

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7632996号
(P7632996)

(45)発行日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(24)登録日 令和7年2月10日(2025.2.10)

(51)国際特許分類 F I
 A 6 1 K 38/10 (2006.01) A 6 1 K 38/10 Z N A
 A 6 1 P 27/02 (2006.01) A 6 1 P 27/02

請求項の数 6 (全33頁)

(21)出願番号	特願2019-536175(P2019-536175)	(73)特許権者	522008539 百明信康生物技術(浙江)有限公司 中華人民共和国浙江省湖州市安吉縣遞鋪 街道半島中路198号2幢215室
(86)(22)出願日	平成30年1月4日(2018.1.4)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(65)公表番号	特表2020-514288(P2020-514288 A)	(72)発明者	マーティン, キース イギリス国 エヌビー16 5ユーエイチ チャプストウ グウェント, ビューフォ ート パーク, リバーサイド コート, ア ピトープ テクノロジー (プリストル) リミテッド
(43)公表日	令和2年5月21日(2020.5.21)	(72)発明者	ジャンソン, リゼロット イギリス国 エヌビー16 5ユーエイチ チャプストウ グウェント, ビューフォ ート パーク, リバーサイド コート, ア ピトープ テクノロジー (プリストル) リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/IB2018/050062		
(87)国際公開番号	WO2018/127829		
(87)国際公開日	平成30年7月12日(2018.7.12)		
審査請求日	令和2年12月25日(2020.12.25)		
審判番号	不服2022-18618(P2022-18618/J 1)		
審判請求日	令和4年11月18日(2022.11.18)		
(31)優先権主張番号	1700095.1		
(32)優先日	平成29年1月4日(2017.1.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための、以下のミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含む組成物：

配列番号1からなるMBP 30-44；

配列番号2からなるMBP 83-99；

配列番号3からなるMBP 131-145；および

配列番号4からなるMBP 140-154。

【請求項2】

ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項3】

被験体のブドウ膜炎の治療および/または予防のための医薬の製造における、請求項1に規定される組成物の使用。

【請求項4】

ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、請求項3に記載の使用。

【請求項5】

被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための、以下のミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含むキット：

配列番号1からなるMBP 30-44;

配列番号2からなるMBP 83-99;

配列番号3からなるMBP 131-145;および

配列番号4からなるMBP 140-154。

【請求項6】

前記MBPペプチドが、同時投与、分離投与または連続的投与のためのものである、請求項5に記載の使用のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）由来のペプチドまたは数種類のペプチドを含む組成物に関する。その組成物またはペプチドは、自己免疫の予防および/または抑制、例えば、エフェクターTヘルパー細胞の予防および/または抑制に有用であり得、それは、ブドウ膜炎の治療および/または予防に有用である。本発明はまた、対応する治療方法ならびにブドウ膜炎の治療および/または予防のための医薬の製造におけるペプチドの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

ブドウ膜炎とは、ブドウ膜の炎症を伴う一群の疾患を表す。ブドウ膜は、強膜と網膜との間に位置する目の領域であり、虹彩、毛様体および脈絡膜を含む。ブドウ膜は、網膜への血液供給の大部分を提供する。関連する疾患は、直接的にブドウ膜に影響を及ぼすものに限られず、網膜、視神経、水晶体、硝子体および強膜などの近接する構造が、ブドウ膜炎の発症により影響され得る。

【0003】

ブドウ膜炎のすべての形態が、一般的に顕微鏡を用いて可視化される炎症性細胞浸潤により特徴付けられる。2010年に、2億8500万人が視覚障害を有し、そのうち、3900万人が盲目であると推定され、その原因のうちの10%がブドウ膜炎によるものであると概算された（Global data on visual impairments, The World Health Report, WHO (2010) <http://www.who.int/blindness/GLOBALDATAFINALforweb.pdf>）。

【0004】

ブドウ膜炎に対する現行の治療は、グルココルチコイドステロイドおよびメトトレキサートなどの他の広範囲免疫抑制剤の使用を含む。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、当該技術分野では、ブドウ膜炎に対する代替的な治療に対する必要性がある。本発明は、この必要性に対処する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、ブドウ膜炎の予防および/または治療に有用であり得る、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）由来の多数のペプチドを特定した。

【0007】

本願実施例は、ブドウ膜炎のin vivoモデルにおいて、本発明に従うMBPペプチドが、ブドウ膜炎の臨床的徴候を有意に減少させ得ることを実証する。

【0008】

つまり、本発明は、被験体のブドウ膜炎の治療および/または予防での使用のための、以下のペプチドから選択されるミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含む組成物を提供する：

MBP 30-44（配列番号1）；

MBP 83-99（配列番号2）；

MBP 131-145（配列番号3）；および

10

20

30

40

50

MBP 140-154 (配列番号4)。

【0009】

一態様では、被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための組成物は、MBP 30-44 (配列番号1)、83-99 (配列番号2)、131-145 (配列番号3) および140-154 (配列番号4) を含み得、すなわち、組成物は、4種類のペプチドの「カクテル」を含み得る。

【0010】

被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための組成物は、本質的にMBP 30-44 (配列番号1)、83-99 (配列番号2)、131-145 (配列番号3) および140-154 (配列番号4) からなることができる。

10

【0011】

本発明はまた、被験体のブドウ膜炎を治療または予防するための方法を提供し、該方法は、被験体への本明細書中に記載される通りの組成物の投与ステップを含む。

【0012】

該ペプチドが、HLA-DRおよびHLA-DQ分子をはじめとする数種類のMHCクラスII分子に結合することが見出されており、それらのアピトープの併用が、単独のペプチドを用いる療法よりも、ブドウ膜炎患者で見られる様々な主要組織適合性複合体 (MHC) ハプロタイプを広範囲にわたってカバーする。

【0013】

本発明に従う治療または予防方法は、例えば、HLA-DQ6もしくはHLA-DR2陽性被験体またはいずれかの他のHLA型、例えば、DRB1、DRB3、DRB5、DQA1もしくはDQB1を発現する被験体に対する組成物の投与を含むことができる。

20

【0014】

本発明は、被験体のブドウ膜炎を治療または予防するための医薬の製造における、本明細書中に記載される通りの組成物の使用を包含する。

【0015】

本発明はまた、被験体のブドウ膜炎の治療または予防での、本明細書中に記載される通りの組成物の使用も包含する。

【0016】

本発明はまた、被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための、以下のペプチドから選択されるミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含むキットも提供する：

MBP 30-44 (配列番号1)；

MBP 83-99 (配列番号2)；

MBP 131-145 (配列番号3)；および

MBP 140-154 (配列番号4)。一態様では、組成物は、

MBP 30-44 (配列番号1)；

MBP 83-99 (配列番号2)；

MBP 131-145 (配列番号3)；および

MBP 140-154 (配列番号4)

を含み、このとき、該MBPペプチドは、同時投与、分離投与または連続的投与のためのものであり得る。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】EAU (後部ブドウ膜炎) の臨床スコアを表す図である。データは、平均 ± SEMで表される。

【図2】代表的TEFI画像を示す図である。(A) スコア0。(B) スコア1。(C) スコア2、うっ血した血管。(D) スコア3。(E) スコア4。(F) スコア5。(G) スコア6。

【図3】EAU (前部ブドウ膜炎) の臨床スコアを表す図である。データは、平均 ± SEMで表される。統計学的有意性：* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、**** p < 0.0001。

【図4】代表的TEFI画像を示す図である。血管拡張、血管形成の増大および浸潤に応じて

50

、1～10の累積スコアが付される。

【図5】EAU（後部ブドウ膜炎）、huMBPおよびIRBP免疫化群の臨床スコアを表す図である。データは、平均±SEMで表される。

【図6】EAU（後部ブドウ膜炎）の臨床スコア、曲線下面積（AUC）を表す図である。データは、平均±SEMで表される。統計学的有意性：*** $p < 0.001$ 。

【図7A】huMBP+IRBPモデルでの前部ブドウ膜炎臨床スコア（A）を表す図である。データは、平均±SEMで表される。統計学的有意性：シクロスポリンA対ビヒクルに関して：* $p < 0.05$ および**** $p < 0.0001$ 。ATXペプチド対ビヒクルに関して：# $p < 0.05$ および#### $p < 0.0001$ 。x軸上の太字の印は0日目より後のATXペプチド治療を表す。灰色網掛領域はシクロスポリンA治療のタイムコースを表す。

10

【図7B】huMBP+IRBPモデルでの、前部ブドウ膜炎臨床スコアの曲線下面積解析（AUC）を表す図である。データは、平均±SEMで表される。統計学的有意性：シクロスポリンA対ビヒクルに関して：* $p < 0.05$ および**** $p < 0.0001$ 。ATXペプチド対ビヒクルに関して：# $p < 0.05$ および#### $p < 0.0001$ 。

【図8-1】huMBPモデルでの後部ブドウ膜炎臨床スコア（A）およびhuMBP+IRBPモデルでの後部ブドウ膜炎臨床スコア（C）を表す図である。データは、平均±SEMで表される。統計学的有意性：シクロスポリンA対ビヒクルに関して：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ 。ATXペプチド対ビヒクルに関して：# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ および#### $p < 0.0001$ 。x軸上の太字の印は0日目より後のATXペプチド治療を表す。灰色網掛領域はシクロスポリンA治療のタイムコースを表す。

20

【図8-2】huMBPモデルでの後部ブドウ膜炎臨床スコアの曲線下面積解析（AUC）（B）およびhuMBP+IRBPモデルでの後部ブドウ膜炎臨床スコアのAUC解析（D）を表す図である。データは、平均±SEMで表される。統計学的有意性：シクロスポリンA対ビヒクルに関して：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ 。ATXペプチド対ビヒクルに関して：# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ および#### $p < 0.0001$ 。

【図9】huMBPモデル（A）およびhuMBP+IRBPモデル（B）での後部ブドウ膜炎発症率（%）を表す図である。統計学的有意性：シクロスポリンA対ビヒクルに関して：**** $p < 0.0001$ 。ATXペプチド対ビヒクルに関して：# $p < 0.05$ 。x軸上の太字の印は0日目より後のATXペプチド治療を表す。灰色網掛領域はシクロスポリンA治療のタイムコースを表す。

30

【発明を実施するための形態】

【0018】

ミエリン塩基性タンパク質

ミエリン塩基性タンパク質（MBP）は、ヒトの脳白質から単離可能なタンパク質である。成熟タンパク質は170アミノ酸を有し、その配列は、文献中で広く入手可能である（例えば、Chou et al (1986) J. Neurochem. 46:47-53、図1；Kamholz et al (1986), PNAS 83:4962-4966、図2；米国特許第5,817,629号、配列番号1；Roth et al (1987), J. Neurosci. Res. 17:321-328、図4；Medeviczky et al (2006), FEBS Letters 580:545-552、図3を参照されたい）。MBPのオルタナティブスプライシング変異体/アイソフォームが、MBPのオルタナティブスプライシングに起因して生成される場合がある（例えば、Kamholz、上掲を参照されたい）。

40

【0019】

本発明に従う組成物は、以下のペプチドから選択されるMBPペプチドを含む：

- MBP 30-44（配列番号1）；
- MBP 83-99（配列番号2）；
- MBP 131-145（配列番号3）；および
- MBP 140-154（配列番号4）。

【0020】

組成物は、MBP 30-44（配列番号1）、83-99（配列番号2）、131-145（配列番号3）および140-154（配列番号4）を含み得る。

50

【 0 0 2 1 】

組成物は、本質的にMBP 30-44（配列番号1）、83-99（配列番号2）、131-145（配列番号3）および140-154（配列番号4）からなることができる。

