ( $1,5 \times 10^{-8}$ ) se determinó en nanomolar, así como las constantes de disociación para los fragmentos de MBP encefalitogénico  $9,6 \times 10^{-9}$  y del extremo C ( $8,4 \times 10^{-9}$ ), lo que verifica su identidad como epítomos de linfocitos B principales. La unión al péptido MDHARHGFLPRH (SEQ ID NO: 6) no fue detectable y, por tanto, se excluyó de la evaluación adicional en este estudio como biomarcadores para la progresión de EAE.

Todas las mediciones de resonancia de plasmones superficiales se realizaron en aparato BiaCore T-200 (GE Healthcare, EE. UU.). Los péptidos MBP biotinilados (50 µg/ml (enumerados en la figura 2) y MBP se inmovilizaron en chips SA y CM-5, respectivamente. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El caudal del tampón HBS-EP se mantuvo a 10 µl/min durante todas las mediciones. Los anticuerpos (50 µg/ml) se ensayaron en ambos chips con un tiempo de asociación/disociación convencional de 300/300 s. Las constantes de disociación se calcularon usando el programa informático BiaCore T-200 Evaluation 1.0.

**Ejemplo 10 - La administración de epítomos de linfocitos B derivados de MBP encapsulados en liposomas SUV manoilados mejora significativamente la EAE en un modelo de rata de EM**

Se realizó tratamiento de EAE en ratas Lewis previamente con autoantígenos de mielina encapsulados diferentes de los proporcionados en el presente documento (véase, St Louis J. y col., J Neuroimmunol 1997; 73:90-100; y Avriilonis y Boggs, J Neuroimmunol 1991; 35:201-10). Al mismo tiempo, el grupo de Nagelkerken demostró que la

administración de APL M-PLP139-151 manosilado induce tolerancia específica de péptido a EAE en ratones SJL (Luca ME y col., J Neuroimmunol 2005; 160:178-87).

Los antígenos del péptido MBP de linfocitos B recién identificados se encapsularon en liposomas de vesículas unilaminares pequeñas (SUV) que albergan residuos de manosa en su superficie. El beneficio principal de esta estrategia es que hay péptidos no modificados inmunodominantes presentes en forma nativa dentro del liposoma, mientras que se potencia el suministro a células presentadoras de antígeno (APC) por la manosa expuesta en superficie. Las APC tienen altos niveles de receptores de manosa en su superficie, lo que potencia la endocitosis de las partículas de liposoma manosiladas en el citosol (Keler T. y col., Expert Opin Biol Ther 2004; 4:1953-62). Por otro lado, la administración de liposomas catiónicos que carecen de manosa puede aumentar significativamente la respuesta de anticuerpos, como se describe por Durova y col. para una "vacuna anti-VIH" (Durova OM y col., Mol Immunol 2009;47:87-95) y debe evitarse para la inducción de autotolerancia.

Los liposomas se ensamblaron a partir de una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (PC) y un uno por ciento molar de DOG manosilado (ManDOG) (Durova OM, *supra*). El ensamblaje de los liposomas SUV se realizó como se ilustra en la figura 3: (i) formación de capas lipídicas irregulares durante la evaporación de disolvente orgánico, seguida de rehidratación que da lugar a la formación de liposomas de vesícula multilaminar multiestratificada (MLV); (ii) homogeneización a alta presión que provoca la formación de SUV vacías; (iii) liofilización de liposomas SUV con péptidos, en esta fase los péptidos están ubicados entre los liposomas SUV colapsados; y (iv) encapsulación de péptidos durante la segunda rehidratación en los liposomas SUV con un diámetro promedio de aproximadamente 60-100 nm, que contienen un 1,0 % de residuos de manosa en su superficie. Se usaron cuatro formulaciones para este estudio: cada péptido MBP de epítipo de linfocitos B (MBP1, MBP2 y MBP3) individualmente y un mezcla 1:1:1 (en masa) de los tres péptidos.

Se prepararon vesículas unilaminares pequeñas (SUV) a partir de fosfatidilcolina de huevo (PC) y DOG manosilado (Espuelas S. y col., Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers, 2003 Bioorg Med Chem Lett., 4 de agosto; 13(15):2557-60) (relación molar 1:100) por homogeneización a alta presión (Durova OM, *supra*). En resumen, se deshidrató la mezcla de lípidos (100 mg/ml) en CHCl<sub>3</sub> al vacío, se resuspendió adicionalmente en agua Milli-Q hasta una concentración de lípidos final de 50 mg/ml, seguido de homogeneización a alta presión (137,89 MPa (20 000 psi)). Las SUV resultantes se mezclaron con péptidos (relación de lípido a péptido 330:1) junto con un exceso de azúcar (relación de lactosa a lípido 3:1) con posterior liofilización. Después de rehidratación en condiciones controladas, los liposomas SUV resultantes se lavaron por centrifugación para eliminar los materiales no incorporados. Los gránulos lavados se resuspendieron en PBS hasta el volumen de dosis requerido. La incorporación de péptidos se estimó basándose en HPLC en fase inversa usando gradiente lineal de acetonitrilo aplicado en columna C18. El diámetro de promedio z y el potencial zeta de los liposomas se midieron en un zetasizer Brookhaven ZetaPlus a 25 °C diluyendo 20 µl de la dispersión al volumen requerido con PBS 1 mM o medio apropiado.

Para ensayar el potencial terapéutico de las cuatro formulaciones, se les inyectó por vía subcutánea a ratas DA que presentan EAE inducida una de las cuatro formulaciones liposómicas manosiladas, copaxona (control positivo), péptido MBP1 libre (sin encapsular) (control negativo) y liposomas manosilados vacíos (control de vehículo; tabla 3).

**Tabla 3.** Características liposómicas y grupos experimentales de ratas DA implicadas en el estudio.

Composición	tamaño (nm)	IPD	zeta (mV)	atrapamiento del péptido (%)	dosis por rata/por día (6 inyecciones en total) (g)				
					MBP1	MBP2	MBP3	copaxona	liposomas
vehículo	80	0,20	-10,0	-	-	-	-	-	+
SUV de MBP1	95	0,19	-10,5	91	150	-	-	-	+
SUV de MBP2	85	0,18	-8,3	93	-	150	-	-	+
SUV de MBP3	81	0,21	-9,2	90	-	-	150	-	+
SUV de MBP1/2/3	73	0,22	-7,5	93	150	150	150	-	+
copaxona	-	-	-	-	-	-	-	450	-
MBP1	-	-	-	-	150	-	-	-	-

El tratamiento de cada rata se inició al primer signo de manifestación clínica de EAE. Como se muestra en la tabla 4, el tratamiento con formulaciones de péptido MBP1 y MBP1/2/3 liposómicas redujo significativamente la puntuación máxima y acumulada de enfermedad en ratas DA con EAE inducida. Además, se redujo la mortalidad en todos los grupos tratados con péptidos MBP liposómicos (MBP2 SUV- 1/11; todos los MBP SUV - 1/54), en comparación con el grupo tratado con vehículo liposómico vacío (3/17). También se produjo una muerte en el grupo tratado con MBP1 libre (1/15).

45

**Tabla 4.** Efecto de péptidos MBP atrapados en los liposomas SUV manosilados en el desarrollo de EAE en ratas DA.

Grupo de tratamiento	N	Mediana de la puntuación máxima de enfermedad (IQR <sup>3</sup> )	Mediana de la puntuación acumulada de enfermedad (IQR <sup>3</sup> )	Mortalidad
vehículo	17	3 (0,5)	22 (12,5)	3/17
SUV de MBP1	12	2 (1) <sup>1</sup>	17 (5,5) <sup>1</sup>	0/12
SUV de MBP2	12	3 (0,75) <sup>2</sup>	17,5 (26,75) <sup>2</sup>	1/12
SUV de MBP3	12	3 (0) <sup>2</sup>	15 (11) <sup>2</sup>	0/12
SUV de MBP1/2/3	18	3 (0,75) <sup>1</sup>	14 (5,25) <sup>1</sup>	0/18
copaxona	12	2 (1,25) <sup>1</sup>	18,5 (12,5) <sup>2</sup>	0/12
MBP1	15	3 (0,5) <sup>2</sup>	19,5 (22) <sup>2</sup>	1/15
<sup>1</sup> p<0,05 diferencias estadísticamente significativas observadas a partir del grupo de control; Anova unidireccional para estadística no paramétrica: Wilcoxon <sup>2</sup> p>0,05 diferencias estadísticamente significativas no observadas a partir del grupo de control; Anova unidireccional para estadística no paramétrica: Wilcoxon <sup>3</sup> Intervalo intercuartil, valor en paréntesis ( ).				

La puntuación media de enfermedad y la tasa de gliosis/desmиеlinización se determinaron para cada grupo de tratamiento, como se muestra en la figura 4. Como se puede ver el tratamiento con formulaciones liposómicas de MBP1 proporcionó la máxima reducción en la puntuación máxima de enfermedad durante el ataque inicial (panel 4A). El tratamiento con formulaciones liposómicas de MBP2 y MBP3 limitó la progresión de la enfermedad en la fase de remisión (paneles 4C y 4D). La administración de la formulación liposómica de una mezcla de los tres péptidos MBP mejoró significativamente la EAE prolongada, disminuyendo el perfil global de enfermedad (panel 4E).

El tratamiento con péptido MBP1 libre no proporcionó ningún efecto beneficioso (panel 4G), mientras que el tratamiento con copaxona produjo una tasa de mejora de EAE similar al tratamiento con la formulación de SUV de MBP1/2/3 (panel 4F). Sin embargo, las tratadas con copaxona no se recuperaron completamente de EAE después del ataque inicial, como las ratas tratadas con la formulación de SUV de MBP1/2/3 liposómica. Estos datos están de acuerdo con la tinción con hematoxilina y eosina representativa y la puntuación calculada de gliosis/desmиеlinización (figura 4, paneles de la derecha). Además, MBP1 y SUV de MBP1/2/3 disminuyeron significativamente tanto la mediana de la puntuación máxima de enfermedad como la mediana de la puntuación acumulada de enfermedad, lo que sugiere su alto potencial terapéutico (tabla 4).

#### **Ejemplo 11 - Los péptidos MBP liposómicos inhiben el desarrollo de EAE por regulación por disminución de citocinas Th1 e inducción de la producción de BDNF en el SNC**

Para investigar el estado inmunológico de ratas DA con EAE inducida después del tratamiento con Péptidos MBP encapsulados liposómicamente, se analizó el suero aislado de ratas tratadas como se describe en el ejemplo 10 para los anticuerpos anti-MBP y la tinción de citocinas del SNC (figura 5).

Se observó una disminución significativa en la concentración de auto-Ab anti-MBP en el suero de ratas tratadas con péptidos MBP encapsulados liposómicamente, en comparación con el suero de ratas tratadas con el control negativo de vehículo (figura 5A). Los niveles de autoanticuerpos específicos tanto para los epítomos de linfocitos B de MBP principales identificados, así como los autoanticuerpos reactivos contra MBP de longitud completa. De forma notable, no había epítomos de MBP(81-103) presentes en ninguna de las formulaciones liposómicas, aunque la concentración de autoanticuerpos que reconocen este epítomo se redujo al mismo grado que para los autoanticuerpos que reconocen la proteína MBP de longitud completa. Por tanto, se concluye que el efecto observado no podía explicarse por la neutralización primitiva de anticuerpos patógenos en el torrente sanguíneo.

Las composiciones de péptido MBP descritas en el presente documento pueden actuar, en parte, mediante un mecanismo que implica linfocito T autorreactivos, debido al solapamiento de los epítomos de linfocitos B y T (Belogurov A. y col., Bioessays 2009;31:1161-71). Para investigar esta posibilidad, se realizó tinción para citocinas Th1 en muestras de ratas DA con EAE inducida tratadas como se describe en el ejemplo 10 (figura 5B). Se descubrió que los niveles de IL-2 e IFN $\gamma$  estaban regulados por disminución significativamente en ratas tratadas con las formulaciones de péptido MBP liposómicas (tabla 5), lo que sugiere que las formulaciones designadas funcionan como fármacos antiinflamatorios. También se observó desmиеlinización disminuida en ratas DA con EAE inducida tratadas con las composiciones de péptido MBP liposómicas. Esta observación se correlacionó con la producción potenciada de BDNF (figura 5B), lo que sugiere que los péptidos MBP atrapados liposómicamente funcionan mediante un mecanismo que es similar al de copaxona, que regula por aumento de forma conocida la expresión de BDNF (Aharoni R y col., Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:14157-62).

**Tabla 5.** Título de autoanticuerpos anti-MBP en suero y perfil de citocinas del SNC en ratas que desarrollan EAE en respuesta a administración de péptidos MBP atrapados en liposoma.

Grupo de tratamiento	Título de autoanticuerpo anti-MBP en suero	Tinción anti-IL2	Tinción anti-IFN	Tinción anti-BDNF
vehículo	2,2 ± 0,2	++	+++	+
SUV de MBP1	1,1 ± 0,2	0	+	+++
SUV de MBP1/2/3	1,9 ± 0,1	0	+	+++
copaxona	1,0 ± 0,1	+	+	++
no inmunizado	0,02 ± 0,0012	-	-	-

Se realizó análisis histológico y tinción de citocinas de la siguiente manera. Se recogieron las médulas espinales de los animales, se incluyeron en parafina, se diseccionaron en cortes y se tiñeron con H y E y azul de Luxol rápido (LFB). Los parámetros histológicos son los siguientes: el grado de gliosis (grado de puntuación de 0 a 3; 0 corresponde a la ausencia de gliosis, 1 a gliosis leve (hasta 5-10 células), 2 a gliosis moderada (entre 10-50 células por foco) y 3 a gliosis grave (más de 50 células por foco). El grado de puntuación de desmielinización se clasifica de 0 a 3; 0 corresponde a la ausencia de desmielinización, 1 a desmielinización leve, 2 a desmielinización moderada y 3 a desmielinización grave. Se realizó tinción para las citocinas IL-2, IFN y BDNF de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los presente estudios identifican dos regiones inmunodominantes de MBP en ratas DA con EAE inducida, que también se identificaban en paciente humanos con EM. Cuando están encapsulados en liposomas manosilados, la administración de péptidos correspondientes a estas regiones inmunodominantes disminuye significativamente la EAE en ratas DA, reduciendo el primer ataque y potenciando la recuperación desde la exacerbación. Se descubrió que estas composiciones regulan por disminución las citocinas Th1, inducen la expresión de BDNF e inhiben la producción Ab anti-MBP (tabla 5). Sin limitarse a teoría alguna, un posible mecanismo de acción para este efecto terapéutico es que los residuos de manosa presentes en la superficie de los liposomas cargados con péptidos MBP aumenta la captación de los péptidos MBP encapsulados liposómicamente en las células APC, que a su vez da lugar a una inducción aumentada de tolerancia hacia la proteína básica de mielina y la posterior mejora de la enfermedad. El efecto beneficioso observado que los fragmentos de MBP encapsulados liposómicamente tienen sobre la progresión de la enfermedad EAE en ratas DA, acoplado con las similitudes inmunológicas entre las ratas DA con EAE inducida y los pacientes humanos con EM, sugiere una modalidad terapéutica novedosa para el tratamiento de EM.

#### **Ejemplo 12 - Eficacia terapéutica de péptidos MBP encapsulados liposómicamente en un modelo de rata de EM (DA-EAE-28-01)**

Para evaluar el uso de péptidos de epítipo de linfocitos B de MBP para el tratamiento de EM, se realizó un estudio en ratas DA con EAE inducida. Los objetivos del estudio incluían: 1) confirmar la eficacia terapéutica de péptido MBP1; 2) determinar si la encapsulación en SUV proporciona beneficio terapéutico adicional; 3) determinar si la formulación de SUV basada en MSL proporciona beneficio terapéutico adicional; 4) determinar si la adición de regiones flanqueantes de MBP1 proporciona beneficio adicional en el modo de mezcla en SUV; 5) determinar si la adición de regiones flanqueantes de MBP1 proporciona beneficio adicional en el modo de mezcla en MSL SUV; 6) comparar la actividad de MBP1/MBP1FL/MBP1FR en formulaciones de SUV de MSL mediante el uso del modelo de EAE aguda en ratas Dark Agouti (DA) hembra.

Cada una de las siete formulaciones que se están evaluando se proporcionó como un polvo liofilizado y almacenado a 4 °C. La rehidratación de cada dosis diaria del grupo se hizo con agua para inyección de acuerdo con la tabla 6. Las formulaciones de péptido MBP se resuspendieron en agua para inyección (Cure Medical) y la copaxona (Teva LTD) se diluyó con solución salina hasta una concentración final de 150 µg/ml. A cada sujeto animal se le administró formulación de ensayo durante 6 días consecutivos por inyección subcutánea.

**Tabla 6.** Protocolos de resuspensión para las formulaciones de péptido MBP en investigación.

Formulación	Acciones	Masa total (mg)	Dosificación diaria (mg)	Volumen de administración (ml)
1	Resuspendido en 15 ml	2,3	0,3	0,33
2, 3, 6, 7	Resuspendido diariamente en 2,3 ml	2664	380	0,33
4,5	Resuspendido diariamente en 6,7 ml	8016	1200	1

Se usaron ratas hembra Dark Agouti (DA) de 9 semanas de edad (Harlan Laboratories, Inc.), que pesaban entre 125

y 145 gramos, como sujetos de ensayo. El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó a la llegada. Únicamente los animales en buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio. A los animales se les proporcionó dieta de roedor proteínica (Teklad) *ad libitum* y acceso libre al agua de beber. Los animales se alojaron en un entorno controlado entre 20 °C y 24 °C con una humedad relativa de un 30-70 % y un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los animales se asignaron aleatoriamente a su grupo de ensayo respectivo. Este estudio se realizó siguiendo la revisión del Comité para Conducta Ética en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del centro médico Assaf Harofeh, Beer Yaakov, número de Comité Ético: 68/2009.

Para inducción de EAE, se inyectó por vía intradérmica a las ratas en la base de la cola un volumen total de 200 µl de inóculo que contenía 50 µg de MBP(63-81) (ANASPEC), en solución salina mezclada (1:1) con CFA, (IFA, Sigma) y 1 mg de *Mt* (cepa H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI).

Las ratas se evaluaron diariamente empezando 24 horas después de la inmunización. En el día 8 después de la inmunización, más de un 50 % de las ratas desarrollaron signos de parálisis. Los animales que presentaban síntomas de EM se separaron en 9 grupos para el inicio del tratamiento. Antes del tratamiento, se recogió sangre de dos ratas de cada grupo. en el día 9 y 10 después de la inmunización, 55 de 60 ratas desarrollaron signos de parálisis.

A los 7-10 días después de la inducción de EAE, 54 animales se dividieron en 9 grupos (6 ratas en cada uno) y se recogió sangre de 2 ratas de cada grupo antes del inicio del tratamiento. Cada grupo de ratas se trató una vez al día con la formulación de acuerdo con la tabla 7 durante 6 días consecutivos. Las formulaciones se administraron por inyección subcutánea en la zona inferior del lado abdominal. Se recogió sangre de todas las ratas 24 h después de la última inyección. Los animales se mantuvieron y se evaluaron hasta el día 28 después de la inducción de EAE. Se asignaron puntuaciones clínicas diariamente durante el periodo de estudio. Los animales se sacrificaron 28 días después de la inducción de EAE, se recogió plasma y suero sanguíneo de los corazones de las ratas. Los animales se perfundieron con PFA al 4 %, se recogió el cerebro y la médula espinal y se fijó en formaldehído al 4 %.

**Tabla 7.** Grupos de ensayo de estudio y protocolos de tratamiento.

Grupo	Número de animales	Formulación	Dosis de péptido	Frecuencia y vía
1	6	MBP1	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
2	6	SUV de MBP1	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
3	6	SUV MSL de MBP1	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
4	6	SUV MSL de MBP1/MBP1FL/MBP1FR	150 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
5	6	SUV de MBP1/MBP1FL/MBP1FR	150 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
6	6	SUV MSL de MBP1FL	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
7	6	SUV MSL de MBP1FR	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
8	6	copaxona	50 µg	Inyección s.c. diaria (6 en total)
9	6	control	Agua para inyección	Inyección s.c. diaria (6 en total)

Los animales se observaron individualmente y se registraron los signos clínicos una vez al día durante todos los periodos de estudio. Las observaciones incluyeron cambios en el pelaje, los ojos, frecuencia respiratoria, vocalización, parálisis, actividad y patrón de comportamiento. La puntuación de los signos de parálisis relacionada con EM para cada animal se realizó diariamente de acuerdo con los criterios de la tabla 8. El peso corporal de cada animal se determinó diariamente durante todos los periodos de estudio. Todos los animales con una puntuación de parálisis de más de 1 recibieron 2 ml de agua y 2 ml de dieta de roedor proteínica rehumedecida (Teklad) diariamente mediante jeringa de alimentación por sonda nasogástrica.

**Tabla 8.** Grupos de ensayo de estudio y protocolos de tratamiento.

Puntuación	Parámetros
0	Normal
1	Debilidad en la cola
2	Debilidad o parálisis en las patas posteriores
3	Parálisis de las patas posteriores, arrastre de las patas posteriores
4	Parálisis completa, incapaz de moverse
5	Muerte

Recogida de sangre durante la fase de vida: Se recogió sangre del seno orbital de ratas vivas. Se recogió sangre en

2 tipos de tubos: Tubos de EDTA y tubos Eppendorf de 2 ml. El plasma y el suero separados de cada animal se evaluaron adicionalmente para las concentraciones de citocina IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF-alfa, IFN-gamma y TGF-beta por ELISA. Recogida de sangre durante la fase de espiración: Inmediatamente después del sacrificio, se recogió sangre de los corazones de las ratas en 2 tipos de tubos: Tubos de EDTA y tubos Eppendorf de 2 ml. Se separó el suero y el plasma y se almacenó a -20 °C.

Después del sacrificio, se realizó perfusión con 0,5 l de PFA al 4 %. Inmediatamente después de la recogida de sangre, se lavó el sistema vascular con 20 ml de solución salina y se perfundieron 0,5 l de PFA usando 180-200 mmHg a través de cámara cardíaca derecha. Se recogió el cerebro y la médula espinal de cada animal y se fijó en formaldehído al 4 %. Los tejidos se recortaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron a aproximadamente 5 micrómetros de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción PAS.

#### Resultados

Como se resume en la tabla 9, se producía mortalidad en grupos tratados con MBP1 libre (grupo 1; 1/6), (grupo 2; 1/6) y grupo 3; 2/6), copaxona (grupo VIII; 2/6) y WFI (grupo IX; 2/6). A la inversa, ninguna rata murió en los grupos tratados con (grupos IV-VII, respectivamente).

15 **Tabla 9.** Tasa de mortalidad en 54 ratas DA con EAE inducida.

Grupo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tasa de mortalidad	1/6	1/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6

Se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con los otros grupos, en ratas tratadas con la formulación de péptidos de epítipo de linfocitos B MBP1/MBP1FL/MBP1FR en liposomas más manosilados (grupo IV) en los días 3 y 4 después del tratamiento (figura 6A; (x)).

Se descubrió que el aumento de peso corporal de todos los animales estaba en el intervalo de valores normalmente esperados durante el periodo de aclimatación. Se observó pérdida de peso corporal durante el pico de enfermedad en animales de todos los grupos. El aumento de peso corporal se produjo durante el periodo después del pico de enfermedad en todos los grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y los grupos de control para ninguna de las mediciones de peso corporal (figura 7).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en niveles de IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF-alfa, IFN-gamma y TGF-beta antes y después del tratamiento y entre los grupos tratados con las formulaciones ensayadas. La comparación de diferencias en los niveles de citocinas entre los grupos tratados con formulaciones de péptido MBP y los controles no fue estadísticamente significativa.

Para evaluar la mielinización en las ratas con EAE inducida tratadas con las formulaciones I-IX, se realizó examen histológico de forma enmascarada, es decir, sin conocer los animales que se trataron con dicha sustancia, mediante un único patólogo. Los resultados se compararon con la histología de un animal no tratado.

En resumen, se tiñeron todos los portaobjetos con tintes HE, ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul de Luxol rápido (LFB). Los parámetros histológicos se eligieron para caracterizar la naturaleza de las lesiones. La gliosis se puntuó de 0 a 3, de acuerdo con la siguiente escala: 0 = sin gliosis, 1 = gliosis leve (hasta 5-10 células), 2 = gliosis moderada (entre 10-50 células por foco) y 3 = gliosis grave (más de 50 células por foco). La desmielinización se puntuó de 0 a 3, de acuerdo con la siguiente escala: 0 = sin desmielinización, 1 = desmielinización leve, 2 = desmielinización moderada y 3 = desmielinización grave. No se apreciaron lesiones adicionales, de haberlas.

El análisis histopatológico de la médula espinal de 2 animales seleccionados aleatoriamente de cada grupo reveló la aparición de gliosis en todas las ratas analizadas. Sin embargo, se observó una mejora significativa en la mielinización en ambos animales del grupo IV (MBP1/MBP1FL/MBP1FR encapsulado en liposomas manosilados) y en una de las ratas del grupo V (MBP1/MBP1FL/MBP1FR encapsulado en liposomas no modificados), en comparación con animales de los otros grupos. Se muestran patrones de tinción de H&E ejemplares en las figuras 8A-C.

Este estudio demuestra que la administración de los péptidos de epítipo de linfocitos B MBP1, MBP1FL y MBP1FR coencapsulados en un liposoma manosilado provocan una reducción estadísticamente significativa en la parálisis en modelos de roedor de EM. Este estudio examina la eficacia de diversas secuencias peptídicas: MBP1, MBP1FL y MBP1FR en una composición liposómica (composición lipídica manosilada al 1 % molar a una relación de péptido a lípido a 1:330). La formulación liposómica de los tres péptidos tiene respuesta significativamente eficaz (grupo 4) en comparación con los péptidos individuales en solitario (grupos 2, 3, 6 y 7) el control negativo (grupo 9). Por comparación, los tres péptidos juntos en una composición liposómica sin el lípido de manosa al 1 % molar (grupo 5 frente a grupo 4) no mostró eficacia significativa, lo que indica una respuesta potenciada por la inclusión del lípido manosilado. La puntuación global de enfermedad fue comparable para el péptido MBP1 en solitario (grupo 1) o formulado liposómicamente (grupo 2); sin embargo, el análisis histopatológico para la gliosis y la mielinización de médulas espinales recogidas de 2 ratas seleccionadas aleatoriamente de cada grupo demuestra una baja

puntuación de desmielinización, que indica un resultado patológico mejorado para la formulación liposómica del péptido MBP1 en solitario (grupo 2). La mejor puntuación (es decir, más baja) de desmielinización se obtuvo por la administración de la formulación liposómica de los tres péptidos MBP (grupo 4), que también produjo una mejora significativa en la puntuación global de enfermedad.

5 **Ejemplo 13 - Eficacia terapéutica de péptidos MBP encapsulados liposómicamente en un modelo de rata de EM (DA-EAE-28-02)**

Para evaluar adicionalmente el uso de péptidos de epítipo de linfocitos B de MBP para el tratamiento de EM, se realizó un estudio en ratas DA con EAE inducida. Las formulaciones liposómicas manosiladas de diversas combinaciones de péptidos MBP MBP1, MBP1FL, MBP1FR, MBP2 y MBP3 se ensayaron para su potencial terapéutico en el modelo de EM de rata DA con EAE inducida, descrito anteriormente.

Cada una de las ocho formulaciones de péptido MBP se proporcionó como un polvo liofilizado y se almacenó a 4 °C. La rehidratación de cada formulación con agua para inyección se hizo diariamente de acuerdo con la tabla 10. Las formulaciones de péptido MBP se resuspendieron en agua para inyección (Cure Medical) y la copaxona (Teva LTD) se diluyó con solución salina hasta una concentración final de 450 µg/ml. A cada sujeto animal se le administró formulación de ensayo durante 6 días consecutivos por inyección subcutánea.