【 0 0 2 2 】

組成物中に存在するペプチドは、MBP 30-44（配列番号1）、83-99（配列番号2）、131-145（配列番号3）および140-154（配列番号4）からなることができる。つまり、他のMBPペプチドは存在しない。MBPペプチドは、したがって、配列番号1～4からなることができる。

【 0 0 2 3 】

「からなる」とは、語句「からなる」が続く何かを含み、かつこれに限定されることを意味する。つまり、「からなる」とは、列記された要素が、必要であるかまたは義務的であること、および他の要素は存在することができないことを示す。「本質的に～からなる」とは、この語句にて列記されるいずれかの要素を含み、かつ列記される要素に関して本開示中で特定される活性もしくは作用を干渉しないかまたはこれに寄与しない他の要素に限られることを意味する。つまり、語句「本質的に～からなる」とは、列記される要素が必要であるかまたは義務的であるが、他の要素は任意選択であり、かつ列記される要素の活性もしくは作用にそれらが影響を及ぼすか否かに応じて、存在してよいかまたは存在してはならないことを示す。

10

【 0 0 2 4 】

ペプチド

20

本発明に従う使用のための組成物およびキット中で用いることができるペプチドは、以下の通りである：

MBP 30-44（配列番号1）：

H-Pro-Arg-His-Arg-Asp-Thr-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Ile-Gly-Arg-Phe-NH₂

MBP 83-99（配列番号2）：

H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-NH₂

MBP 131-145（配列番号3）：

H-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser-Ala-His-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-NH₂

MBP 140-154（配列番号4）：

H-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-Ala-Gln-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys-Ile-Phe-NH₂

30

【 0 0 2 5 】

用語「ペプチド」は、通常の意味で使用され、典型的には隣接するアミノ酸の -アミノ基とカルボキシル基との間のペプチド結合によって、一連の残基、典型的にはL-アミノ酸が一方から他方へと接続されたものを意味する。この用語は、修飾型ペプチドおよび合成ペプチド類似体を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明のペプチドは、化学的方法を用いて製造され得る（Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin）。例えば、ペプチドは、固相技術（Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204）によって合成され、樹脂から切断され、分取高速液体クロマトグラフィー（例えば、Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY）によって精製され得る。自動合成は、例えば、ABI 431 Aペプチドシンセサイザー（Perkin Elmer社）を用いて、製造業者によって提供される説明書に従って、達成することができる。

40

【 0 0 2 7 】

ペプチドは、代わりに、組換え手段によって、またはより長いポリペプチドからの切断によって作製することができる。例えば、ペプチドは、ミエリン塩基性タンパク質からの切断によって得ることができ、この後に、一方または両方の末端の修飾を続けることができる。ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定（例えば、エドマン分析法）によって確認することができる。

50

【 0 0 2 8 】

実用的な目的のために、ペプチドが示し得る様々な他の特性がある。例えば、ペプチドは、治療的に有用であるためにin vivoで十分に安定であることが重要である。in vivoでのペプチドの半減期は、少なくとも10分間、30分間、4時間、または24時間であることができる。

【 0 0 2 9 】

ペプチドはまた、in vivoで良好なバイオアベイラビリティを示し得る。ペプチドは、相対的な妨害なしに、細胞表面でMHC分子に結合することを可能にするコンホメーションをin vivoで維持し得る。

【 0 0 3 0 】

一態様では、組成物は、配列番号1～4のいずれか1種に対して、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の配列同一性を有するMBPペプチドを含むことができる。好ましい態様では、ペプチドは、配列番号1～4のいずれか1種に対して、少なくとも80%、90%、95%、97%または99%の配列同一性を有する。

【 0 0 3 1 】

配列同一性は、いずれかの慣用の方法により評価することができる。しかしながら、配列間の配列同一性の程度を決定するためには、配列同士の多重アライメントを行なうコンピュータプログラム、例えば、Clustal W (Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680) が有用である。ALIGN (Myers et al., (1988) CABIOS, 4: 1-17)、FASTA (Pearson et al., (1988) PNAS, 85:2444-2448 ; Pearson (1990), Methods Enzymol., 183: 63-98) およびギャップありBLAST (Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402) などの配列の対を比較およびアライメントするプログラムもまた、この目的のために有用である。さらに、European Bioinformatics instituteのDaliサーバーは、タンパク質配列の構造に基づくアライメントを提供する (Holm (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38 ; Holm (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480 ; Holm (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9)。

【 0 0 3 2 】

複数配列アライメントおよび同一性パーセントは、標準的なBLASTパラメータを用いて決定することができる (利用可能なすべての生物由来の配列、マトリックスBlosum 62、ギャップコスト: existence 11、extension 1を用いて)。

【 0 0 3 3 】

あるいは、以下のプログラムおよびパラメータを用いることができる: プログラム: Align Plus 4, version 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite)。DNA比較: Global comparison、Standard Linear Scoringマトリックス、ミスマッチペナルティ=2、オープンギャップペナルティ=4、伸長ギャップペナルティ=1。アミノ酸比較: Global comparison、BLOSUM 62 Scoringマトリックス。

【 0 0 3 4 】

つまり、変異体が親の機能的活性を保持している、すなわち、変異体が機能的に等価である限り、言い換えれば、変異体が本明細書中に規定される通りの親ペプチドの活性を有するかまたは保持する限り、記載または提供される配列の変異体が、本発明の範囲に含められる。そのような変異体は、例えば、1箇所以上、例えば、1～14アミノ酸の親配列のアミノ酸置換、付加または欠失 (一端または両端での切断を含む) を含む場合がある。

【 0 0 3 5 】

置換は、保存的置換であり得る。本明細書中で用いる場合、「保存的置換」とは、概ね同等のサイズ、電荷および/または極性のアミノ酸を用いて所与の位置で置換するためにアミノ酸の正体を変化させることを意味する。アミノ酸の天然の保存的置換の例としては、以下の8種類の置換群 (慣用の一文字表記により記される) が挙げられる: (1) M、I、L、V; (2) F、Y、W; (3) K、R、(4) A、G; (5) S、T; (6) Q、N; (7) E、D; および (8) C、S。

10

20

30

40

50

【0036】

1箇所以上のアミノ酸が化学的に誘導体化されている（例えば、化学基で置換されている）機能的に等価な誘導体もまた含まれる。

【0037】

本発明に従う使用のためのペプチドは、配列番号1～4の一部分または断片を含むことができ、但し、ペプチドは、必要な活性を保持する。配列番号1～4の一部分または断片は、例えば、6～16残基長、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16残基長であり得る。

【0038】

本発明に従う使用のためのペプチドは、さらに長いペプチド、すなわち、配列番号1～4のうちのいずれかを含むペプチドの中に含まれることができる。本発明に従う使用のためのペプチドは、つまり、8～30アミノ酸、例えば、8～25アミノ酸、8～20アミノ酸、8～15アミノ酸または8～12アミノ酸を含むことができる。一態様では、本発明のペプチドは、つまり、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30アミノ酸長であり得る。

【0039】

本発明に従う使用のためのペプチド組成物は、本明細書中に記載される通りの本発明に従うアミノ酸配列を含むことができる。一態様では、ペプチド組成物は、本明細書中に記載される通りの本発明に従うアミノ酸配列のみを含み、すなわち、本発明に従うもの以外の追加のペプチドを含まない。

【0040】

ペプチドは、中和形態または塩形態として組成物中に製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基を用いて形成される）が挙げられ、例えば、塩酸塩もしくはリン酸塩などの無機酸、または酢酸、酒石酸またはリンゴ酸などの有機酸を用いて形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジンおよびプロカインなどの有機塩基からも誘導することができる。

【0041】

アピトープ (Apitope)

適応免疫応答では、Tリンパ球は、タンパク質抗原の内部エピトープを認識することができる。APCは、タンパク質抗原を取り込み、それらを短いペプチド断片に分解する。ペプチドは、細胞内部の主要組織適合性複合体 (MHCクラスII) に結合し、細胞表面に運ばれ得る。MHC分子と共に細胞表面に提示された場合、ペプチドは、T細胞によって (T細胞受容体 (TCR) を介して) 認識されることができ、その場合、ペプチドは、T細胞エピトープである。

【0042】

したがって、エピトープは、MHC分子のペプチド結合溝 (groove) に結合し、T細胞によって認識されることが可能である、抗原から誘導可能なペプチドである。

【0043】

最小エピトープは、MHCクラスIまたはII分子のペプチド結合溝に結合し、T細胞によって認識されることが可能である、エピトープから誘導可能な最も短い断片である。所定の免疫原性領域について、エピトープとして作用する重複ペプチドの「入れ子状 (nested) セット」を生成することが典型的には可能であり、それらはすべて、最小エピトープを含有するが、それらの隣接領域が異なる。

【0044】

同様に、切断型ペプチドへの応答を測定することによって、特定のMHC分子：T細胞の組み合わせについて最小エピトープを特定することが可能である。例えば、応答が、重複ライブラリーにおける残基1～15を含むペプチドに対して得られる場合、両端で切り詰め

10

20

30

40

50

られるセット（すなわち、1～14、1～13、1～12等および2～15、3～15、4～15等）を用いて最小エピトープを同定することができる。

【0045】

本発明者らは、さらなるプロセッシングなしにMHC分子に結合しT細胞に提示されるペプチドの能力と、ペプチドのin vivoでの抗原特異的免疫寛容を誘導する能力との間に関連があることを以前に特定した（WO02/16410）。ペプチドが、長すぎて、さらなるプロセッシング（例えば、トリミング）なしにMHC分子のペプチド結合溝に結合することができないか、または不適切なコンホメーションで結合する場合、それは、in vivoで寛容原性（tolerogenic）ではない。一方、ペプチドが、MHCペプチド結合溝に直接結合し、T細胞に提示されるのに適切なサイズおよびコンホメーションである場合、このペプチドは、寛容誘導に有用であると予測することができる。

10

【0046】

したがって、in vitroでさらなる抗原プロセッシングなしに、MHC分子に結合し、T細胞に提示されることができかどうかを調べることによって、ペプチドの寛容原性能力を調べることが可能である。

【0047】

MBPアピトープ（抗原プロセッシング非依存的エピトープ）は、さらなる抗原プロセッシングなしに、MHC分子に結合し、MBP特異的T細胞からの応答を刺激することが可能である。このようなアピトープは、WO02/16410に記載のルールベースの方法に従って、MBPに対する寛容を引き起こすことが予測できる。

20

【0048】

MHCクラスI分子と結合するペプチドは、典型的には7～13、より通常は8～10アミノ酸長である。ペプチドの結合は、ペプチドの主鎖、およびすべてのMHCクラスI分子のペプチド結合溝における不変部位における原子間の接触によって、その2つの末端において安定化される。ペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端に結合する、溝の両端における不変部位がある。ペプチド長の変動は、ペプチド骨格における、多くの場合、柔軟性を持たせるプロリンまたはグリシン残基での、ねじれによって調整される。

【0049】

MHCクラスII分子に結合するペプチドは、典型的には8～20アミノ酸長、より通常は10～17アミノ酸長であり、より長くすることができる（例えば、最大40アミノ酸）。これらのペプチドは、（MHCクラスIペプチド結合溝とは異なり）両端が開放されているMHC IIペプチド結合溝に沿って、伸長したコンホメーションを取る。ペプチドは、主に、ペプチド結合溝に並ぶ保存残基との主鎖原子接触によって、所定の位置に保持される。

30

【0050】

好ましい実施形態では、MBPに由来するペプチドは、さらなるプロセッシングなしにMHCクラスII分子に結合することが可能である。

【0051】

一部分（Portion）

本発明のペプチドは、配列番号1～4として示されるMBP由来ペプチドの全体または一部分を含み得る。

40

【0052】

用語「一部分」は、配列番号1～4から誘導され、かつ少なくとも最小エピトープを含有するペプチドを指し、つまり、そのペプチドは、MHCクラスIまたはII分子のペプチド結合溝に結合し、T細胞により認識されて、寛容性を誘導することが可能である。

【0053】

ブドウ膜炎

臨床的には、ブドウ膜炎は一般的に、主に罹患する目の部分に基づいて、以下のうちの1種として分類される：前部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または汎ブドウ膜炎（panuveitis uveitis）。

【0054】

50

前部ブドウ膜炎としては、虹彩毛様体炎および虹彩炎が挙げられる。虹彩炎は、前房および虹彩の炎症であり、虹彩毛様体炎は、毛様体内の炎症を含む。

【0055】

中間部ブドウ膜炎（扁平部炎）とは一般的に硝子体炎を意味し、硝子体腔内の細胞の炎症であり、毛様体扁平部上の炎症性物質の沈着を伴う。炎症した硝子体、または炎症により引き起こされる出血もしくはタンパク質沈着は、中間部ブドウ膜炎として特徴付けられる。これらの実験では、中間部ブドウ膜炎の症状は、TEFI画像を用いるスコア付けに組み入れられる。実施例3に示される通り、最大で合計8になるスコア4（×2）は、ホワイトアウトにより生じる。図4では、最高スコアに関するTEFI画像が中間部ブドウ膜炎を反映する。本発明の一態様では、ブドウ膜炎は中間部ブドウ膜炎である。

10

【0056】

後部ブドウ膜炎（脈絡網膜炎）は、網膜および脈絡膜領域の炎症である。

【0057】

汎ブドウ膜炎（panuveitis uveitis）は、ブドウ膜のすべての層を侵す炎症を意味する一般的な用語である。

【0058】

一態様では、ブドウ膜炎は特発性ブドウ膜炎である。

【0059】

本発明の好ましい実施形態では、ブドウ膜炎は後部ブドウ膜炎である。本発明の別の態様では、ブドウ膜炎は前部ブドウ膜炎である。本発明の別の態様では、ブドウ膜炎は中間部ブドウ膜炎である。

20

【0060】

ブドウ膜炎はまた、感染性または非感染性のいずれかとして、また、先進国ではより一般的である自己免疫疾患に関連するブドウ膜炎（すなわち、主に非感染性である）として分類することもできる。ブドウ膜炎を研究するために用いられる一般的な動物モデルはまた、自己免疫によっても駆動され、二者の間の明らかな相関を示す。ブドウ膜炎のうちの25～30%が全身性自己免疫または自己炎症性疾患に関連すると予測される。

【0061】

本明細書中に記載される本発明に従うブドウ膜炎は、好ましくは非感染性ブドウ膜炎であり、さらにより好ましくは自己免疫性ブドウ膜炎である。

30

【0062】

寛容（Tolerance）

T細胞エピトープは、自己であれまたは外来性であれ、任意の抗原に対する適応免疫応答において中心的役割を果たす。過敏性疾患（アレルギー、自己免疫疾患および移植拒絶を含む）におけるT細胞エピトープによって果たされる中心的役割は、実験モデルの使用によって実証されている。アジュバントと組み合わせた自己抗原または合成ペプチド（T細胞エピトープの構造に基づく）の注射によって、炎症またはアレルギー疾患を誘発することが可能である。

【0063】

対照的に、可溶性形態のペプチドエピトープを投与することにより、特定の抗原に対する免疫原性寛容を誘導することが可能であることが示されている。可溶性ペプチド抗原の投与は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE-多発性硬化症（MS）のためのモデル）（Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165 ; Liu and Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263 ; Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261）および関節炎、糖尿病、およびブドウ膜網膜炎の実験モデル（上記のAnderton and Wraith (1998)に概説される）において疾患を阻害する有効な手段として実証されている。これはまた、EAEにおける進行中の疾患を治療する手段として実証されている（上記のAnderton and Wraith (1998)）。

40

【0064】

寛容とは、抗原に応答しないことである。自己抗原に対する寛容は、免疫系の重要な特

50

徴であり、これが失われると、自己免疫疾患が生じ得る。適応免疫系は、それ自身の組織内に含まれる自己抗原の自己免疫攻撃を回避しながら、莫大な種類の感染性物質に応答する能力を維持しなければならない。これは、胸腺におけるアポトーシス細胞死に対する未成熟Tリンパ球の感受性によってかなりの程度まで制御される（中枢性寛容）。しかし、すべての自己抗原が胸腺で検出されるわけではなく、そのため自己応答性胸腺細胞の死は不完全なままである。したがって、寛容が末梢組織における成熟自己応答性Tリンパ球によって獲得され得るメカニズムもある（末梢性寛容）。中枢性および末梢性寛容のメカニズムの概説は、Anderton et al (1999) (Immunological Reviews 169: 123-137) に与えられる。

【0065】

入手可能なデータによれば、ブドウ膜炎は、網膜タンパク質により生成され、炎症を駆動し、かつ慢性感染症の作用を模倣する、反応性T細胞から生じ得ることが示唆される。本発明に従う組成物は、MBPなどの自己抗原に対する寛容を誘導することが可能であり、それにより、被験体に投与される場合に、MBPタンパク質に対する寛容を回復させ、かつ病原性免疫応答を縮小させることができる。

【0066】

組成物

本発明に従う1つ以上のペプチドを含む組成物は、ブドウ膜炎を有する患者での予防的または治療的使用のためのものであり得る。

【0067】

予防的使用のために投与される場合、組成物は、MBPに対する免疫応答の発生を低減または阻止し得る。免疫応答のレベルは、患者が組成物で治療されていなかった場合に得られるであろうよりも小さい。用語「低減する」は、免疫応答における部分的低減、例えば、患者が組成物で治療されていなかった場合に観察されたであろう応答における（または同じ期間にわたって未治療の患者で観察される応答における）50%、70%、80%または90%の低減が観察されることを示す。用語「阻止する」は、MBPに対する感知できるほどの免疫応答が観察されないことを示す。

【0068】

治療的使用のために投与される場合、組成物は、MBPに対するすでに進行中の免疫応答を抑制し得る。用語「抑制する」は、ペプチド治療前のレベル、または治療が与えられていなかった場合と同じ時点で観察されたであろうレベルと比較した、進行中の免疫応答のレベルにおける低減を示す。

【0069】

本発明に従う組成物を用いる治療は、以下のいずれかまたはすべてのレベルの低減を引き起こし得る：

- (i) MBP自己抗体
- (ii) MBPに特異的な炎症性CD4+ T細胞
- (iii) MBP自己抗体を分泌するB細胞。

【0070】

これら要素のすべての検出は、ELISA、フローサイトメトリーなどの当技術分野で公知の技術によって実施することができる。

【0071】

本発明の組成物での治療は、さらに、または代わりに、MBPに特異的なCD4+ T細胞においてアネルギーを引き起こし得る。アネルギーは、例えば、その後のin vitroでのMBP投与によって検出することができる。本発明の組成物を用いる治療は、例えば、転写因子c-MafおよびNFIL3、ならびに負の共刺激分子LAG-3、TIGIT、PD-1およびTIM-3により特徴付けられる、抗原特異的調節T細胞の生成を生じ得る（Burton et al. Nature Communications (2014) Article number 4741を参照されたい）。

【0072】

製剤

10

20

30

40

50

本明細書中に記載される通りの本発明に従う組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして、注射剤として調製することができ；注射前の液体における溶液または懸濁液に好適な固体形態も調製され得る。調製物はまた、乳化することができ、またはペプチドは、リポソームに封入されることができる。ペプチドは、あるいは、担体（例えば、ナノ粒子）中にカプセル化されるか、または担体の表面に結合されることができる。活性成分は、薬学的に許容され、かつ活性成分と相溶性のある添加剤と混合されることができる。好適な添加剤は、例えば、水、生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。

【0073】

加えて、所望の場合、組成物は、湿潤剤または乳化剤および/またはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有することができる。緩衝塩としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩が挙げられる。塩酸および/または水酸化ナトリウムを、pH調整のために使用することができる。安定化のために、スクロースまたはトレハロースなどの二糖類を使用することができる。

10

【0074】

製剤化後、組成物は、滅菌容器に組み込むことができ、次いで、密封され、低い温度、例えば4℃で保存されるか、またはそれは凍結乾燥されることができる。

【0075】

好都合に、組成物は、凍結乾燥（フリーズドライ）粉末として調製される。凍結乾燥は、安定化形態での長期保存を可能にする。凍結乾燥手順は、当技術分野において周知であり、例えば<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>を参照されたい。マンニトール、デキストランまたはグリシンなどの充填剤が、一般に、凍結乾燥前に使用される。

20

【0076】

組成物は、経口、静脈内（水溶性の場合）、筋内、皮下、舌下、鼻内、皮内もしくは坐剤経路、または埋め込み（例えば、徐放性分子または装置を用いて）によってなどの都合の良い方法で投与することができる。

【0077】

組成物は、有利には、鼻内、皮下または皮内経路を介して投与され得る。好ましい実施形態では、投与は皮内投与である。

30

【0078】

本発明に従う使用のための方法および医薬組成物は、ヒト被験体を治療するために使用することができる。典型的には、医師は、個々の被験体に最も適した実際の用量を決定し、それは特定の患者の年齢、体重および応答によって変化する。

【0079】

本明細書中に記載される通りの組成物は、典型的に、「有効量」で投与され；すなわち、とりわけ、治療的効果または予防的効果のうちのいずれか1種以上を生起するために有効な量で投与される。当業者は、慣用の実験手法により、医薬組成物に含められるべき、または所望の帰結のために投与すべき、有効な無毒の量を決定することができるであろう。一般的に、本明細書中に開示される組成物は、投与経路および受容者の身体的特性（健康状態を含む）に適合する様式で、かつ所望の作用を生起する（すなわち、治療的に有効および/または予防的）様式で、投与することができる。例えば、組成物の適切な投与量は、限定するものではないが、被験体の身体的特性（例えば、年齢、体重、性別）、および当業者により認識することができる他の因子をはじめとする様々な因子に依存し得る。例えば、組成物の適切な投与量を決定する際に考慮することができる一般的な検討事項の他の例示的な例は、Gennaro（2000, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins；およびGilman et al., (Eds), (1990), "Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics", Pergamon Press）により議論されている。

40

【0080】

50

前記の量は、上記で概説した検討事項のうちの一部を考慮して、当業者に公知の方法を通して決定することができる比較的広い範囲に入るのであることが予測される。

【0081】

本発明のペプチドおよび組成物は、ヒト被験体を治療するために用いることができる。本発明に従う被験体は、好ましくは、後部ブドウ膜炎を有する。被験体は、MBPに対して特異的なT細胞を有し得る。

【0082】

好ましい実施形態では、複数の用量が上昇濃度において患者に与えられる、「用量漸増」プロトコールに従ってもよい。このようなアプローチは、例えば、ハチ毒アレルギーに対する免疫療法適用においてホスホリパーゼA2ペプチドについて使用されてきた (Muller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754およびAkdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106)。

【0083】

キット

MBPに由来するペプチドは、混合組成物またはカクテルの形態で、一緒に投与することができる。しかしながら、同時、別々、連続または併用投与のために、ペプチドをキットの形態で別個に提供することが好ましい状況があり得る。

【0084】

例えば、キットは、別個の容器中に3種類のペプチドを含むことができる。容器の内容物は、投与前に組み合わせることができ、または組み合わせないことができる。

【0085】

キットはまた、混合および/または投与手段を含み得る (例えば、鼻内投与のための噴霧器 (vapouriser)、または皮下/皮内投与のためのシリンジおよび針または他の医療用装置)。キットはまた、使用説明書を含み得る。