**Tabla 10.** Protocolos de resuspensión para las formulaciones de péptido MBP en investigación.

Formulación	Acciones	Masa total (mg)	Dosis diaria por grupo (mg/día)	Volumen de administración (ml)
MBP F1	Resuspendido diariamente en 7,08 ml	11133	1417	1,01
MBP F2	Resuspendido diariamente en 2,36 ml	4384	472	0,34
MBP F3F4	Resuspendido diariamente en 9,60 ml	19328	1919	1,03/0,34
MBP F5	Resuspendido diariamente en 2,36 ml	4986	472	0,34
MBP F6	Resuspendido diariamente en 2,35 ml	4910	471	0,34
MBP F7	Resuspendido diariamente en 7,05 ml	14712	1411	1,01
MBP F8	Resuspendido diariamente en 11,86 ml	19987	2371	1,69

se usaron ratas hembra de 8-9 semanas de edad Dark Agouti (DA) (Harlan Laboratories, Inc.), que pesaban entre 110 y 145 gramos, como sujetos de ensayo. El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó a la llegada. Únicamente los animales en buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio. Se proporcionó a los animales alimento *ad libitum* y acceso libre al agua de beber. Los animales se alojaron en un entorno controlado entre 20 °C y 24 °C con una humedad relativa de un 30-70 % y un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los animales se asignaron aleatoriamente a su grupo de ensayo respectivo. Este estudio se realizó siguiendo la revisión del Comité para Conducta Ética en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del centro médico Assaf Harofeh, Beer Yaakov, número de Comité Ético: 830\_b2451\_6.

Para inducción de EAE, a las ratas se les inyectó por vía intradérmica en la base de la cola un volumen total de 200 µl de inóculo que contenía 50 µg de MBP(63-81) (ANASPEC), en solución salina mezclada (1:1) con CFA, (IFA, Sigma) y 1 mg de Mt (cepa H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI).

Las ratas se evaluaron diariamente empezando 24 horas después de la inmunización. En el día 9 después de la inmunización, más de un 50 % de las ratas desarrollaron signos de parálisis. Los animales que presentaban síntomas de EM se separaron en 10 grupos para el inicio del tratamiento. Antes del tratamiento, se recogió sangre de dos ratas de cada grupo. en el día 9 y 11 después de la inmunización, 54 de 60 ratas desarrollaron signos de parálisis.

9-11 días después de la inducción de EAE, 54 animales se dividieron en 10 grupos (5 -6 ratas en cada uno) y se recogió sangre de 2 ratas de cada grupo antes del inicio del tratamiento. Cada grupo de ratas se trató una vez al día con la formulación de acuerdo con la tabla 11 durante 6 días consecutivos. Los animales se mantuvieron y se evaluaron hasta el día 28 después de la inducción de EAE. Se asignaron puntuaciones clínicas diariamente durante el periodo de estudio. Los animales se sacrificaron 28 días después de la inducción de EAE usando isoflurano. Inmediatamente después del sacrificio, se recogió sangre de los corazones de las ratas. Se separó el suero y el plasma y se almacenó a -20 °C. Los animales se perfundieron con PFA al 4 %, se recogió el cerebro y la médula espinal y se fijó en formaldehído al 4 %.

Tabla 11. Grupos de ensayo de estudio y protocolos de tratamiento.

Grupo	Número de animales	Formulación	Dosis diaria por grupo (mg/día)	Volumen diario (ml)	Volumen de administración (ml)	Frecuencia y vía
1	5	MBP F1	1417	7,085	1,01	Inyección s.c. diaria (6 en total)
2	5	MBP F2	472	2,361	0,34	Inyección s.c. diaria (6 en total)
3	5	MBP F3F4	1919	9,595	0,34	Inyección s.c. diaria (6 en total)
4	5	MBP F3F4			1,03	Inyección s.c. diaria (6 en total)
5	6	MBP F5	472	2,358	0,34	Inyección s.c. diaria (6 en total)
6	6	MBP F6	471	2,354	1,01	Inyección s.c. diaria (6 en total)
7	6	MBP F7	1411	7,054	1,69	Inyección s.c. diaria (6 en total)
8	6	MBP F8	2371	11,857	1,69	Inyección s.c. diaria (6 en total)
9	5	Copaxona	2,5	5	0,33	Inyección s.c. diaria (6 en total)
10	5	Agua para inyección	-	0,33	0,33	Inyección s.c. diaria (6 en total)

Los animales se observaron individualmente y se registraron los signos clínicos una vez al día durante todos los periodos de estudio. Las observaciones incluyeron cambios en el pelaje, los ojos, frecuencia respiratoria, vocalización, parálisis, actividad y patrón de comportamiento. La puntuación de los signos de parálisis relacionada con EM para cada animal se realizó diariamente de acuerdo con los criterios de la tabla 8. El peso corporal de cada animal se determinó diariamente durante todos los periodos de estudio. Todos los animales con una puntuación de parálisis de más de 1 recibieron 2 ml de agua y 2 ml de dieta de roedor proteínica rehumedecida (Teklad) diariamente mediante jeringa de alimentación por sonda nasogástrica.

#### Resultados

- 10 Como se resume en la tabla 12, murió 1 rata de cada grupo tratado con MBP2 encapsulado liposómicamente libre (grupo V; 1/6), copaxona (grupo IX; 1/5) y WFI (grupo X; 1/5).

**Tabla 12.** Tasa de mortalidad en 54 ratas DA con EAE inducida.

Grupo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Tasa de mortalidad	0/5	0/5	0/5	0/5	1/6	0/6	0/6	0/6	1/5	1/5

- 15 Se observó una reducción estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con el grupo de control de agua (grupo X), en ratas tratadas con una alta dosis de péptido MBP1 encapsulado liposómicamente (grupo IV) a los 2 y 3 días después del tratamiento (figura 10 ( $\Delta$ )).

- 20 Se descubrió que el aumento de peso de todos los animales estaba dentro del intervalo de los valores esperados durante el periodo de aclimatación. Se observó pérdida de peso durante el pico de enfermedad en animales de todos los grupos. El aumento de peso se produjo durante el periodo después del pico de enfermedad en todos los grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a los que se administraron péptidos MBP encapsulados liposómicamente y los grupos de control (figura 11).

- 25 Con la excepción del grupo 2, el estudio ensayó una única formulación liposómica (composición de lípido con manosa al 1 % molar y una relación de péptido a lípido a 1:330) y se examinó la eficacia terapéutica de diversos péptidos MBP de epítipo de linfocitos B, y combinaciones de los mismos. De forma notable, se observó una reducción estadísticamente significativa en la parálisis de las ratas tratadas con 200  $\mu$ g (nominal) de MBP(46-62) encapsulado liposómicamente (grupo 4), en comparación con el control negativo. Además, se observó una diferencia no estadísticamente significativa (tendencia) en la parálisis de ratas tratadas con 200 mg de MBP(46-62) encapsulado liposómicamente (grupo 4), en comparación con las ratas tratadas con copaxona (grupo 9), en los días 4 y 5 después del tratamiento.

El perfil de gravedad de la enfermedad observado en este estudio tenía distintas fases primarias y de recidiva.

Cuando se comparan los resultados en ratas tratadas con la misma dosis (50 µg/día) de péptidos MBP individuales encapsulados liposómicamente, se descubrió que la administración de MBP(46-62) (grupo III) proporcionaba el máximo beneficio terapéutico en la fase de enfermedad primaria, mientras que la administración de MBP (124-139) encapsulado liposómicamente (grupo V) o MBP(147-170) (grupo VI) proporcionaba beneficio terapéutico durante la fase de enfermedad de recidiva. Este sesgo no se observó como absoluto y puede quedar invalidado por la dosis de péptido, ya que la administración de MBP(46-62) encapsulado liposómicamente de alta dosis (grupo 4) es la más eficaz entre ambas fases. El beneficio terapéutico de formulaciones liposómicas que contienen múltiples péptidos MBP es más difícil de interpretar, posiblemente debido a la baja dosis de cada péptido respectivo. Con respecto al uso del mismo péptido formulado a diferentes relaciones de péptido a lípido (compárense los grupos I y II), no se observó diferencia en la puntuación global de gravedad de la enfermedad.

**Ejemplo 14 - Eficacia terapéutica de péptidos MBP encapsulados liposómicamente en un modelo de rata de EM (DA-EAE-28-05)**

Para evaluar adicionalmente el uso de péptidos de epítipo de linfocitos B de MBP para el tratamiento de EM, se realizó un estudio en ratas DA con EAE inducida. Los objetivos del estudio incluían: 1) confirmación adicional de que las formulaciones liposómicas de MBP1 en solitario y MBP1/2/3 proporcionan un beneficio terapéutico en un modelo de rata de EM; y 2) examen del efecto terapéutico de diferentes dosificaciones y relaciones de péptido a lípido para las formulaciones de MBP liposómicas.

Cada una de las cuatro formulaciones de péptido MBP que se están evaluando se proporcionaron como polvos liofilizados y almacenados a 4 °C. Cada formulación se rehidrató en agua para inyección de acuerdo con la tabla 13. La copaxona (Teva LTD) se diluyó con solución salina hasta una concentración final de 720 µg/ml. A cada sujeto animal se le administró formulación de ensayo durante 6 días consecutivos por inyección subcutánea.

**Tabla 13.** Protocolos de resuspensión para las formulaciones de péptido MBP en investigación.

Formulación	Acciones	Masa total (mg)	Volumen de administración (ml)
MBP F I	Resuspendido diariamente en 1,5 ml	300	0,21
MBP F II	Resuspendido diariamente en 4,5 ml	900	0,63
MBP F III	Resuspendido diariamente en 0,7 ml	140	0,1
MBP F IV	Resuspendido diariamente en 2,0 ml	400	0,26

se usaron ratas hembra de 8-9 semanas de edad Dark Agouti (DA) (Harlan Laboratories, Inc.), que pesaban entre 110 y 145 gramos, como sujetos de ensayo. El estado de salud de los animales usados en este estudio se examinó a la llegada. Únicamente los animales en buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio. Se proporcionó a los animales alimento *ad libitum* y acceso libre al agua de beber. Los animales se alojaron en un entorno controlado entre 20 °C y 24 °C con una humedad relativa de un 30-70 % y un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los animales se asignaron aleatoriamente a su grupo de ensayo respectivo. Este estudio se realizó siguiendo la revisión del Comité para Conducta Ética en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del LTD de ciencia en acción, Rehovot. número de Comité Ético: IL-10-11-109.

Para inducción de EAE, a las ratas se les inyectó por vía intradérmica en la base de la cola un volumen total de 200 µl de inóculo que contenía 50 µg de MBP(63-81) (ANASPEC), en solución salina mezclada (1:1) con CFA, (IFA, Sigma) y 1 mg de Mt (cepa H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI).

Las ratas se evaluaron diariamente empezando 24 horas después de la inmunización. 42 de 50 ratas desarrollaron signos de parálisis en los días 6 y -10 después de la inmunización. Los animales que presentaban síntomas de EM se separaron en 7 grupos (6 ratas en cada uno) para el inicio del tratamiento. Cada grupo de ratas se trató una vez al día con la formulación de acuerdo con la tabla 14 durante 6 días consecutivos. Las formulaciones se administraron por inyección subcutánea en la zona inferior del lado abdominal. Se recogió sangre de todas las ratas 24 h después de la última inyección. Los animales se mantuvieron y se evaluaron hasta el día 28 después de la inducción de EAE. Se asignaron puntuaciones clínicas diariamente durante el periodo de estudio. Los animales se sacrificaron 28 días después de la inducción de EAE, se recogió plasma y suero sanguíneo de los corazones de las ratas. Los animales se perfundieron con PFA al 4 %, se recogió el cerebro y la médula espinal y se fijó en formaldehído al 4 %.

**Tabla 14.** Grupos de ensayo de estudio y protocolos de tratamiento.

Grupo	Número de animales	Formulación	Dosis de péptido (µg)	Frecuencia y vía
1	6	control	Agua para inyección	Inyección s.c. diaria (6 en total)
2	6	MBP F-I	150	Inyección s.c. diaria (6 en total)
3	6	MBP F-II	450	Inyección s.c. diaria (6 en total)
4	6	MBP F-III	150	Inyección s.c. diaria (6 en total)
5	6	MBP F-IV	450	Inyección s.c. diaria (6 en total)
6	6	Copaxona	450	Inyección s.c. diaria (6 en total)

Los animales se observaron individualmente y se registraron los signos clínicos una vez al día durante todos los periodos de estudio. Las observaciones incluyeron cambios en el pelaje, los ojos, frecuencia respiratoria, vocalización, parálisis, actividad y patrón de comportamiento. La puntuación de los signos de parálisis relacionada con EM para cada animal se realizó diariamente de acuerdo con los criterios de la tabla 8. El peso corporal de cada animal se determinó diariamente durante todos los periodos de estudio.

*Resultados*

Ninguna rata murió antes del día 28 después de la inducción de EAE, en este estudio.

Se observaron reducciones estadísticamente significativa en la puntuación de parálisis, en comparación con el control de agua (grupo 1) en ratas tratadas con: péptido MBP1 formulado a 1:330 (péptido:lípido; grupo 2) y péptidos MBP1/2/3 formulados a 1:330 (péptido:lípido; grupo 3) y 1:110 (péptido:lípido; grupo 5, en los días 1-4 después del tratamiento (figura 12). Se observó una diferencia no estadísticamente significativa (tendencia) en la parálisis de las ratas con copaxona (grupos 6 y 7), en comparación con el control de agua (grupo 1).

Se descubrió que el aumento de peso de todos los animales estaba dentro del intervalo de los valores esperados durante el periodo de aclimatación. Se observó pérdida de peso durante el pico de enfermedad en animales de todos los grupos. El aumento de peso se produjo durante el periodo después del pico de enfermedad en todos los grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a los que se administraron péptidos MBP encapsulados liposómicamente y los grupos de control (figura 13).

Este estudio muestra que el tratamiento con el péptido MBP1 de epítipo de linfocitos B formulado liposómicamente y los péptidos MBP1/2/3 de epítipo de linfocitos B coformulados liposómicamente proporciona beneficio terapéutico estadísticamente significativo en un modelo de rata de EM. A mayores relaciones de péptido a lípido, las coformulaciones de MBP1/2/3 parecen proporcionar mayor efecto terapéutico que el péptido MBP1 en solitario. A la inversa, a relaciones inferiores de péptido a lípido, parece que las formulaciones de MBP1 en solitario proporcionan mayor efecto terapéutico que las coformulaciones de MBP1/2/3. En ambos casos, sin embargo, los péptidos MBP1 formulados liposómicamente proporcionaron mayor beneficio terapéutico que copaxona, un agente terapéutico aprobado para el tratamiento de esclerosis múltiple recidivante-remite.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son con fines ilustrativos únicamente y que se sugieren diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la materia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED  
 GABIVOV, Alexander  
 BELOGUROV, Alexey  
 PONOMARENKO, Natalia  
 SMIRNOV, Ivan  
 BACON, Andrew  
 GREGORIADIS, Gregory

<120> LIPOSOMAS QUE CONTIENEN FRAGMENTOS OLIGOPEPTÍDICOS DE PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA, UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y UN PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

<130> P39946WO

<140> Presentada junto con la presente

<141> 11/04/2013

<150> US 13/444.788

<151> 11/04/2012

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido MBP

ES 2 718 336 T3

<400> 1

Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His  
 1 5 10 15

His

<210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> péptido MBP

<400> 2

Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys  
 1 5 10 15

10

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> péptido MBP

<400> 3

Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 20

20

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento peptídico encefalitogénico de MBP

25

<400> 4

Ala Arg Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln Arg Ser  
 1 5 10 15

Gln

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> un péptido prototipo

<400> 5

ES 2 718 336 T3

Asp Glu Asn Pro Val Val Ile Ile Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro  
 1 5 10 15

Arg Thr

5 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmentos de MBP

<400> 6

Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg His  
 1 5 10

10 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> fragmentos de MBP

<400> 7

Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val  
 1 5 10

20 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmentos de MBP

<400> 8

Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala  
 1 5 10 15

25 Arg Arg

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> MBP1FL

<400> 9

Arg Thr Gly Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly Asp  
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Pro Lys  
 20

35 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT

ES 2 718 336 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MBP1FR

<400> 10

Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His  
1 5 10 15

5

Tyr Gly Ser

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido MBP (43-64)

<400> 11

Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys  
1 5 10 15

Asp Ser His His Pro Ala  
20

15

<210> 12

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido MBP (115-170)

20

<400> 12

Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly  
1 5 10 15

Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp  
20 25 30

Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser  
35 40 45

Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
50 55

25

<210> 13

<211> 304

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> isoformas de corte y empalme de MBP

<400> 13

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser  
1 5 10 15

ES 2 718 336 T3

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu  
 20 25 30  
 Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu  
 35 40 45  
 Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val  
 50 55 60  
 Thr Asp Ser Lys Arg Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Trp Gln Asp Ala  
 65 70 75 80  
 His Pro Ala Asp Pro Gly Ser Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser  
 85 90 95  
 Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser  
 100 105 110  
 Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser  
 115 120 125  
 Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His  
 130 135 140  
 Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly  
 165 170 175  
 Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys  
 180 185 190  
 Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln  
 195 200 205  
 Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe  
 210 215 220  
 Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg  
 245 250 255  
 Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His  
 260 265 270

ES 2 718 336 T3

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe  
 275 280 285

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 290 300

<210> 14  
 <211> 197  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> isoformas de corte y empalme de MBP

<400> 14

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser  
 1 5 10 15

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu  
 20 25 30

Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu  
 35 40 45

Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val  
 50 55 60

Thr Asp Ser Lys Arg Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Trp Gln Asp Ala  
 65 70 75 80

His Pro Ala Asp Pro Gly Ser Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser  
 85 90 95

Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser  
 100 105 110

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser  
 115 120 125

Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His  
 130 135 140

Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His  
 145 150 155 160

Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly  
 165 170 175

ES 2 718 336 T3

Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys  
 180 185 190

Val Ser Ser Glu Glu  
 195

- <210> 15
- <211> 197
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> isoformas de corte y empalme de MBP

<400> 15

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly  
 35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys  
 50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu  
 65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr  
 85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro  
 100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro  
 115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly  
 130 135 140

Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp  
 145 150 155 160

Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr  
 165 170 175

Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser

180 185 190

Pro Met Ala Arg Arg  
 195

ES 2 718 336 T3

<210> 16  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> isoformas de corte y empalme de MBP  
 <400> 16

```

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1          5          10        15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
          20          25          30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
          35          40          45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
          50          55          60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65          70          75          80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
          85          90          95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
          100         105         110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
          115         120         125

Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly
130          135          140

Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val
145          150         155         160

Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp
          165         170         175

Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
          180         185
    
```

10 <210> 17  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> isoformas de corte y empalme de MBP

ES 2 718 336 T3

<400> 17

```

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1           5           10           15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
          20           25           30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
          35           40           45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro
          50           55           60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg
65           70           75           80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
          85           90           95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu
          100          105          110

Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr
          115          120          125

Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly
          130          135          140

Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg
145          150          155          160

Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
          165          170

```

<210> 18

<211> 160

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> isoformas de corte y empalme de MBP

<400> 18

5

ES 2 718 336 T3

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly  
 35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro  
 50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg  
 65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr  
 85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg  
 100 105 110

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His  
 115 120 125

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe  
 130 135 140

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 145 150 155 160

<210> 19

<211> 74

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> isoformas de corte y empalme de MBP

<400> 19

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Ser Leu Pro Gln  
 20 25 30

Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe  
 35 40 45

ES 2 718 336 T3

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly  
50 55 60

Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp  
65 70

5 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> epitopo MBP

<400> 20

Arg His Gly Phe Leu Pro Arg His Arg  
1 5

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en medicina, consistiendo la composición en dos péptidos de proteína básica de mielina (MBP) ligados a un vector, consistiendo el primer péptido MBP en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y consistiendo el segundo péptido MBP en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y comprendiendo el vector un liposoma que tiene un resto de dirección expuesto en superficie que comprende un residuo de manosa manDOG.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que uno o más de los péptidos MBP está ligado covalentemente al vector.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que uno o más de los péptidos MBP está ligado no covalentemente al vector.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto de dirección aumenta:
- (a) el suministro del péptido MBP a una célula inmunitaria; o  
(b) la captación del péptido MBP en una célula inmunitaria;
- 15 en comparación con un péptido MBP ligado a un vector en ausencia de un resto de dirección.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los péptidos MBP están encapsulados por el liposoma.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el liposoma tiene un diámetro promedio de 100 nm a 200 nm.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple en un paciente que lo necesite.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición está en una forma de dosificación semanal.
- 25 9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición está en una forma de dosificación diaria.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la composición está en una forma adecuada para administración tópica, administración entérica o administración parenteral.
- 30 11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recidivante remitente (RRMS), esclerosis múltiple secundaria progresiva (SPMS), esclerosis múltiple primaria progresiva (PPMS) o esclerosis múltiple progresiva recidivante (PRMS).
12. Un procedimiento de preparación de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
- 35 (i) mezclar el residuo de manosa manDOG con un lípido en presencia de un disolvente orgánico;  
(ii) evaporar el disolvente orgánico, formando de este modo capas lipídicas irregulares;  
(iii) rehidratar las capas lipídicas irregulares de la etapa (ii) para obtener vesículas multilaminares multiestratificadas (MLV);  
(iv) homogeneizar la MLV de la etapa (iii) para obtener vesículas unilaminares pequeñas (SUV);
- 40 (v) mezclar las SUV de la etapa (iv) con los dos péptidos MBP y exceso de azúcar, y liofilizar la mezcla;  
(vi) rehidratar la mezcla de la etapa (v) para obtener SUV que tienen un diámetro promedio de aproximadamente 60 a 100 nm.