【0086】

本発明の組成物/キットは、in vivoでMBP自己抗体の産生を抑制または予防するために使用することができる。特に、組成物/キットは、被験体のブドウ膜炎を治療および/または予防するために使用することができる。

【0087】

動物モデル

本発明はまた、ブドウ膜炎の動物モデルも包含する。実施例で述べられる通り、本発明に従う動物モデルは、脳脊髄炎 (EAE) を誘導することなく、ブドウ膜炎を誘導するという利点を提供する。

【0088】

つまり、さらなる態様では、本発明はブドウ膜炎の動物モデルを提供し、該動物は、対照動物と比較して、上昇したレベルのミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および光受容体間レチノイド結合性タンパク質 (IRBP) を含む。

【0089】

用語「上昇したレベルのMBPおよびIRBP」とは、上昇したレベルの、全長MBPまたはIRBP配列のうちのいずれか (例えば、MBPまたはIRBPペプチド) を包含することを意図する。

【0090】

一態様では、MBPは、ヒトまたはモルモット (gpMBP) 由来の、またはこれらから誘導される。ヒトおよびモルモットMBPの配列が、以下に説明される：

10

20

30

40

50

ヒト MBP (UniProtKB entry P02686 – 全長ヒト MBP 配列)

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKRN LGELSRTTSEDNEVFGEADANQNGTSSQ
DTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSEDELQTI
QEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG
GDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKG
RGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLKIFKLGGRDSRSGSP
MARR (配列番号 5)

【 0 0 9 1 】

MBPの他のアイソフォームもまた公知であり、例えば、UniProtKB、P02686-3、P02686-4、P02686-5およびP02686-6である。

10

モルモット MBP (UniProtKB entry P25188)

ASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGSDRAAPKRGSGKDS
HHAARTTHYGSLPQKSQRSQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQ
KPGFGYGGGRADYKSKGFKGAHDAQGTLKIFKLGGRDSRSGSPMARR (配列番号 6)

【 0 0 9 2 】

本発明の一態様では、IRBPはヒトIRBPであるか、またはヒトIRBPから誘導される。ヒトIRBPの配列は、以下に記載される (UniProtKB entry P10745) :

20

MMREWLLMSVLLCGLAGPHTLHQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAIQQAISHE
ILSISDPQTLASVLTAGVQSSLNDRPLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLSSEEELLAWLQRG
LRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLRHCTGGQVSGI
PYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDVVLTSSQTRGVAE
DIAHILKQMRRAIVGERTGGGALDLRKLRIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGSQTWEGSG
VLPVCGTPAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLKDYITLVDRVPTLLQHLASMDFS
TVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWPAPDAAAEDSPGVAPELPEDEA
IRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSFADASVLGVLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRH
NPGGPSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEHFSTMELPGPRYSTQRGVYLL
TSHRTATAAEFFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTVPVLTFFID
NHGEAWLGGGVVDPDAIVLAEALDKAQEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQT
SALLRAKLAQGAYRTAVDLESLASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPAV
PSPEELTYLIEALFKTEVLPQQLGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQQLVDTAALVI
DLRYNPGSYSTAIPLLCSYFFAEPRQHLYSVFDRATSKVTEVWTLQVAGQRYGSHKDL
YILMSHTSGSAAEFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSSPLYASMPTQMAMS
ATTGKAWDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAK
MATKLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIP
SPEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFQDGEELLTQVSRLLEHIVKIMHTDAMIID
MRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKKSMV
ILTSSVTAGTAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSVGA
SDGSSWEGVGVTPHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLRVKRSPGLQDHL (配列番号 7)

30

40

【 0 0 9 3 】

一態様では、IRBPはウシIRBP (配列番号 8) である (UniProtKB entry P12661) :

50

MVRKWALLLP MLLCGLTGPA HLFQPSLVLE MAQVLLDNYC FPENLMGMQG
 60 70 80 90 100
 AIEQAIKSQE ILSISDPQTL AHVLTAGVQS SLNDPRLVIS YEPSTLEAPP
 110 120 130 140 150
 RAPAVENTL EELIAGLQDG LRHEILEGNV GYLVRDDIPG QEVMSKLRSE
 160 170 180 190 200
 LVANVWRKLV NTSALVLDLR HCTGGHVSIGI PYVISYLHPG STVSHVDTVY
 210 220 230 240 250
 DRPSNTTTEI WTLPEALGK YSADKDVVVL TSSRTGGVAE DIAYILKQMR
 260 270 280 290 300
 RAIIVGERTV GGALNLQKLR VGQSDFFLTV PVSRSGLPLG EGSQTWEGSG
 310 320 330 340 350
 VLPCVGTPEAE QALEKALAVL MLRRALPGVI QRLQEALREY YTLVDRVPAL
 360 370 380 390 400
 LSHLAAMDLS SVVSEDDIVT KLNAGLQAVS EDPRLQVQVV RPKEASSGPE
 410 420 430 440 450
 EEAEPEPEAV PEVPEDEAVR RALVDSVFQV SVLPGNVGYL RFDSFADASV
 460 470 480 490 500
 LEVLGPYILH QVWEPLQDTE HLIMDLRQNP GGPSSAVPLL LSYFQSPDAS
 510 520 530 540 550
 PVRLFSTYDR RTNITREHFS QTELLGRPYG TQRGVYLLTS HRTATAAEEL

10

20

560 570 580 590 600
 AFLMQSLGWA TLVGEITAGS LLHTHTVSLLE ETPEGGLALT VPVLTFFIDNH
 610 620 630 640 650
 GECWLGGGVV PDAIVLAEAA LDRAQEVLEF HRSGLGELVEG TGRLLAEHYA
 660 670 680 690 700
 RPEVVGQMGGA LLRAKLAQGA YRTAVDLESL ASQLTADLQE MSGDHRLLVF
 710 720 730 740 750
 HSPGEMVAEE APPPPPVVPS PEELSYLIEA LFKTEVLPQ LGYLRFDAMA
 760 770 780 790 800
 ELETVKAVGP QLVQLVWQKL VDTAALVVDL RYNPGSYSTA VPLLCSYFFE
 810 820 830 840 850
 AEPRRHLYSV FDRATSRVTE VWTLPHTVGTQ RYGSKHDLYV LVSHTSGSAA
 860 870 880 890 900
 EAFAHMQDL QRATIIIEPT AGGALSVGIY QVGSSALYAS MPTQMAMSAS
 910 920 930 940 950
 TGEAWDLAGV EPDITVPMSV ALSTARDIVT LRAKVPTVLQ TAGKLVADNY
 960 970 980 990 1000
 ASPELGVKMA AELSGLQSRV ARVTSEAALA ELLQADLQVL SGDPHLKTAH
 1010 1020 1030 1040 1050
 IPEDAKDRIP GIVPMQIPSP EVFEDLIKFS FHTNVLEGNV GYLRFDMFGD
 1060 1070 1080 1090 1100
 CELLTQVSEL LVEHVWKKIV HTDALIVDMR FNIGGPTSSI SALCSYFFDE
 1110 1120 1130 1140 1150
 GPPILLDKIY NRPNNSVSEL WTLSQLLEGER YGSKKSMVIL TSTLTAGAAE
 1160 1170 1180 1190 1200
 EFTYIMKRLG RALVIGEVTS GGCQPPQTYH VDDTDLYLTI PTARSVGAAD
 1210 1220 1230 1240 1250
 GSSWEGVGVV PDVAVPAEAA LTRAQEMLQH TPLRARRSPR LHGRRKGHHR
 1260 1270 1280
 QSQGRAGSLG RNQGVVRPEV LTEAPSGQKR GLLQCG

30

40

【 0 0 9 4 】

一態様では、IRBPはIRBPから誘導されるペプチドであり、好ましくは、IRBP 1177-1191 ADGSSWEGVGVVPDV (配列番号9) である。

【 0 0 9 5 】

MBPおよびIRBPのレベルは、好適な対照動物、例えば、外因性またはトランスジェニ

50

ックMBPおよびIRBPが投与されていない動物に対して、上昇している。

【0096】

MBPおよびIRBPのレベルは、いずれかの好適な手段により動物で上昇させることができる。例えば、これは、本明細書の実施例中に記載される通り、MBPおよびIRBPにより動物を免疫化することによるものであり得る。

【0097】

あるいは、前記上昇は、MBPおよび/またはIRBPをコードする1種以上の核酸分子を含む1種以上のベクターを投与することにより達成することができる。好ましい実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0098】

さらなる実施形態では、本発明は、ブドウ膜炎の動物モデルを作製するための方法を提供し、該方法は、動物体内でのMBPおよびIRBPのレベルを上昇させるステップを含む。

【0099】

好ましい実施形態では、方法は、動物にMBPおよびIRBPを投与することにより、MBPおよびIRBPのレベルを上昇させるステップを含み、これは、例えば、本明細書中の実施例に記載される通りに、MBPおよびIRBPにより動物を免疫化することによる。

【0100】

本動物モデルは、ブドウ膜炎に関連する特徴を有する。例えば、動物モデルでは、ブドウ膜炎の臨床的徴候が、MBPおよびIRBPのレベルが上昇していない同等な対照動物と比較して増加している場合がある。

【0101】

MBPおよび/またはIRBPは、ヒトMBPおよび/またはIRBPであり得る。

【0102】

必要とされる機能が動物モデルにおいて保持される限り、MBPまたはIRBPは、MBPもしくはIRBPの一部または断片または一部分であってよい。一態様では、IRBPはIRBP1177-1191ペプチド(ADGSSWEGVGVVPDV(配列番号9)、R16とも称される)であり得る。

【0103】

MBPおよび/またはIRBPは、いずれかの好適な様式で、例えば、経口的、静脈内(水溶性である場合)、筋内、皮下、舌下、鼻内、皮内または坐剤経路または埋め込み(例えば、徐放性分子を用いて)で動物に投与することができる。

【0104】

一態様では、投与は皮下投与である。

【0105】

動物に投与されるMBPの好適な用量は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400または500 μg であり得る。一態様では、約100 μg のMBPが投与される。

【0106】

動物に投与されるIRBPの好適な用量は、約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、40、50、60、70、80、90または100 μg であり得る。一態様では、約20 μg のIRBPが投与される。

【0107】

一態様では、MBPおよび/またはIRBPは、アジュバント(例えば、フロイントアジュバント)と共に投与される。

【0108】

MBPおよび/またはIRBPをコードする核酸は、当業者に周知の方法を用いて、例えば、本明細書中に記載されるMBPおよび/またはIRBP配列に基づいて、提供することができる。

【0109】

10

20

30

40

50

核酸は、天然、合成または組み換えであり得る。核酸は二本鎖または一本鎖であり得、DNAもしくはRNAまたはそれらの組み合わせであり得る。核酸は、例えば、cDNA、PCR産物、ゲノム配列またはmRNAであり得る。

【0110】

ヌクレオチド配列は、選択された宿主/宿主細胞での産生に最適化されたコドンであり得る。

【0111】

MBPおよび/またはIRBPをコードするヌクレオチド配列の送達は、ウイルス感染により媒介されることができる。好適なウイルスベクターは、当技術分野で周知である。例えば、ウイルスベクターは、アデノウイルス、レトロウイルスまたはレンチウイルスであり得る。

10

【0112】

動物モデルの作製は、ベクターの複数回投与を含む場合がある。

【0113】

ベクター（例えば、アデノウイルス）は、3週間間隔で投与することができる。例えば、ベクターは、18~25、18~23、19~23または20~22日間の間隔で投与することができる。ベクターは、20、21または22日間の間隔で投与することができる。