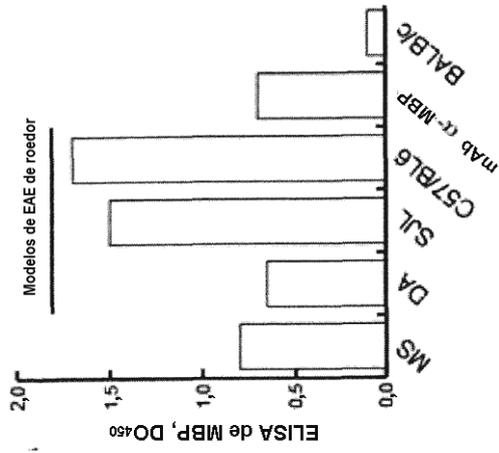


FIGURA 1B

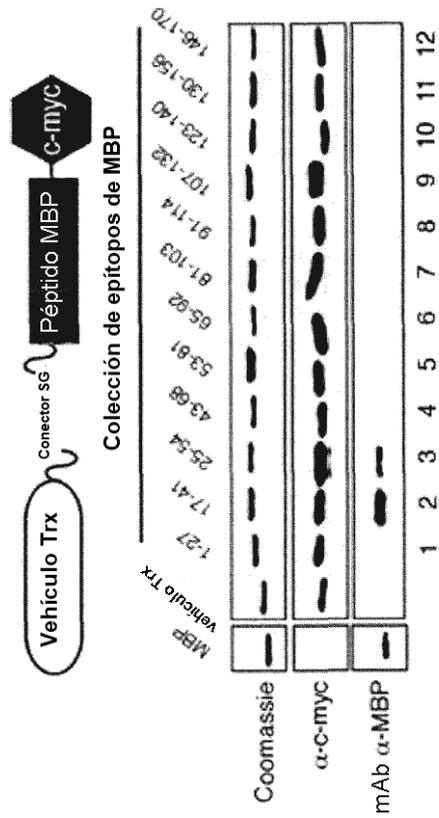


FIGURA 1A

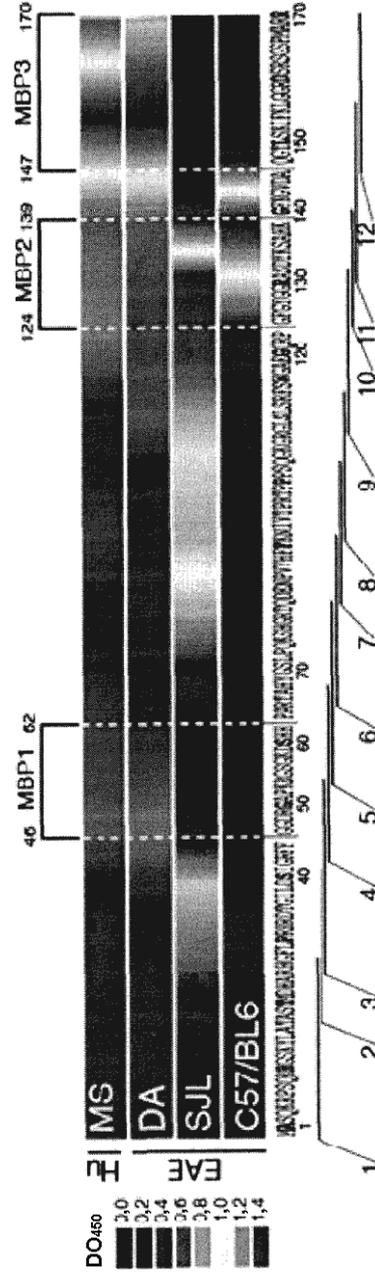


FIGURA 1C

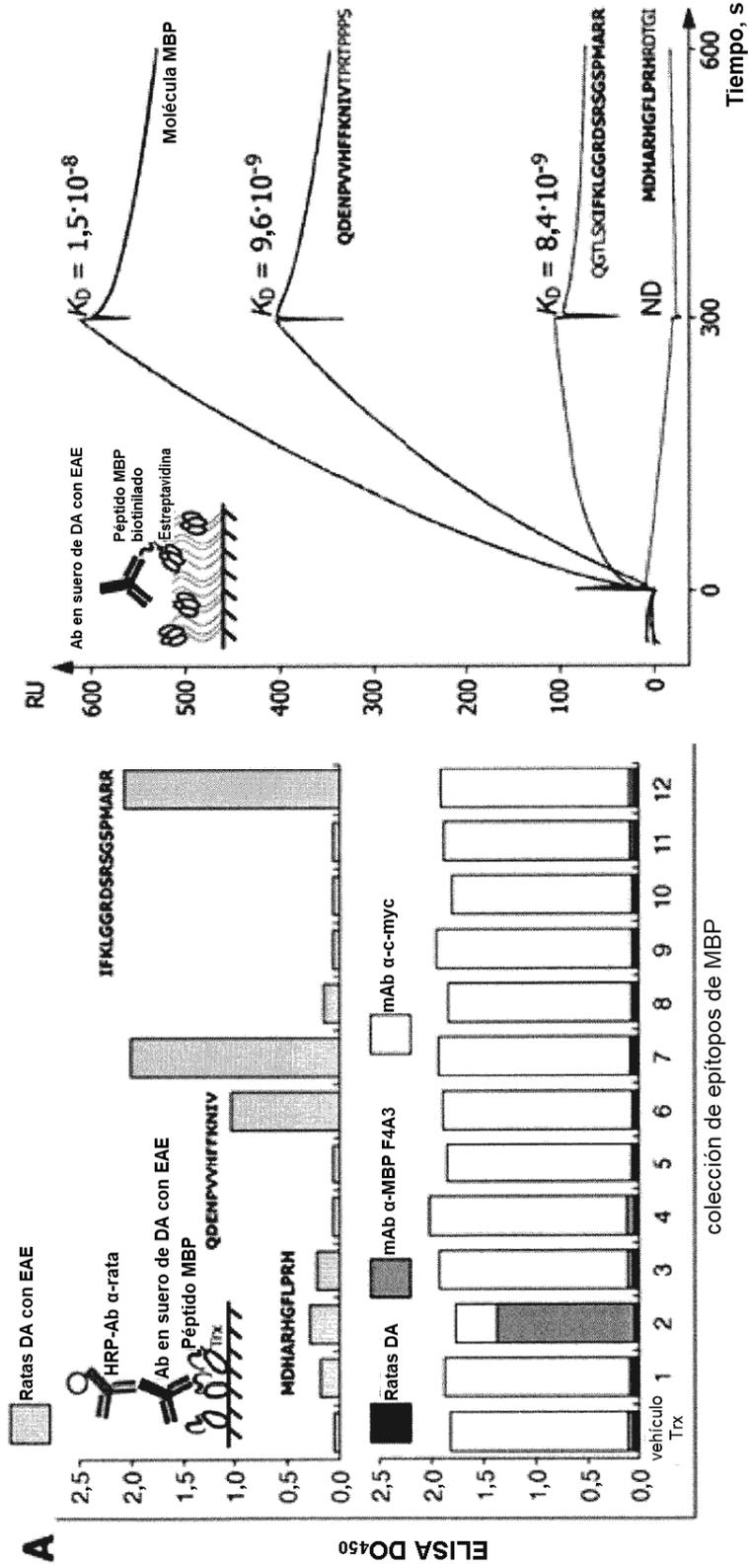


FIGURA 2B

FIGURA 2A

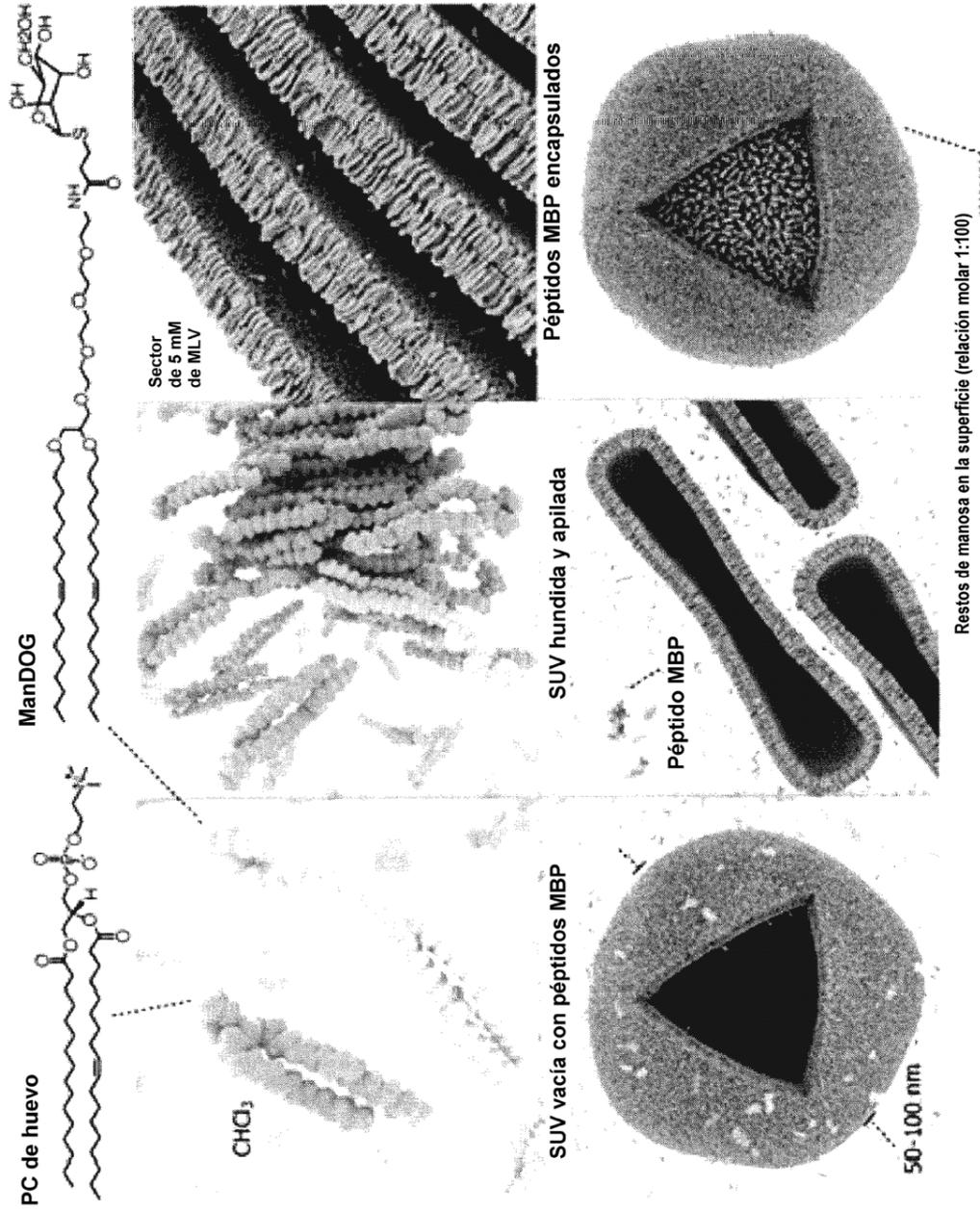
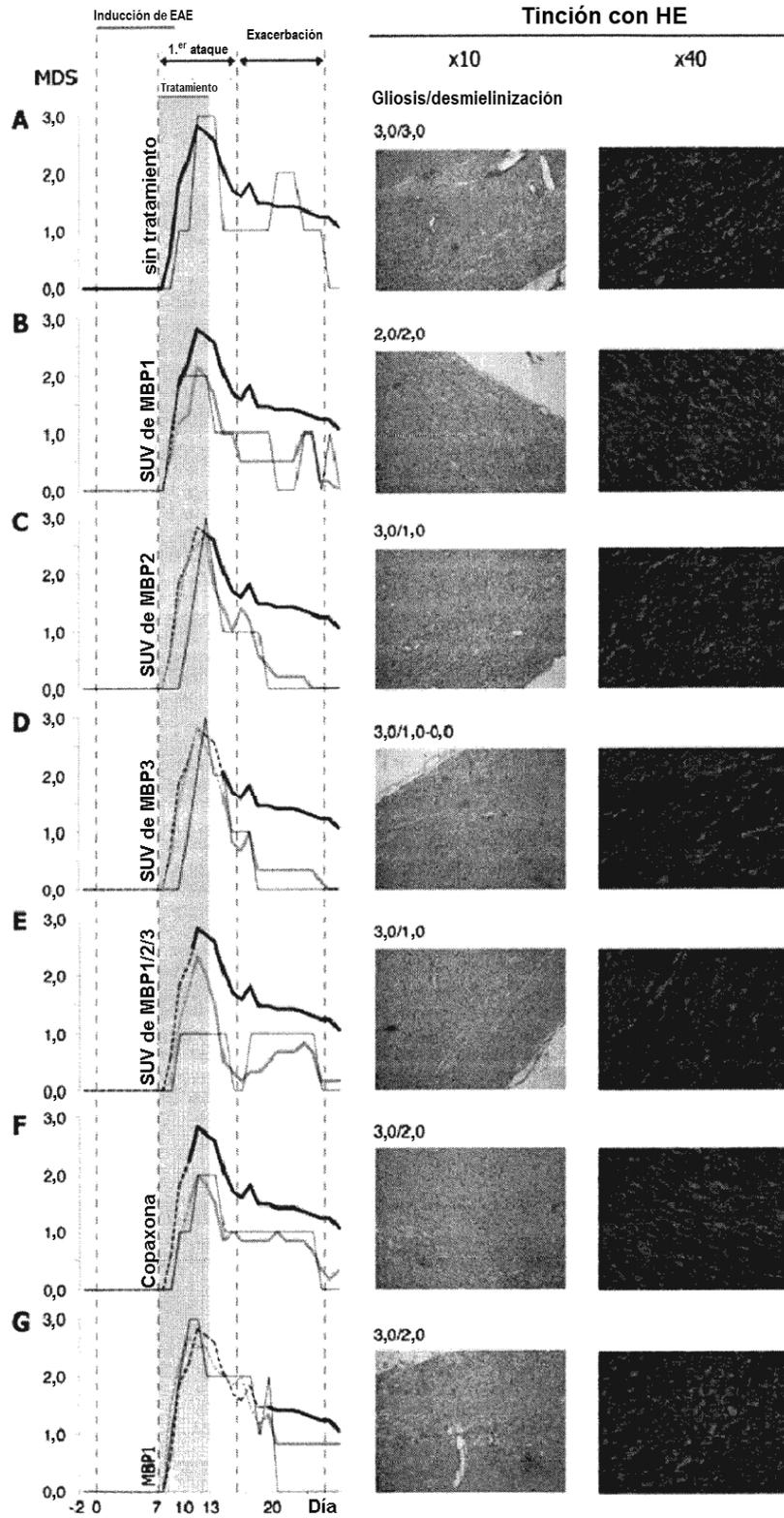
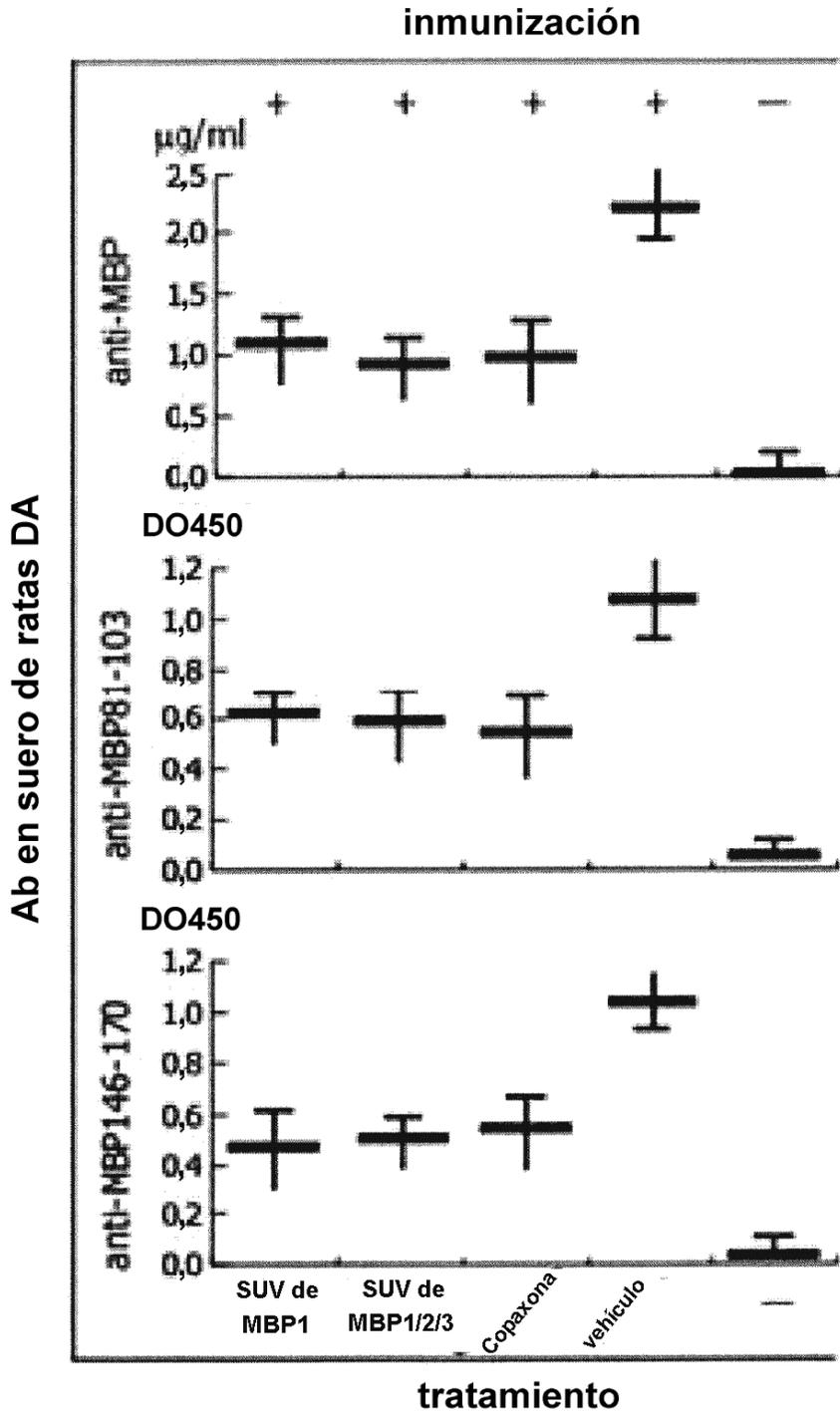