【0114】

動物モデルは、少なくとも2つの時点でアデノウイルスベクターを投与することを含む。例えば、アデノウイルスベクターは、2または3つの時点で投与されることができる。

20

【0115】

ベクター（例えば、アデノウイルス）は、1回の投与当たり $10^9 \sim 10^{11}$ 個のウイルス粒子の用量で投与することができる。特に、アデノウイルスは、1回の投与当たり $10^8 \sim 10^{11}$ 個のウイルス粒子の用量で投与することができる。アデノウイルスは、1回の投与当たり 10^9 個のウイルス粒子の用量で投与することができる。

【0116】

ベクターは、いずれかの好適な手段により投与することができる。例えば、アデノウイルスベクターの場合、ベクターは、筋内注入により投与することができる。

【0117】

動物は哺乳動物であり得る。例えば、動物は、マウス、ラット、ウサギ、モルモットまたは霊長類であり得る。好ましくは、動物はラットである。

30

【0118】

一実施形態では、動物は、Lewisラット、好ましくは雌Lewisラットである。

【0119】

例えば、本明細書の実施例に記載されるモデルは、5mg/mLのヒト型結核菌H37Raを添加した不完全フロイントアジュバント中に20マイクログラムのIRBP1177-1191および100マイクログラムのヒト(huMBP)またはモルモットミエリン塩基性タンパク質(gpMBP)を含有する200マイクロリットルのエマルジョンの皮下注入による投与により作製した。本明細書中で議論される通り、本発明に従うモデルは、脳脊髄炎の最小限誘導でブドウ膜炎を誘導するという利点を提供する。

40

【0120】

ここで、本発明は、以下の実施例を参照して説明される。

【実施例】

【0121】

実施例1

本研究は、Lewisラットでの、モルモットミエリン塩基性タンパク質(gpMBP)、ヒトミエリン塩基性タンパク質(huMBP)および/または光受容体間レチノイド結合性タンパク質による免疫化の、脳脊髄炎(EAE)および/またはブドウ膜炎(EAU)の発症に関する効果を研究することが目的であった。

【0122】

50

実験概要

成体雌Lewisラットを実験群に無作為に割り当て、1週間馴れさせた。0日目に、動物に、皮下注入により、5mg/mLのヒト型結核菌H37Ra (500 µg/ラット) (Becton Dickinson, UK) を添加した不完全フロイントアジュバント (Sigma, UK) 中に20マイクログラムのIRBP1177-1191 (Cambridge Bioscience, UK) および/または100マイクログラムのヒト (Fitzgerald Industries International, MA, US) またはモルモットミエリン塩基性タンパク質 (gpMBP) を含有する200マイクロリットルのエマルジョンを投与した。0日目から実験の終了まで、毎日動物の体重を計測した。0日目から実験の終了まで、尾、後肢および/もしくは前肢のひきずり (limpness)、知覚異常 (paresis) および/または麻痺 (paralysis) を含めた実験的自己免疫性脳脊髄炎の臨床的徴候について、動物を毎日スコア付けした。0日目から実験の終了まで、ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした。21日目 (第1群、第2群、および第3群) または28日目 (第4群および第5群) に、動物を間引きし、以下のサンプルを解剖により切り出し、任意的な組織病理分析のために組織固定剤の中に保存した: 脳、脊髄、右眼および左眼。

10

【0123】

治療群および投与量

第1群、第2群および第3群: n = 8/群

第4群および第5群: n = 14/群。

	群	抗原接種	解剖
1	IRBP	0日目: 20 µg IRBP を CFA+5 mg/ml ヒト型結核菌*中に含有する 200 µl エマルジョン	21日目
2	gpMBP	0日目: 100 µg gpMBP を CFA+5 mg/ml ヒト型結核菌*中に含有する 200 µl エマルジョン	
3	IRBP & gpMBP	0日目: 100 µg gpMBP を CFA+5 mg/ml ヒト型結核菌*中に含有する 200 µl エマルジョン	
4	huMBP	0日目: 100 µg huMBP を CFA+5 mg/ml ヒト型結核菌*中に含有する 200 µl エマルジョン	28日目
5	IRBP & huMBP	0日目: 20 µg IRBP および 100 µg huMBP を CFA+5 mg/ml ヒト型結核菌*中に含有する 200 µl エマルジョン	

20

30

n/a: 適用不可, IRBP: 光受容体間結合性タンパク質, gpMBP: モルモットミエリン塩基性タンパク質, huMBP: ヒトミエリン塩基性タンパク質, CFA: 完全フロイントアジュバント, SC: 皮下注入, *500 µg/ラット

【0124】

計測値

非特異的臨床所見

0日目から実験の終了まで、異常な姿勢 (身体を丸める)、異常な被毛の状態 (立毛) および異常な活動性レベル (活動性の低下または増大) を含めた非特異的な臨床的徴候について、動物を毎日チェックした。

40

【0125】

体重

0日目から実験の終了まで、毎日動物の体重を計測した。

【0126】

臨床スコア (ブドウ膜炎)

0日目から実験の終了まで、以下のスコア付けシステムを用いて、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物を目視でスコア付けした。想定上の最大スコアは3であった。データをグラフ化した (平均 ± SEM)。

50

【 0 1 2 7 】

説明

- 0 正常
- 1 若干の虹彩血管拡張および虹彩実質の肥厚、数個の散らばった炎症細胞
- 2 虹彩血管のうっ血、異常な瞳孔収縮
- 3 前房の混濁

【 0 1 2 8 】

10

0日目から実験の終了まで、中間部および後部ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした。非麻酔下であるが、1%トロピカミドおよび続いて2.5%塩酸フェニレフリンを用いて散瞳させた後の拘束された動物について、TEFIを用いて網膜画像を取得した。網膜画像は以下のシステムを用いてスコア付けした。想定上の最大スコアは6であった。データをグラフ化した(平均±SEM)。TEFI画像は、中間部および後部ブドウ膜炎の両方の症状を示す。

【 0 1 2 9 】

説明

網膜血管

- 1 1本の血管のうっ血
- 2 2本以上の血管のうっ血
- 3 すべての主要血管のうっ血

網膜組織浸潤

- 1 1~2箇所小さな網膜領域の損傷
- 2 3箇所以上の小さな領域または1箇所以上の大きな領域
- 3 視力喪失(ホワイアウトまたは重度剥離)(例えば、硝子体炎症または出血により引き起こされる)

20

30

【 0 1 3 0 】

結果

非特異的臨床所見

0日目から実験の終了まで、動物は、異常な姿勢(身体を丸める)、異常な被毛の状態(立毛)または異常な活動性レベル(活動性の低下または増大)などのいずれの非特異的な臨床的徴候も示さなかった。gpMBPを投与された動物では、IRBP投与群と比較して、11日目から21日目の実験の終了までに、有意な体重低下が観察された($p < 0.0001$)。

【 0 1 3 1 】

IRBPおよびgpMBPを投与された動物では、IRBP投与群と比較して、11日目から21日目の実験の終了までに、有意な体重低下が観察された(11日目に $p < 0.05$ 、12日目に $p < 0.001$ 、13日目から20日目に $p < 0.0001$ 、21日目に $p < 0.001$)。gpMBPのみを投与された動物とIRBPおよびgpMBPを投与された動物との間で、体重低下量に差はなかった。IRBPのみ、ヒトMBPまたはヒトMBP + IRBPを投与された動物では、顕著な体重低下は観察されなかった。

40

【 0 1 3 2 】

臨床スコア：ブドウ膜炎

少なくとも2回の連続するTEFIセッションで0.5超の両眼についての平均スコア(図2を参照されたい)またはいずれかの時点での1.0超のスコアを有した動物は、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候を生じていると考えられた。

【 0 1 3 3 】

50

この基準に基づいて、EAUの出現率は以下の通りであった：

群	出現率	発症 (日目)	最大スコア
IRBP	100% (8/8)	10.5 ± 0.5	5.6 ± 0.3
gpMBP	50% (4/8)	11.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2
gpMBP および IRBP	100% (8/8)	9.0 ± 0.8	4.9 ± 0.4
huMBP	100% (14/14)	10.2 ± 0.7	4.1 ± 0.5
huMBP および IRBP	100% (14/14)	9.9 ± 0.5	5.0 ± 0.3

10

【0134】

Lewisラットの網膜での色素形成の欠損に起因して、以下のスコア付けシステムを用いた。これは、混濁を生じさせる浸潤の領域を特定できないこと、および明るい背景上への細胞浸潤によるものである。視神経乳頭の炎症は、明白に特定することができず、したがってスコア付けされず、また、構造的損傷も観察されなかった。網膜血管の浸潤は、軽度から重度まで0～3のスコアで、うっ血した外見から特定することができた。網膜炎症は、これもまた0～3のスコアで、血管形成の増加により生じる小さな領域から大きな領域の発赤の外見により特定され、これにより想定上の合計スコアは6となる。

【0135】

20

説明
網膜血管
1 1本の血管のうっ血
2 2本以上の血管のうっ血
3 すべての主要血管のうっ血
網膜組織浸潤
1 1～2箇所小さな網膜領域の損傷
2 3箇所以上の小さな領域または1箇所以上の大きな領域
3 視力喪失(ホワイトアウトまたは重度剥離)

30

【0136】

後部ブドウ膜炎の臨床的徴候の出現率は、IRBPを単独でまたはgpMBPもしくはhuMBPと組み合わせて投与されたすべての実験群で最大であった。EAUの臨床的徴候はまた、IRBPなしでの、gpMBP投与動物のうちの50%およびhuMBP投与動物のうちの100%で観察された(図1を参照されたい)。

【0137】

EAUの臨床的徴候の発症は、実験群間で統計学的に異ならなかった。

40

【0138】

EAUの臨床的徴候の重症度は、IRBP ($p < 0.001$)、IRBPおよびgpMBP ($p < 0.01$)、IRBPおよびhuMBP ($p < 0.01$)またはhuMBP ($p < 0.05$)を投与された実験群と比較して、gpMBP投与動物で有意に低かった。

【0139】

前部ブドウ膜炎の臨床的徴候もまた、実験中に観察された。

【0140】

21日目までに収集されたデータは、二元配置分散分析および続いて実験群間の多重比較のためのダネットの事後検定(Dunnett's post-test)により解析した。

【0141】

50

IRBP投与動物では、11日目から臨床的徴候が観察された。徴候は、11日目、14日目および18日目でgpMBP投与群よりも有意に高かった ($p < 0.0001$) (図3)。

【0142】

IRBP & gpMBP投与動物でもまた、gpMBP投与群と比較して、前部ブドウ膜炎の徴候は11日目から観察された (11日目に $p < 0.0001$ 、14日目および18日目に $p < 0.01$ 、21日目に $p < 0.05$)。

【0143】

IRBP & huMBP投与動物では、前部ブドウ膜炎の徴候が、gpMBP投与群と比較して、11日目および14日目に観察された ($p < 0.0001$)。

【0144】

huMBP投与動物では、前部ブドウ膜炎の徴候が、gpMBP投与群と比較して、14日目 ($p < 0.0001$) および18日目 ($p < 0.01$) に観察された。

【0145】

モルモットMBPは、多発性硬化症 (MS) のモデルであるLewisラットで、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導する。本実験では、gpMBP単独 (出現率8/8ラット; 平均最大スコア3.5) またはIRBPペプチドとの組み合わせ (出現率8/8ラット; 平均最大スコア3.9) により免疫化されたLewisラットが重度EAEを発症し、そのスコアは麻痺症状に対する以下のスコア付けシステムを用いて得られた: (0) 異常なし、(0.5) 部分的尾部脱力、(1) 完全な尾部脱力、(2) 1本の後肢の知覚異常、(2.5) 2本の後肢の知覚異常、(3) 1本の後肢の麻痺、(4) 2本の後肢の麻痺、(5) 失禁および(6) 瀕死。gpMBP免疫化ラットとは異なり、他の群では非常に軽度の症状が示された: IRBPのみにより免疫化 (出現率2/8、平均最大スコア1.0); huMBP免疫化 (出現率3/14、平均最大スコア1.0) およびhuMBPとIRBPペプチドとの組み合わせ (出現率3/14、平均最大スコア1.0)。