FIGURA 3



**FIGURA 4**



**FIGURA 5A**

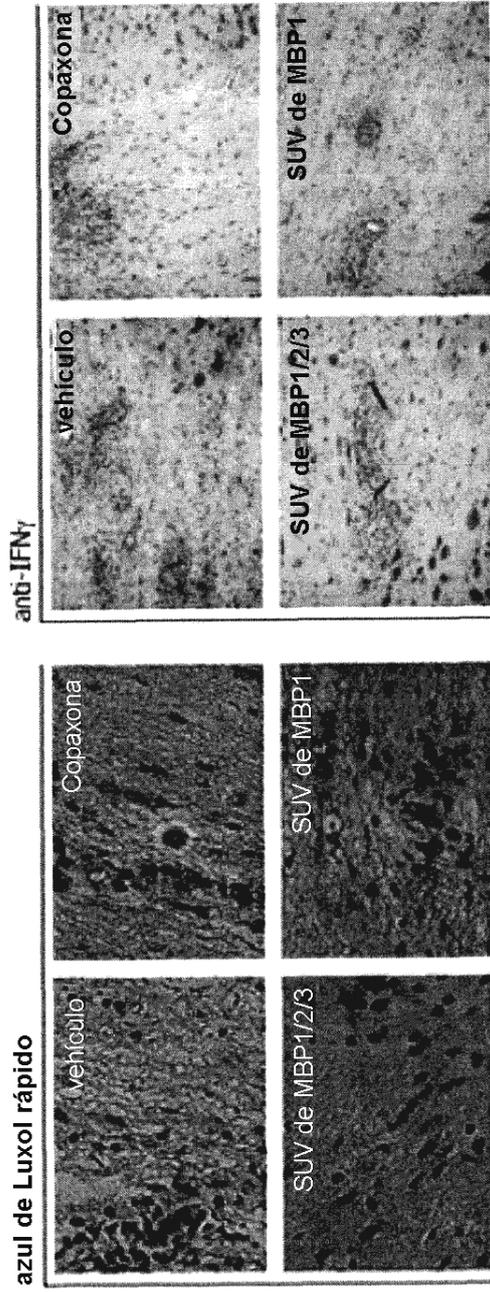


FIGURA 5B

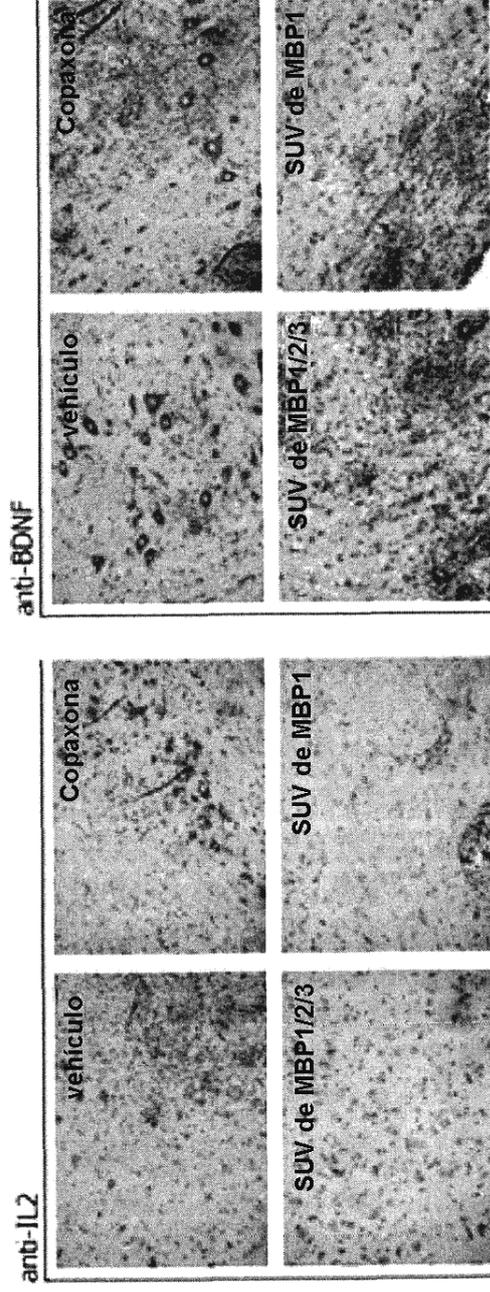


FIGURA 5D

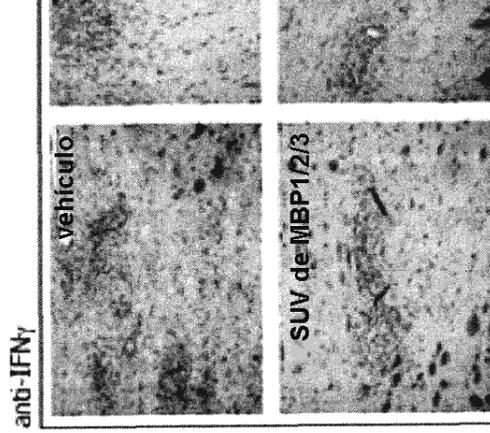


FIGURA 5C

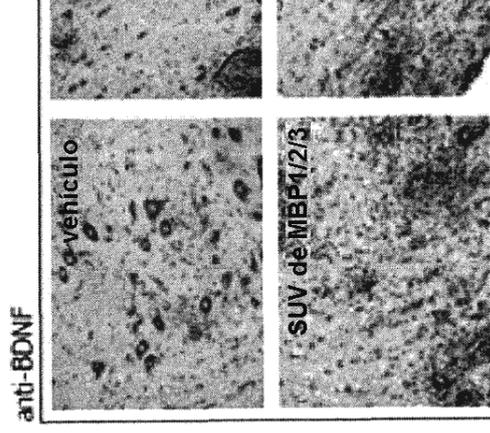


FIGURA 5E

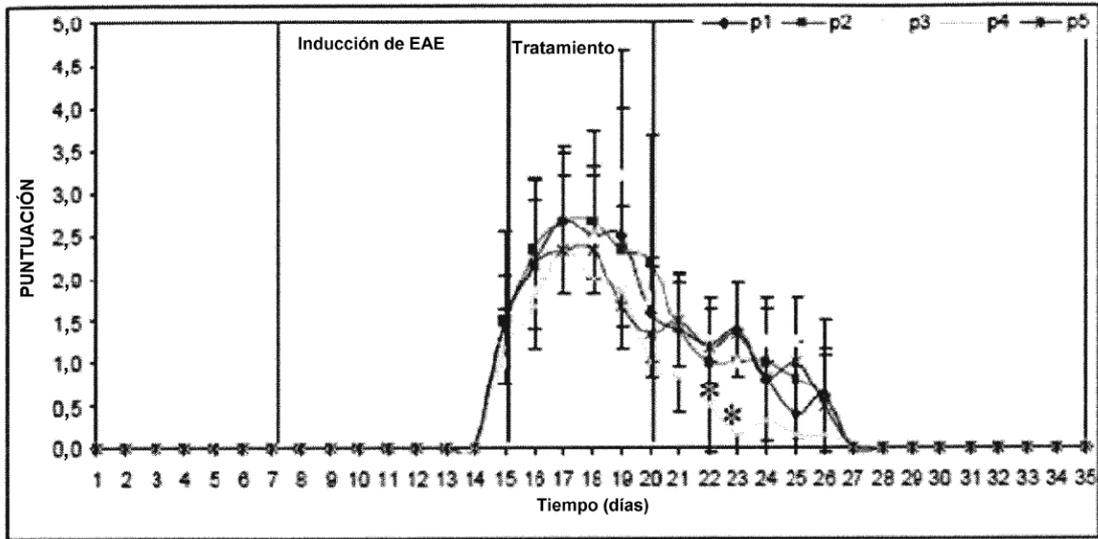


FIGURA 6A

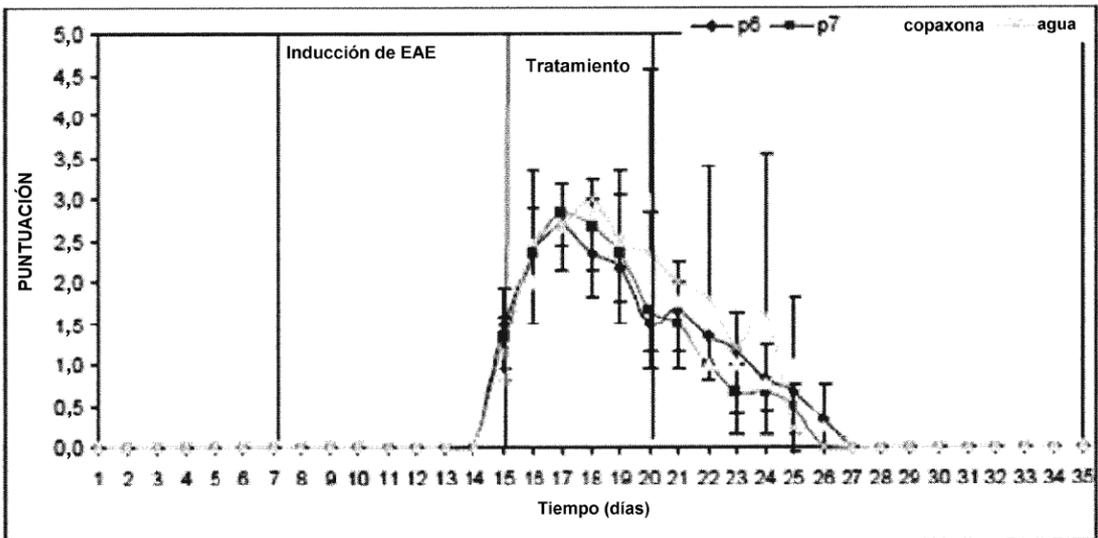


FIGURA 6B

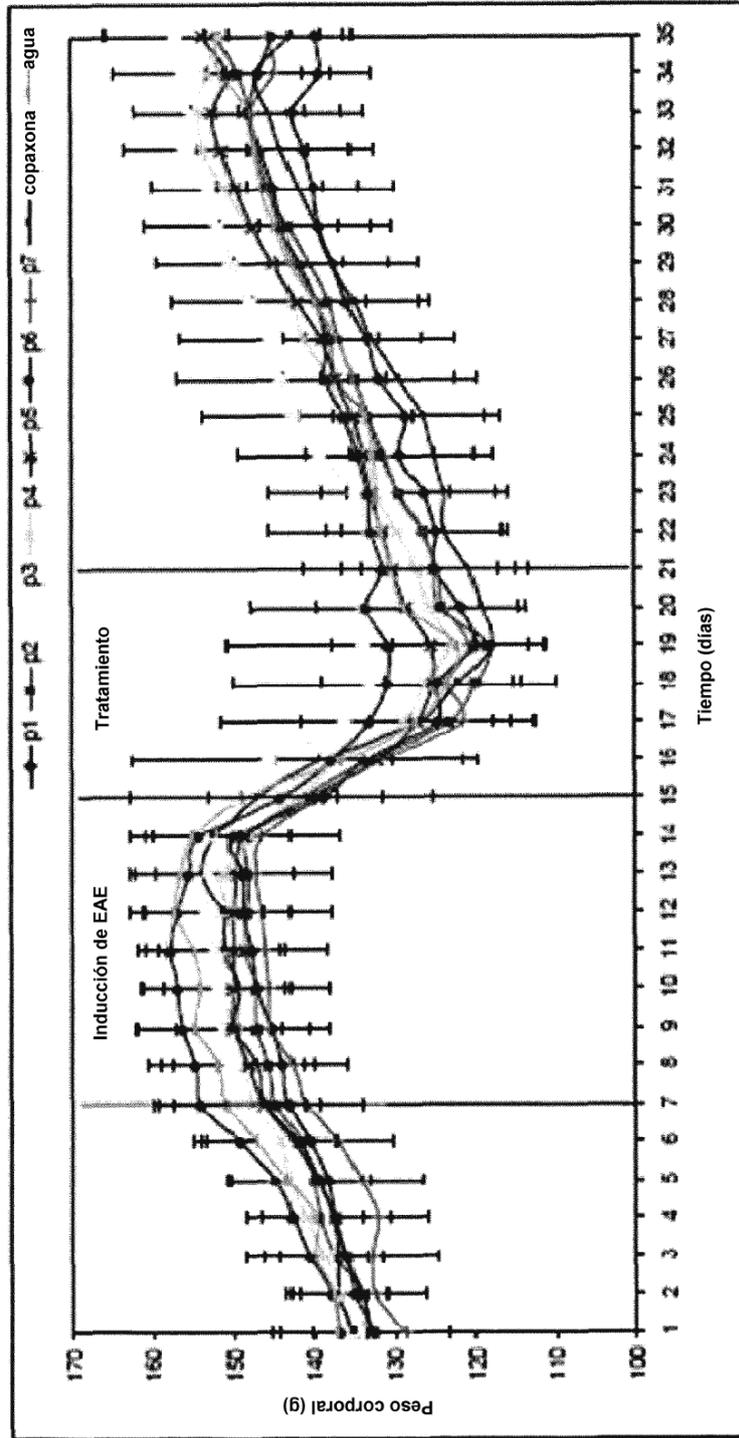
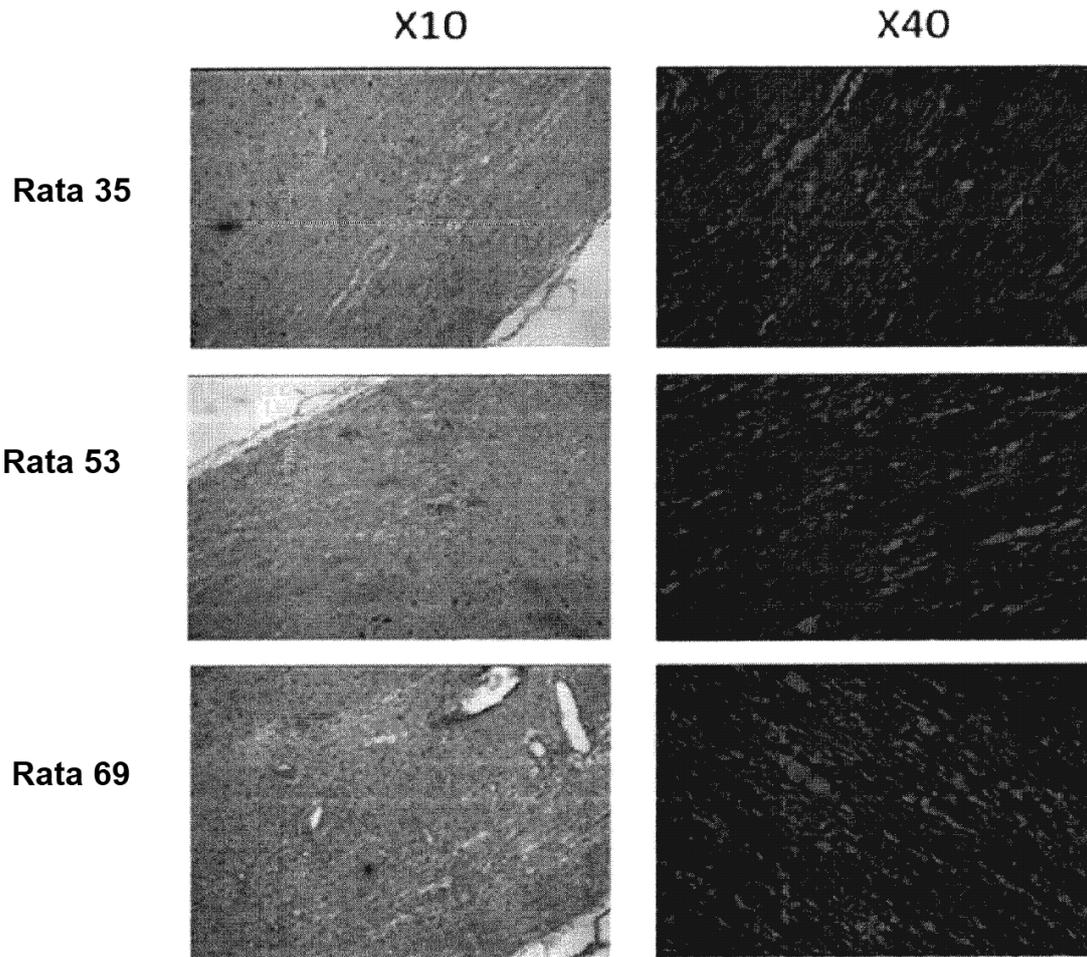