【0146】

結論

huMBPの投与は、前部ブドウ膜炎および後部ブドウ膜炎の両方の徴候を生じさせた。

【0147】

IRBPと同時に投与した場合、前部ブドウ膜炎および中間部/後部ブドウ膜炎の両方の臨床的徴候が増大し、自己免疫性ブドウ膜炎に対する有効性について試験するための頑健なモデルを提供した。

【0148】

ヒトMBPによる免疫化後に発症したEAEの非常に低い出現率および重症度に加えて、実施例2に記載される通り、本発明に従うMBPペプチドの効果を研究するために、ヒトMBPのみでの、またはIRBPペプチドを追加した免疫化を伴うブドウ膜炎のモデルを用いることが決定された。

【0149】

実施例2

本実施例は、実施例1に記載される通りの、ヒトミエリン塩基性タンパク質 (huMBP) および光受容体間レチノイド結合性タンパク質 (IRBP) 誘導型ブドウ膜炎のLewisラットモデルでの、ATX-UV-3の効果の研究を詳述する。

【0150】

ATX-UV-3は、以下の配列を含む:

MBP 30-44 (配列番号1);

MBP 83-99 (配列番号2);

MBP 131-145 (配列番号3); および

MBP 140-154 (配列番号4)。

【0151】

方法

実験概要

成体雌Lewisラットを実験群に無作為に割り当て、1週間馴れさせた。0日目に、動物に

10

20

30

40

50

、皮下注入により、5mg/mLのヒト型結核菌H37Ra (500 µg/ラット) (Becton Dickinson, UK) および20マイクログラムのIRBP 1177-1191 (Cambridge Bioscience, UK) を添加した不完全フロイントアジュバント (Sigma, UK) 中に100マイクログラムのヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP) (Fitzgerald Industries International, MA, US) を含有する200マイクロリットルのエマルジョンを投与した。0日目から実験の終了まで、ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした。21日目に、臨床スコアを解析し、研究を35日目まで延長した。35日目に、動物を間引きし、眼 (右および左) を解剖により切り出し、組織病理分析のために組織固定剤の中に保存した。

【 0 1 5 2 】

【表 1】

表1: 治療群および投与量

(すべての群でn=12)

	群	治療			疾患誘導
		用量	経路	レジメン	
1	ビヒクル	n/a	SC	-8、-6 および-4 日目	0 日目 : 100 µg huMBP
2	ATX -UV-3	100 µg	SC	-8、-6 および-4 日目	および 20 µg IRBP

n/a: 適用不可, IRBP: 光受容体間結合性タンパク質, huMBP: ヒトミエリン塩基性タンパク質, SC: 皮下注入

【 0 1 5 3 】

非特異的臨床所見

0日目から実験の終了まで、異常な姿勢 (身体を丸める)、異常な被毛の状態 (立毛) および異常な活動性レベル (活動性の低下または増大) を含めた非特異的な臨床的徴候について、動物を毎日チェックした。

【 0 1 5 4 】

臨床スコア (ブドウ膜炎)

0日目から実験の終了まで、以下のスコア付けシステムを用いて、眼部炎症 (前部ブドウ膜炎) の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした : (0) 正常、(1) 若干の虹彩血管拡張および虹彩実質の肥厚、数個の散らばった炎症細胞、またはその両方、(2) 虹彩内の血管うっ血、異常な瞳孔収縮および (3) 前房の混濁。データをグラフ化した (平均 ± SEM) 。

【 0 1 5 5 】

【表 2】

表 2: 前部ブドウ膜炎スコア付け

スコア	説明
0	正常
1	若干の虹彩血管拡張および虹彩実質の肥厚、数個の散らばった炎症細胞
2	虹彩血管のうっ血、異常な瞳孔収縮
3	前房の混濁

【 0 1 5 6 】

0日目から実験の終了まで、ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした。非麻酔下であるが、1%トロピカミドおよび続いて2.5%塩酸フェニレフリンを用いて散瞳させた後の拘束された動物について、TEFIを用いて網膜画像を取得した。網膜画像は、想定上の最大スコアは10である下記の改変スコア付けシステムを用いてスコア付けした。データをグラフ化した (平均 ± SEM) 。

【 0 1 5 7 】

【表 3】

表 3: 中間部/後部ブドウ膜炎スコア付け

スコア	基準
網膜血管	
1	1本の血管のうっ血
2	2本以上の血管のうっ血
3	すべての主要血管のうっ血
4	「ホワイアウト ¹ 」に起因する視力喪失
網膜組織浸潤	
1	1~2箇所 <small>の</small> 小さな網膜領域 <small>の</small> 損傷
2	3箇所 <small>以上</small> の小さな領域 <small>または</small> 1箇所 <small>以上</small> の大きな領域
3	広範囲 <small>の</small> 損傷
4	視力喪失 <small>(ホワイアウトまたは重度剥離)</small>
構造的損傷	
1	折り目を伴う網膜剥離
2	視力喪失 <small>(ホワイアウトまたは重度剥離)</small>

10

20

¹ 中間部ブドウ膜炎とも称される

【 0 1 5 8 】

結果

非特異的臨床所見

0日目から実験の終了まで、動物は、異常な姿勢（身体を丸める）、異常な被毛の状態（立毛）または異常な活動性レベル（活動性の低下または増大）などのいずれの非特異的な臨床的徴候も示さなかった。

【 0 1 5 9 】

臨床スコア（ブドウ膜炎）

後部ブドウ膜炎

少なくとも2回の連続するTEFIセッションで0.5超の両眼についての平均スコアまたはいずれかの時点での1.0超のスコアを有した動物は、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候を生じていると考えられた（図5）。

【 0 1 6 0 】

【表 4】

表 4: 中間部/後部 EAU の出現率

群	出現率	発症 (日目)	最大スコア
huMBP/IRBP, ビヒクル	100% (12/12)	8.3 ± 0.4	7.3 ± 0.7
huMBP/IRBP, ATX-UV-3	100% (12/12)	9.8 ± 1.0	6.0 ± 0.5

30

40

【 0 1 6 1 】

臨床スコアは、二元配置分散分析および続いて各実験日での実験群間の多重比較のためのチューキーの事後検定（Tukey's post-test）により解析した（図5）。

【 0 1 6 2 】

huMBPおよびIRBPチャレンジ群では、ATXペプチドは、10日目（ $p < 0.0001$ ）、14日目（ $p < 0.01$ ）および17日目（ $p < 0.05$ ）で、ビヒクル処置群と比較して、臨床スコアを有意に低下させた。

50

【 0 1 6 3 】

曲線下面積 (AUC) 値を算出し、一元配置分散分析および続いてすべての実験群間での多重比較のためのシダックの事後検定 (Sidak's post-test) により各実験群についてのAUCを比較することにより、臨床スコアをさらに解析した (図6)。

【 0 1 6 4 】

huMBPおよびIRBPチャレンジ群では、ATXペプチドは、ビヒクル処置群と比較して、臨床スコアを有意に低下させた (p < 0.001)。

【 0 1 6 5 】

実施例3

ブドウ膜炎の動物モデルでのATX-UV-3の有効性を調べるために、さらなる研究を行なった。シクロスポリンAが、陽性対照として含められた (ヒトに対する生理的用量ではないであろうが、そのモデルを立証する目的で選択された高用量のシクロスポリンAを用いた)。

10

【 0 1 6 6 】

実験概要

成体雌Lewisラットを実験群に無作為に割り当て、1週間馴れさせた。処置は、以下のスケジュールに従って行なった。0日目に、動物に、皮下注入により、5mg/mLのヒト型結核菌H37Ra (500 µg/ラット) および/または20マイクログラムのIRBP1177-1191を添加した不完全フロイントアジュバント中に100マイクログラムのヒトミエリン塩基性タンパク質 (MBP) を含有する200マイクロリットルのエマルジョンを投与した。0日目から実験の終了まで、前部および後部ブドウ膜炎の臨床的徴候について、週2回、動物をスコア付けした。28日目に、動物を間引きし、眼 (右および左) を解剖により切り出し、任意的な組織病理分析のために、組織固定剤の中に移し、続いてパラフィン包埋のために加工し、パラフィンブロック中で保存した。

20

【 0 1 6 7 】

治療群および投与量

すべての実験群は、n = 12とした。

投与体積は、PO投与に対しては5mL/kgであり、SC投与に対してはラット1頭当たり100 µLの固定体積とした。

30

【 0 1 6 8 】

【表 5】

表 5

	群	治療			疾患誘導
		用量	経路	レジメン	
1	ビヒクル	n/a	SC	13回投与*	0日目: 100 µg huMBP
2	シクロスポリン A	20 mg/kg	PO	SID, 0日目~27日目	
3	ATX ペプチド	0.1~100 µg	SC	13回投与*	
4	ビヒクル	n/a	SC	13回投与*	0日目: 100 µg huMBP および 20 µg IRBP
5	シクロスポリン A	20 mg/kg	PO	SID, 0日目~27日目	
6	ATX ペプチド	0.1~100 µg	SC	13回投与*	

40

n/a: 適用不可, IRBP, 光受容体間結合性タンパク質; huMBP, ヒトミエリン塩基性タンパク質; CFA, 完全フロイントアジュバント; SC, 皮下注入; PO, per os, 強制経口投与; SID, semel in die, 1日1回
*ATXペプチドまたはビヒクルは以下の日に以下の用量で投与した: 0.1 µg/ラット、-22日目; 1 µg/ラット、-20日目; 10 µg/ラット、-18日目; 100 µg/ラット、-15、-13、-11、-8、-6、-4、3、10、17 および 24日目

【 0 1 6 9 】

計測値

非特異的臨床所見

50

0日目から実験の終了まで、異常な姿勢（身体を丸める）、異常な被毛の状態（立毛）および異常な活動性レベル（活動性の低下または増大）を含めた非特異的な臨床的徴候について、動物を毎日チェックした。非特異的な臨床的徴候が重度過ぎると判断した場合には、予定された研究の終了前に、動物を間引いた。

【0170】

体重

0日目から実験の終了まで、毎日動物の体重を計測した。

【0171】

臨床スコア（ブドウ膜炎）

0日目から実験の終了まで、以下のスコア付けシステムを用いて、眼部炎症（前部ブドウ膜炎）の臨床的徴候について、処置に対して不知である1人の担当者により、週2回、動物をスコア付けした：（0）正常、（1）若干の虹彩血管拡張および虹彩実質の肥厚、数個の散らばった炎症細胞、またはその両方、（2）虹彩内の血管うっ血、異常な瞳孔収縮および（3）前房の混濁。データをグラフ化した（平均±SEM）。

10

【0172】

【表6】

表6

前部ブドウ膜炎スコア付け:

説明
0 正常
1 若干の虹彩血管拡張および虹彩実質の肥厚、数個の散らばった炎症細胞
2 虹彩血管のうっ血、異常な瞳孔収縮
3 前房の混濁

20

【0173】

0日目から実験の終了まで、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候について、処置に対して不知である1人の担当者により、週2回、動物をスコア付けした。非麻醉下であるが、1%トロピカミドおよび続いて2.5%塩酸フェニレフリンを用いて散瞳させた後の拘束された動物について、TEFIを用いて網膜画像を取得した。網膜画像は、想定上の最大スコアが10である下記の改変スコア付けシステムを用いてスコア付けした。データをグラフ化した（平均±SEM）。

30

【0174】

40

50

【表 7】

表 7

後部/中間部ブドウ膜炎スコア付け:

基準	
網膜血管	
1	1本の血管のうっ血
2	2本以上の血管のうっ血
3	すべての主要血管のうっ血
4	「ホワイアウト」に起因する視力喪失
	10
網膜組織浸潤	
1	1~2箇所小さな網膜領域の損傷
2	3箇所以上の小さな領域または1箇所以上の大きな領域
3	広範囲の損傷
4	視力喪失(ホワイアウトまたは重度剥離)
	20
構造的損傷 ¹	
1	折り目を伴う網膜剥離
2	視力喪失(ホワイアウトまたは重度剥離)
	20
¹ 後部ブドウ膜炎は、適用不可である場合には構造的損傷を考慮せずに最終的にスコア付けした。	

【0175】

結果

非特異的臨床所見

-22日目から実験の終了まで、動物は、いかなる非特異的な臨床的徴候も示さなかった。

【0176】

体重

当初(-22日目)の体重のパーセンテージとして表されるhuMBPモデルおよびhuMBP + IRBPモデルについての体重を、二元配置分散分析および続いて実験群とビヒクル群の間での多重比較のためのダネットの事後検定(Dunnett's post-test)により解析した。二元配置分散分析により、huMBPモデルおよびhuMBP + IRBPモデルの両方での、時間および治療の有意な効果が明らかになった(すべて $p < 0.0001$)。huMBPモデルでは、ダネットの事後検定により、22日目、24日目および28日目での体重の、ビヒクル群に対する、シクロスポリンA群(すべて $p < 0.05$)およびATXペプチド群(それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$)での有意な増大が明らかになった。huMBP + IRBPモデルでは、ダネットの事後検定により、13日目、15日目、22日目、24日目および28日目での体重の、ビヒクル群に対する、シクロスポリンA群(それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ および $p < 0.01$)での有意な増大が明らかになった。

【0177】

前部ブドウ膜炎臨床スコア

2回の連続する時点での平均合計スコア(左眼 + 右眼の平均)1またはいずれかのTEFIセッション後に平均合計スコア1超を有する動物は、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候を生じていると考えられた。前部ブドウ膜炎臨床スコアを、二元配置分散分析および続いて実験群とビヒクル群の間での多重比較のためのダネットの事後検定(Dunnett's post-test)により解析した。huMBPモデルでは、すべてのマウスが、研究期間の全体を通して、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候を示さなかった。huMBP + IRBPモデルでは、二元配置分散分析により、時間および治療の有意な効果が明らかになった(両方とも $p < 0.0001$)。ダネット

10

20

30

40

50

トの事後検定により、ビヒクル群に対する、7日目、10日目、14日目、17日目、21日目および28日目でのシクロスポリンA群（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ および $p < 0.05$ ）ならびに10日目でのATXペプチド群（ $p < 0.0001$ ）での臨床スコアの有意な改善が明らかになった（図7A）。前部ブドウ膜炎臨床スコアデータの曲線下面積（AUC）解析の対応のない両側二標本スチューデントt検定により、ビヒクルに対する、シクロスポリンA（ $p < 0.0001$ ）およびATXペプチド（ $p < 0.05$ ）の有意な効果が明らかになった（図7B）。

【0178】

後部/中間部ブドウ膜炎臨床スコア

2回の連続する時点での平均合計スコア（左眼 + 右眼の平均）1またはいずれかのTEFIセッション後に平均合計スコア1超を有する動物は、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候を生じていると考えられた。後部ブドウ膜炎臨床スコアを、二元配置分散分析および続いて実験群とビヒクル群の間での多重比較のためのダネットの事後検定（Dunnett's post-test）により解析した。huMBPモデルでは、二元配置分散分析により、時間および治療の有意な効果が明らかになった（両方とも $p < 0.0001$ ）。ダネットの事後検定により、ビヒクル群に対する、7日目、10日目、14日目、17日目、21日目、24日目および28日目でのシクロスポリンA群（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.01$ および $p < 0.05$ ）ならびに7日目、10日目、14日目、17日目、21日目、24日目および28日目でのATXペプチド群（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.01$ および $p < 0.05$ ）での臨床スコアの有意な改善が明らかになった（図8A）。huMBPモデルでは、後部ブドウ膜炎臨床スコアデータの曲線下面積（AUC）解析の対応のない両側二標本スチューデントt検定により、ビヒクルに対する、シクロスポリンA（ $p < 0.0001$ ）およびATXペプチド（ $p < 0.0001$ ）の有意な効果が明らかになった（図8B）。

【0179】

huMBP + IRBPモデルでは、二元配置分散分析により、時間および治療の有意な効果が明らかになった（両方とも $p < 0.0001$ ）。ダネットの事後検定により、ビヒクル群に対する、7日目、10日目、14日目、17日目および21日目でのシクロスポリンA群（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ および $p < 0.05$ ）ならびに10日目でのATXペプチド群（ $p < 0.01$ ）での臨床スコアの有意な改善が明らかになった（図8C）。後部ブドウ膜炎臨床スコアデータの曲線下面積（AUC）解析の対応のない両側二標本スチューデントt検定により、ビヒクルに対する、シクロスポリンA（ $p < 0.0001$ ）の有意な効果が明らかになった（図8D）。後部ブドウ膜炎臨床スコアデータの曲線下面積（AUC）解析の対応のない片側二標本スチューデントt検定により、ビヒクルに対して、ATXペプチド（ $p < 0.05$ ）の有意な効果が明らかになった（図8D）。

【0180】

後部/中間部ブドウ膜炎の出現率

2回の連続する時点での平均合計スコア（左眼 + 右眼）1またはいずれかのTEFIセッション後に平均合計スコア1超を有する動物は、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候を生じていると考えられた。

【0181】

huMBPモデルでは、シクロスポリンAおよびATXペプチドを用いて治療された動物は、ビヒクル処置動物と比較して、出現率が低下していた（図9A）。シクロスポリンAを用いて治療された1頭の動物およびATXペプチドを用いて治療された3頭の動物だけが、EAUの臨床的徴候を生じた（表8を参照されたい）。

【0182】

10

20

30

40

50

【表 8】

群	ブドウ膜炎の出現率	発症 (日目)	平均最大スコア
huMBP, ビヒクル	100% (12/12)	10.4 ± 1.3	1.8 ± 0.07
huMBP, シクロスポリン A	5% (1/12)	3	1.2 ± 0.7
huMBP, ATX ペプチド	25% (3/12)	8 ± 1	1.08 ± 0.2 [§]
huMBP/IRBP, ビヒクル	100% (12/12)	7.7 ± 0.8	7.9 ± 0.08
huMBP/IRBP, シクロスポリン A	100% (12/12)	12.8 ± 0.7	6.1 ± 0.5
huMBP/IRBP, ATX ペプチド	100% (12/12)	10.3 ± 0.3	7.9 ± 0.08

[§] 動物 3.10 に関しては、21 日目でのスコア 4(左眼スコアと右眼スコアの平均)はデータ解析に含めなかった(グラブス検定で $\alpha = 0.05$ を伴う外れ値が、21 日目の後部ブドウ膜炎臨床スコアデータの分析により特定された)

huMBP + IRBPモデルでは、シクロスポリンAは、ビヒクル処置群と比較した場合に、後部ブドウ膜炎の発症を有意に遅延させた ($p < 0.0001$) (図9B)。ATXペプチドは、ビヒクル処置群と比較して、後部/中間部ブドウ膜炎の発症を有意に遅延させた ($p < 0.05$) (図9B)。

【0183】

結論

huMBP単独またはIRBPと組み合わせた投与は、後部ブドウ膜炎の臨床的徴候を誘導し、それにより、EAUのこれらのモデルで予測される通り、血管拡張、網膜炎および細胞浸潤が生じた。後部ブドウ膜炎の臨床的徴候は、huMBP + IRBPを投与された動物と比較して、huMBPモデルでは重症度が低かった。

【0184】

huMBP + IRBPモデルでは、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候が観察されたが、huMBPモデルでは観察されなかった。huMBP + IRBPモデルでは、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候は、虹彩の血管形成増大および前房の細胞浸潤ならびに異常な瞳孔収縮を含んでいた。

【0185】

全体として、huMBP + IRBPモデルでは、シクロスポリンAおよびATXペプチドは、前部ブドウ膜炎の臨床的徴候を有意に減少させた。

【0186】

huMBPモデルでは、シクロスポリンAおよびATXペプチドは、ビヒクル処置動物と比較して、後部ブドウ膜炎の出現率を低下させた。

【0187】

シクロスポリンAおよびATXペプチドは、ビヒクル処置群と比較した場合に、huMBP + IRBPモデルでの後部ブドウ膜炎の発症を有意に遅延させた。

【0188】

全体として、huMBPモデルおよびhuMBP + IRBPモデルで、シクロスポリンAおよびATXペプチドは、後部/中間部ブドウ膜炎の臨床的徴候を有意に減少させた。

【0189】

上記で言及したすべての刊行物は、参照により本明細書中に組み入れられる。本発明の記載された方法およびシステムの様々な改変および変法が、本発明の精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明を、具体的な好ましい実施形態との関連で説明してきたが、特許請求される発明は、そのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことが理解されるはずである。実際に、分子生物学、細胞免疫学または関連する分野の当業者には明白である本発明を実施するための記載された様式の様々な改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

本発明は以下の態様も提供する。

[1] 被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための、以下のペプチドから選択されるミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含む組成物：

MBP 30-44 (配列番号1) ;
MBP 83-99 (配列番号2) ;
MBP 131-145 (配列番号3) ; および
MBP 140-154 (配列番号4) 。

[2] 以下のペプチドを含む、[1] に記載の使用のための組成物：

MBP 30-44 (配列番号1) ;
MBP 83-99 (配列番号2) ;
MBP 131-145 (配列番号3) ; および
MBP 140-154 (配列番号4) 。

10

[3] ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、[1] に記載の使用のための組成物。

[4] 被験体のブドウ膜炎の治療および/または予防のための医薬の製造における、[1] または[2] に規定される組成物の使用。

[5] ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、[4] に記載の使用。

[6] [1] または[2] に規定される組成物を被験体に投与するステップを含む、被験体のブドウ膜炎を治療または予防するための方法。

20

[7] ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、[8] に記載の方法。

[8] 被験体のブドウ膜炎の治療または予防での使用のための、以下のペプチドから選択されるミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含むキット：

MBP 30-44 (配列番号1) ;
MBP 83-99 (配列番号2) ;
MBP 131-145 (配列番号3) ; および
MBP 140-154 (配列番号4) 。

[9] 以下のペプチドを含む、[8] に記載の使用のためのキット：

MBP 30-44 (配列番号1) ;
MBP 83-99 (配列番号2) ;
MBP 131-145 (配列番号3) ; および
MBP 140-154 (配列番号4) 。

30

[10] 前記MBPペプチドが、同時投与、分離投与または連続的投与のためのものである、[9] に記載の使用のためのキット。

[11] ブドウ膜炎の動物モデルであって、該動物が、ヒトMBPおよび光受容体間レチノイド結合性タンパク質 (IRBP) ペプチドにより免疫化されている、動物モデル。

[12] 前記ブドウ膜炎が、後部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または中間部ブドウ膜炎である、[11] に記載の動物モデル。