FIGURA 7



**FIGURA 8A**

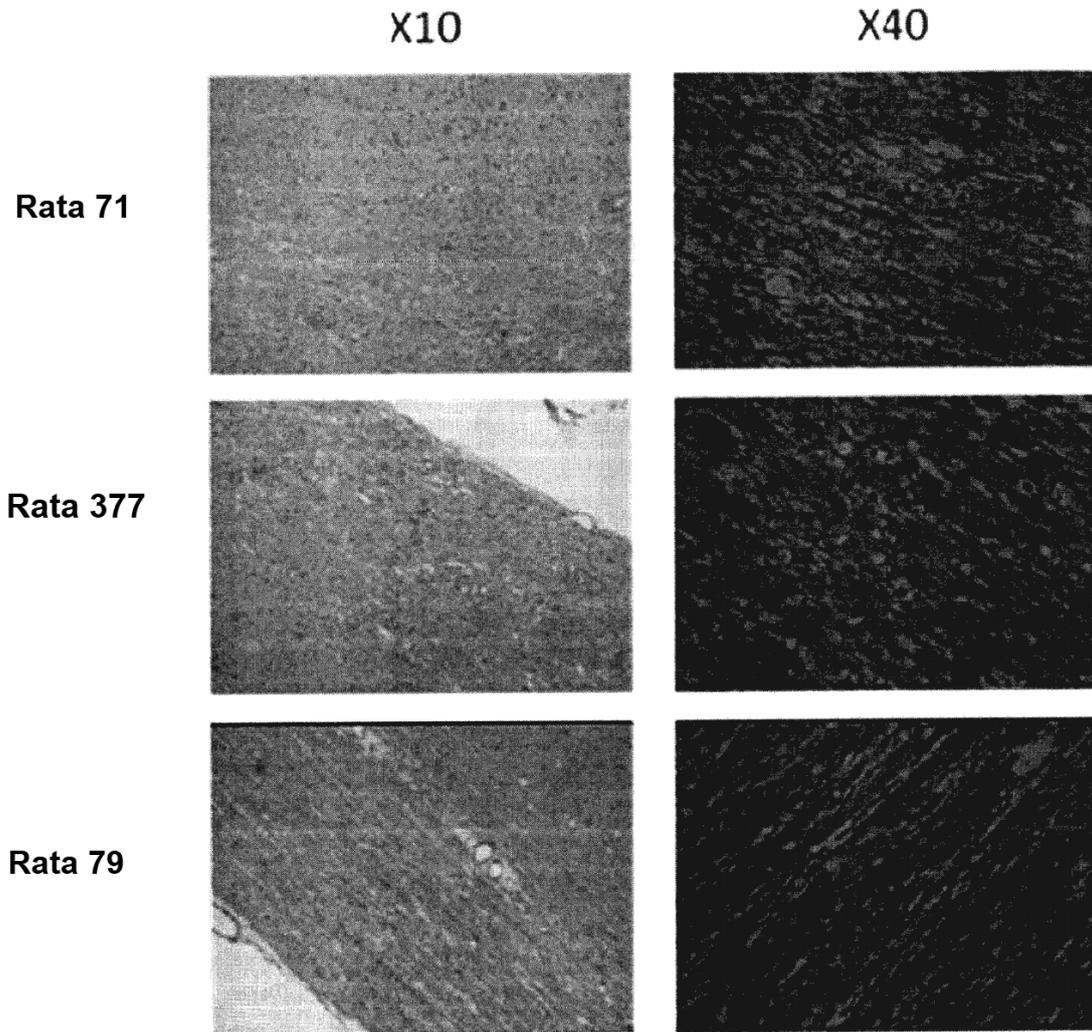


FIGURA 8B

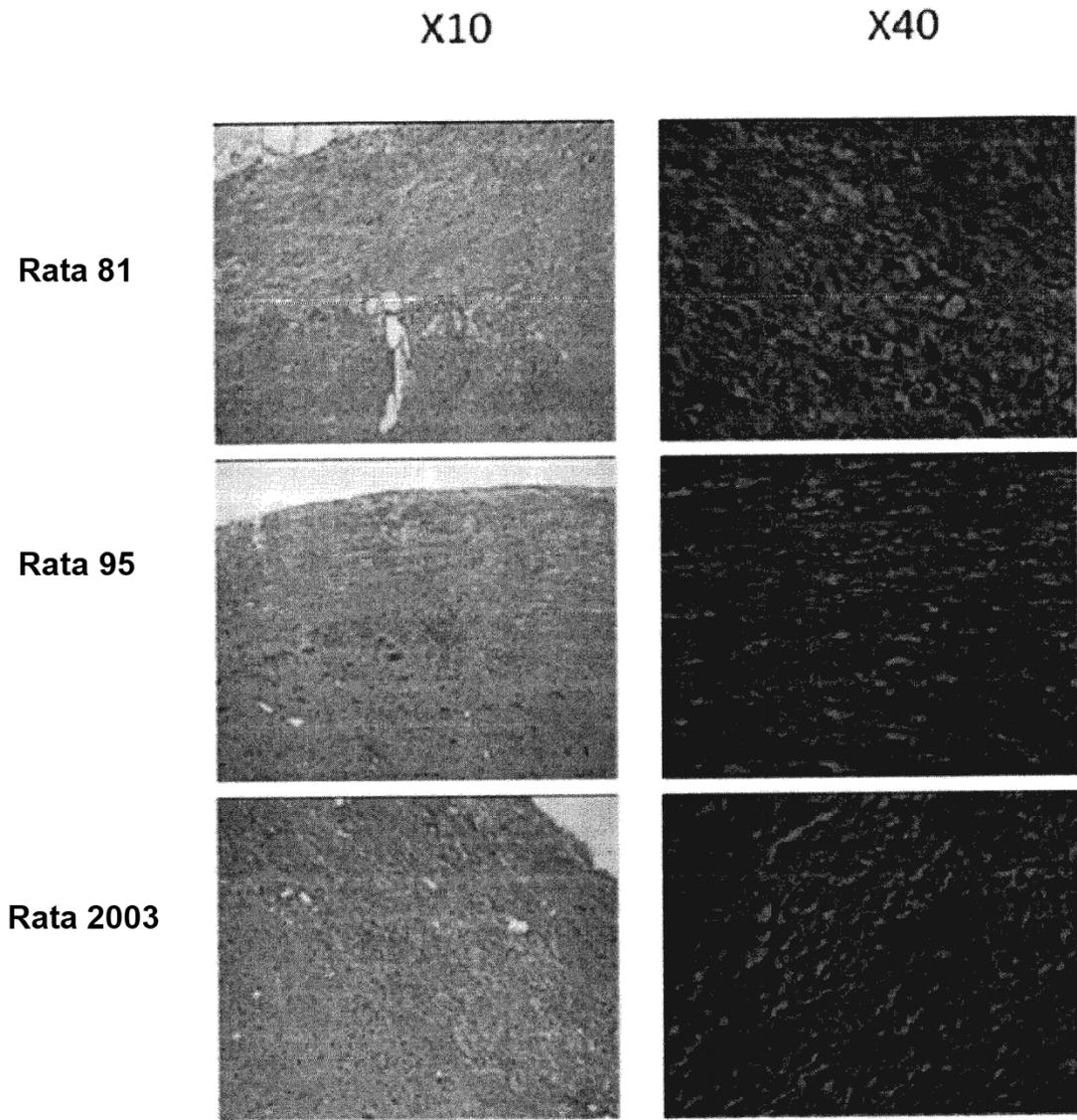


FIGURA 8C

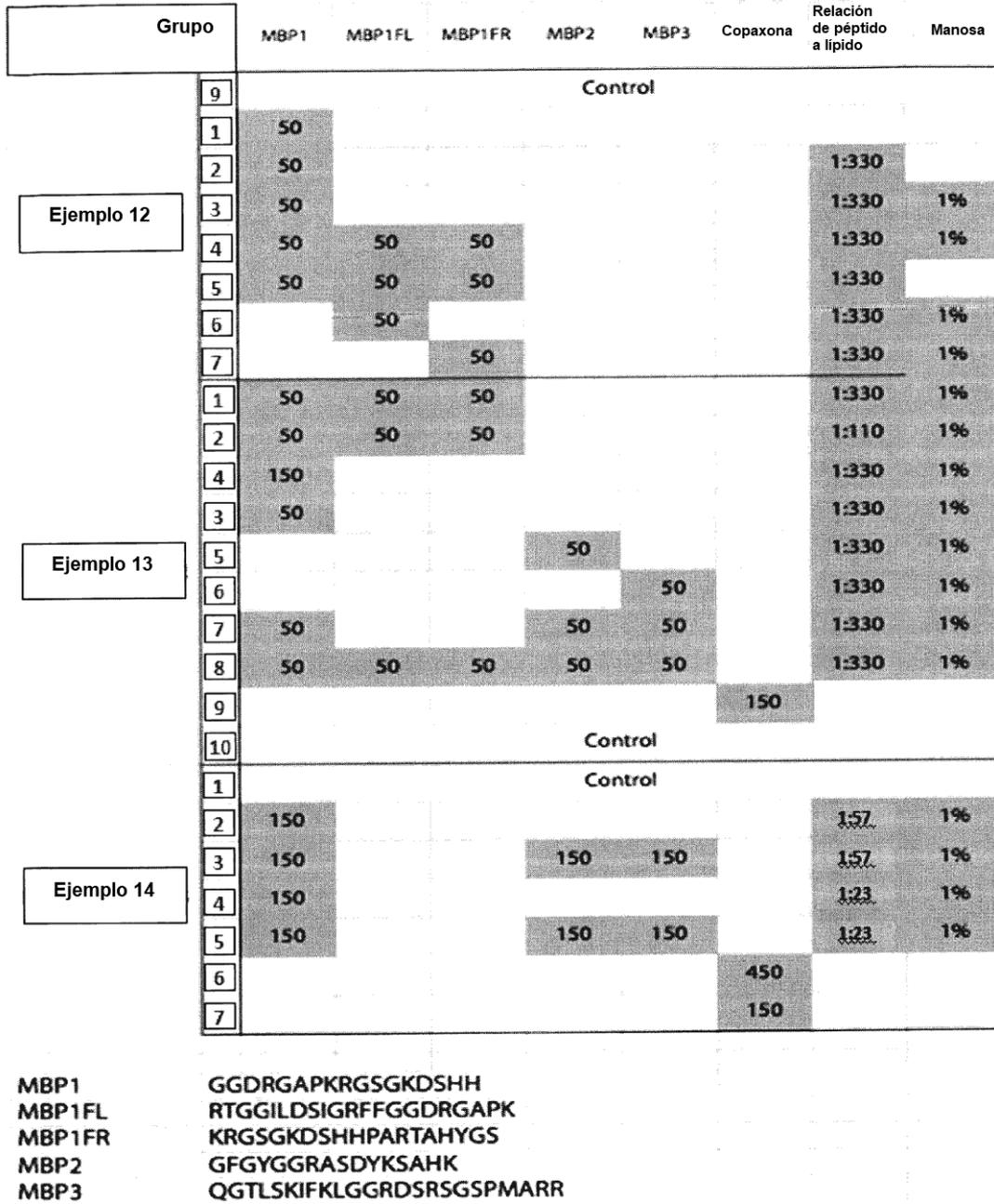


Figura 9

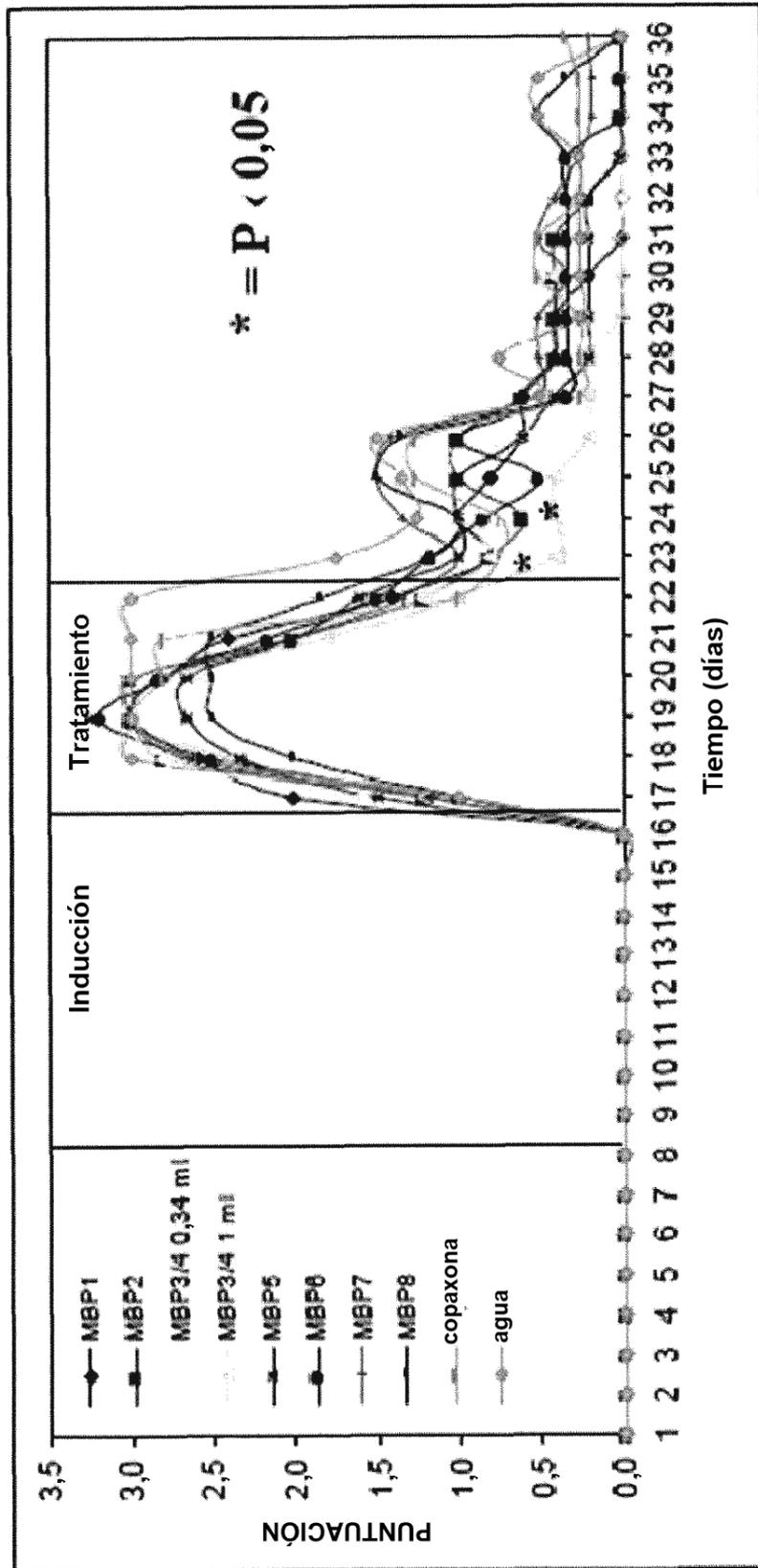


FIGURA 10

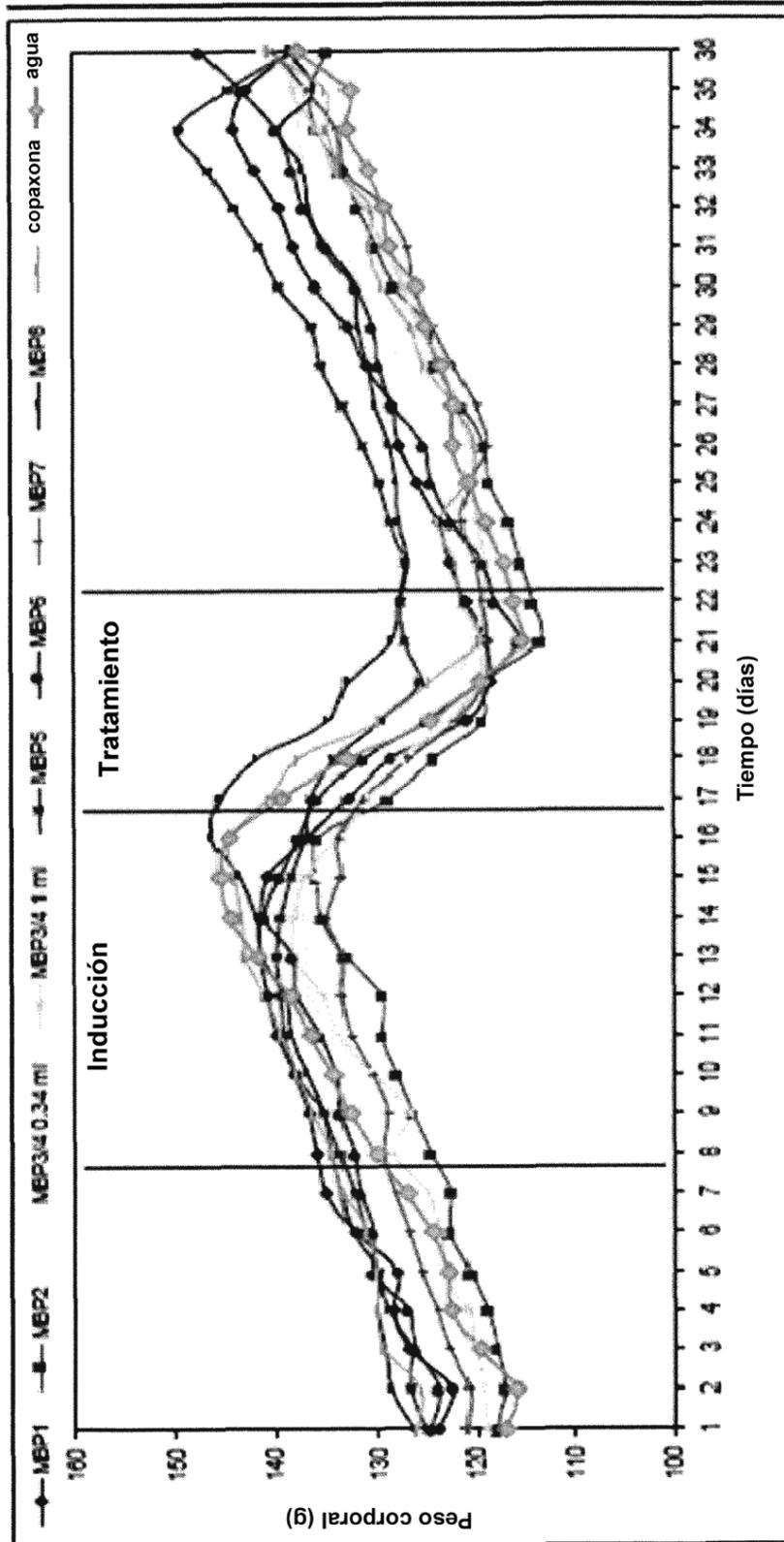


FIGURA 11

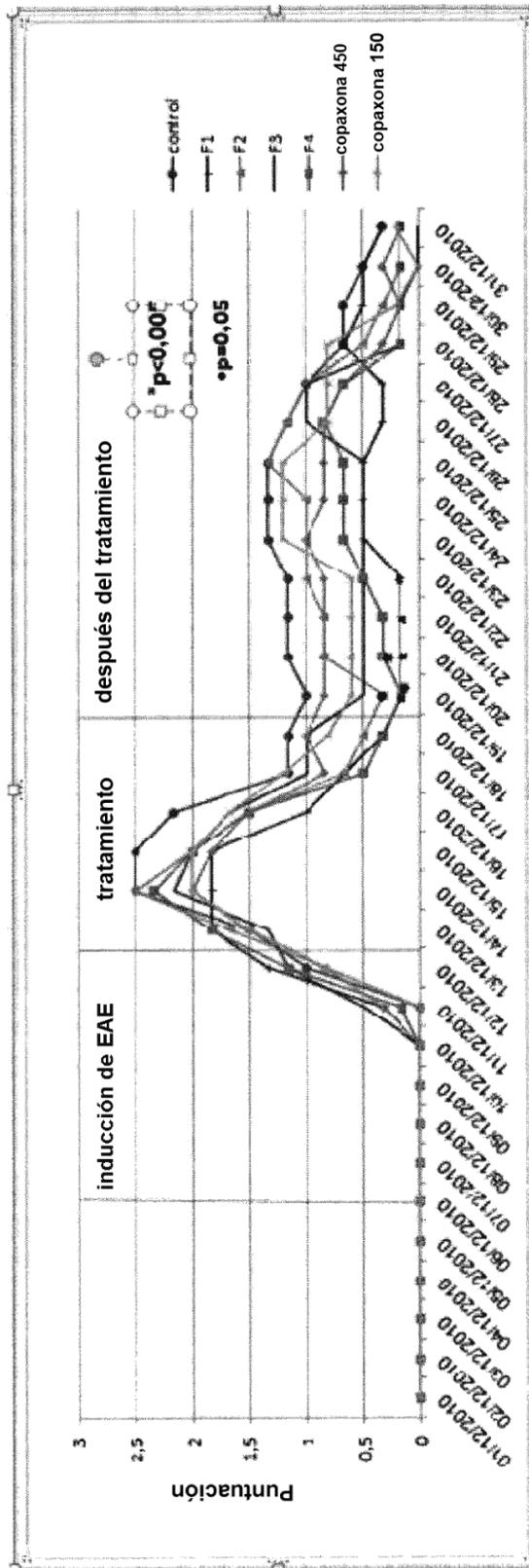


FIGURA 12

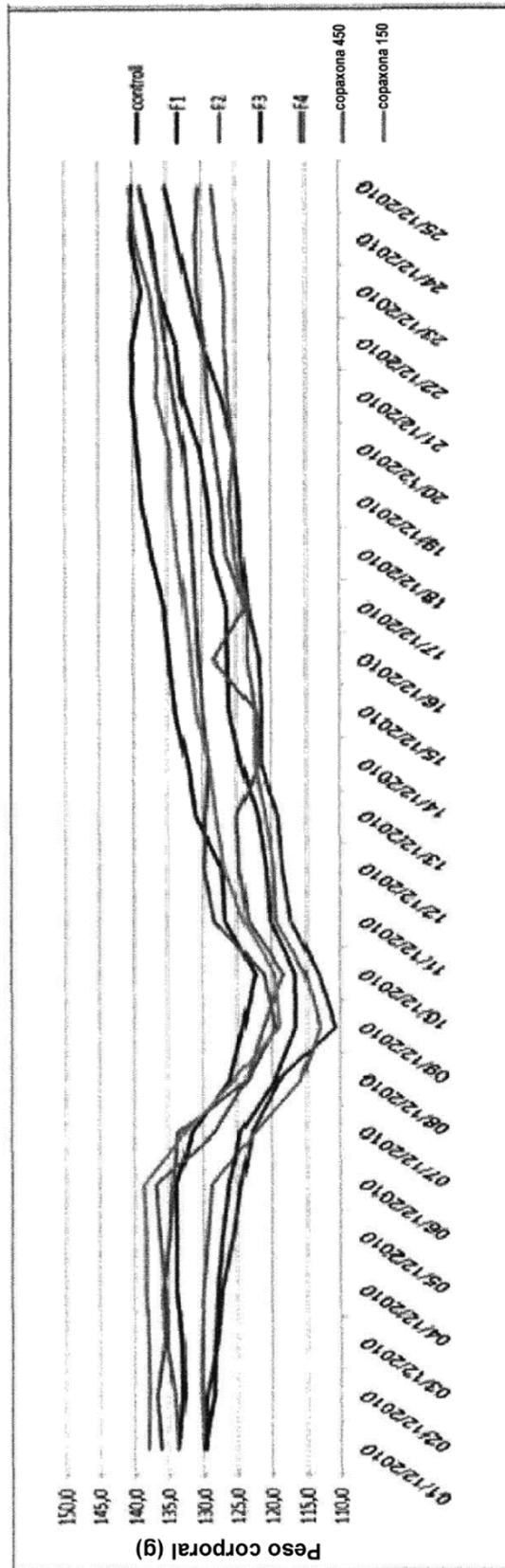


FIGURA 13

ES 2 718 336 T3

1	MGNHAGKRELNAEKASTNSETRNGESEKRNKLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNGTSSQ	60	P02686	MBP_HUMANA
1	MGNHAGKRELNAEKASTNSETRNGESEKRNKLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNGTSSQ	60	P02686-2	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-3	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-4	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-5	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-6	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-7	MBP_HUMANA
61	DTAVTDSKRTIADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFRSDAPGREDNTFFKDRPSESDELQTI	120	P02686	MBP_HUMANA
61	DTAVTDSKRTIADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFRSDAPGREDNTFFKDRPSESDELQTI	120	P02686-2	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-3	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-4	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-5	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-6	MBP_HUMANA
1	-----	0	P02686-7	MBP_HUMANA
121	QEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	180	P02686	MBP_HUMANA
121	QEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	180	P02686-2	MBP_HUMANA
1	-----MASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	47	P02686-3	MBP_HUMANA
1	-----MASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	47	P02686-4	MBP_HUMANA
1	-----MASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	47	P02686-5	MBP_HUMANA
1	-----MASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG	47	P02686-6	MBP_HUMANA
1	-----MASQKRPSQRHGSKYLATASMDHARHG-----	28	P02686-7	MBP_HUMANA
181	GDRGAPKRGSGKD-----SHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T	214	P02686	MBP_HUMANA
181	GDRGAPKRGSGKV-----SSEE-----	197	P02686-2	MBP_HUMANA
48	GDRGAPKRGSGKVPWLKPGRSPLP SHARSQPGLCNMYKDSHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T	107	P02686-3	MBP_HUMANA
48	GDRGAPKRGSGKVPWLKPGRSPLP SHARSQPGLCNMYKDSHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T	107	P02686-4	MBP_HUMANA
48	GDRGAPKRGSGKD-----SHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T	81	P02686-5	MBP_HUMANA
48	GDRGAPKRGSGKD-----SHHPARTAHYGS L P Q K S H G R T	81	P02686-6	MBP_HUMANA
29	-----SLPQKSHGRT	38	P02686-7	MBP_HUMANA
215	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKG	274	P02686	MBP_HUMANA
198	-----	197	P02686-2	MBP_HUMANA
108	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKG	167	P02686-3	MBP_HUMANA
108	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGK-----AEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKG	156	P02686-4	MBP_HUMANA
82	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKG	141	P02686-5	MBP_HUMANA
82	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGK-----AEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKG	130	P02686-6	MBP_HUMANA
39	QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSW-----	74	P02686-7	MBP_HUMANA
275	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR	304	P02686	MBP_HUMANA
198	-----	197	P02686-2	MBP_HUMANA
168	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR	197	P02686-3	MBP_HUMANA
157	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR	186	P02686-4	MBP_HUMANA
142	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR	171	P02686-5	MBP_HUMANA
131	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR	160	P02686-6	MBP_HUMANA
75	-----	74	P02686-7	MBP_HUMANA

FIGURA 14