[13] MBPがヒトMBPであり、かつIRBPがウシIRBPである、[11] または[12] に記載の動物モデル。

40

[14] MBPおよびIRBPが皮下注入により投与される、[11] ~ [13] のいずれか1項に記載の動物モデル。

[15] 動物がラットである、[11] ~ [14] のいずれか1項に記載の動物モデル。

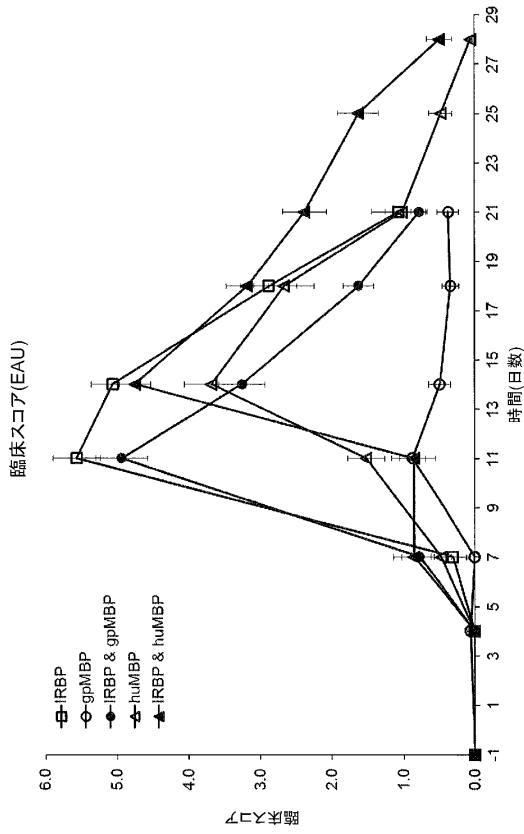
[16] ラットがLewisラットである、[15] に記載の動物モデル。

[17] Lewisラットが雌Lewisラットである、[16] に記載の動物モデル。

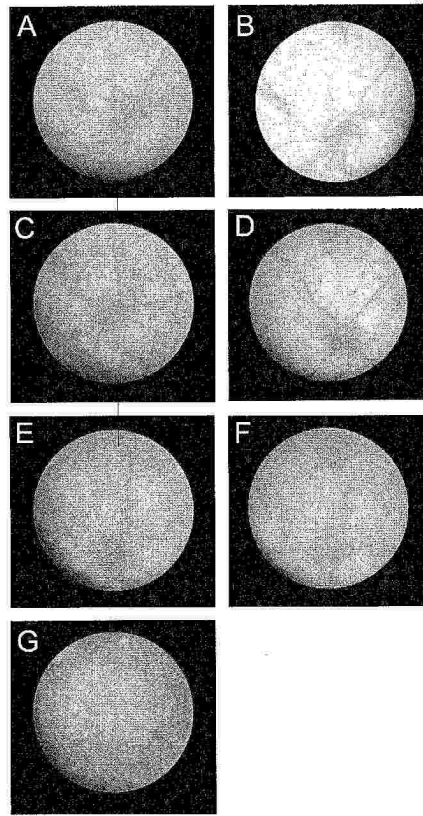
50

【図面】

【図 1】



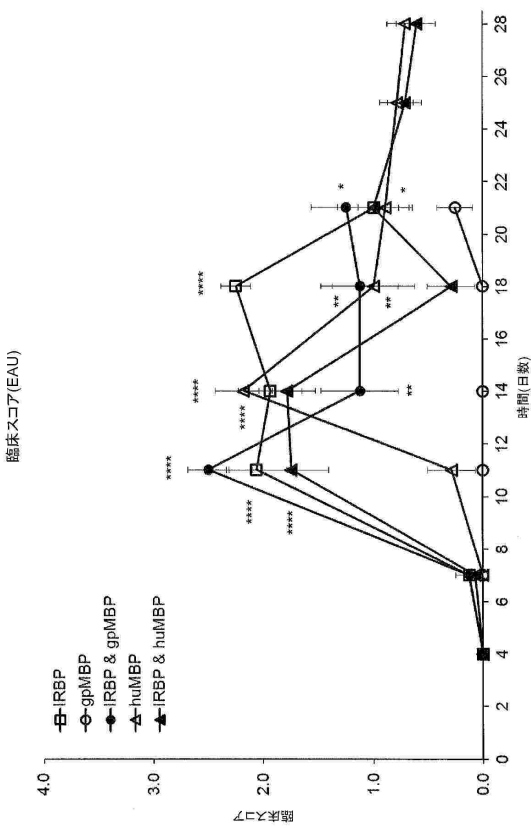
【図 2】



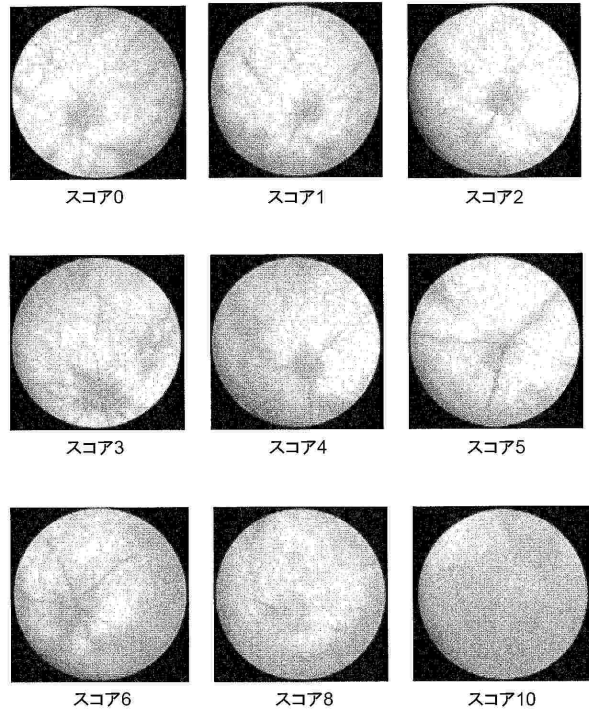
10

20

【図 3】



【図 4】

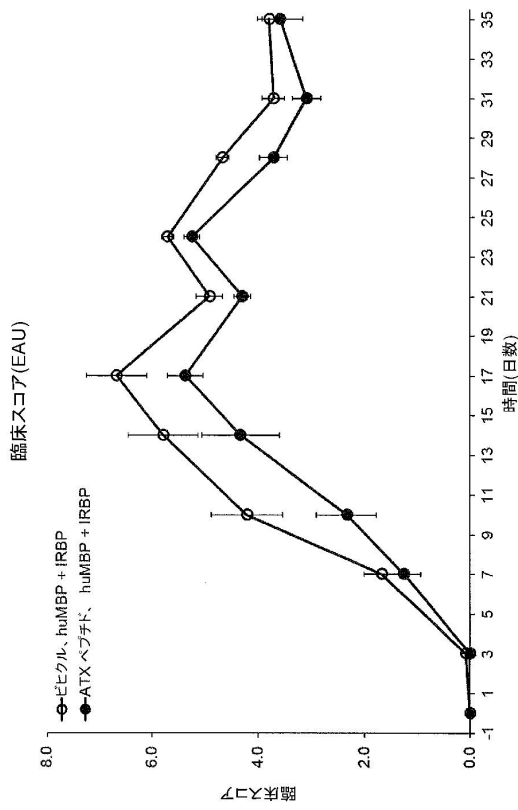


30

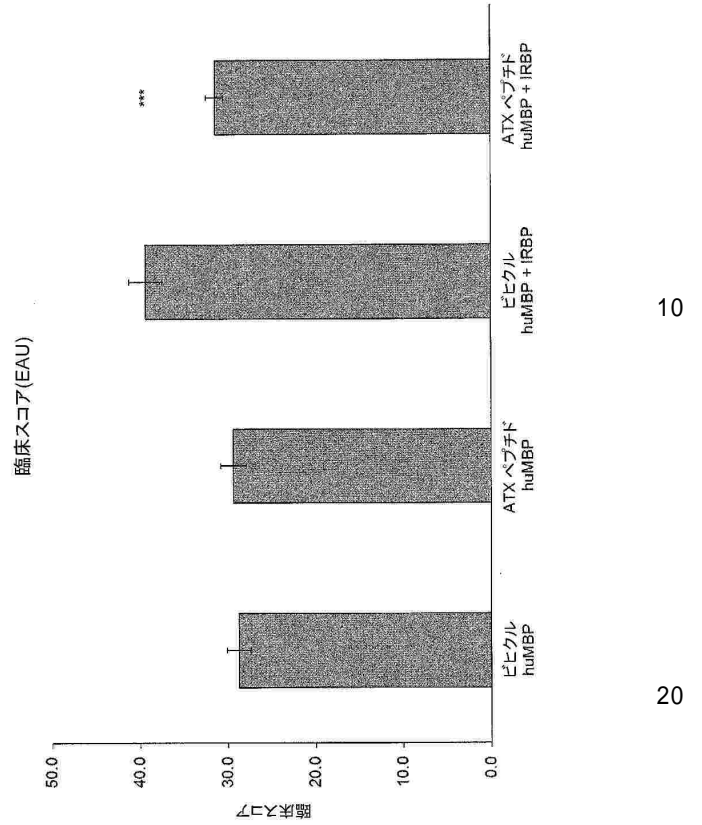
40

50

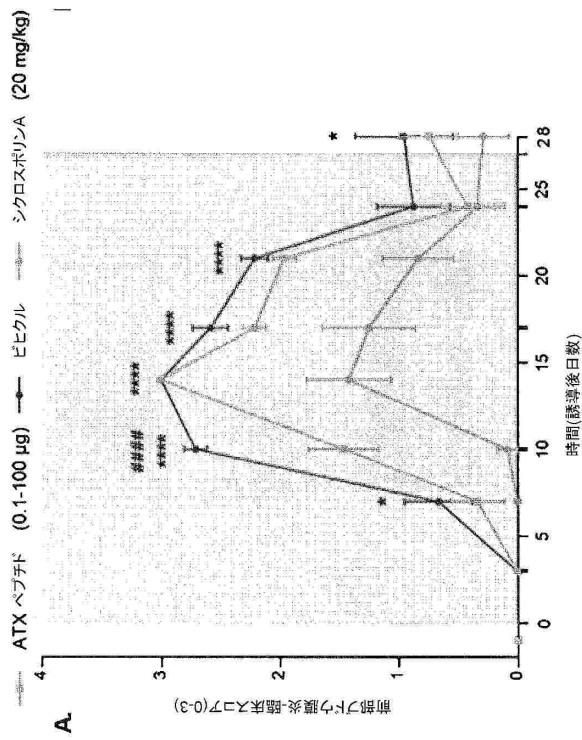
【 図 5 】



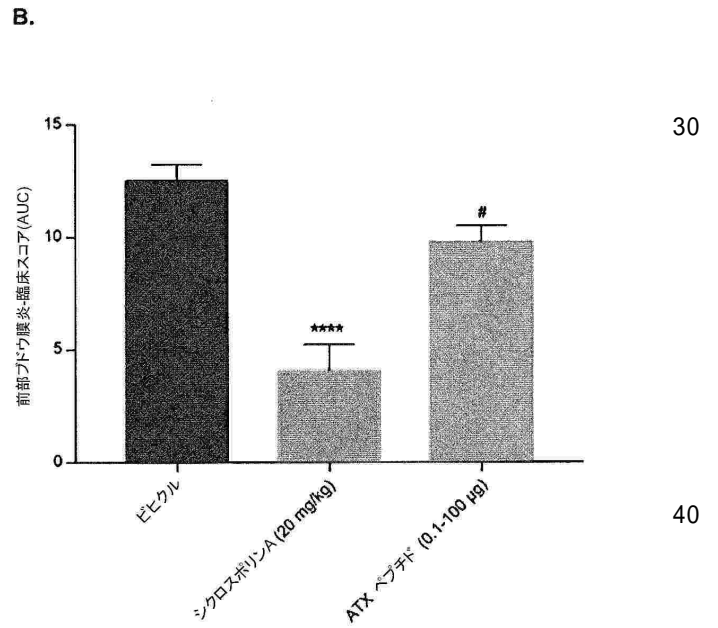
【 図 6 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



10

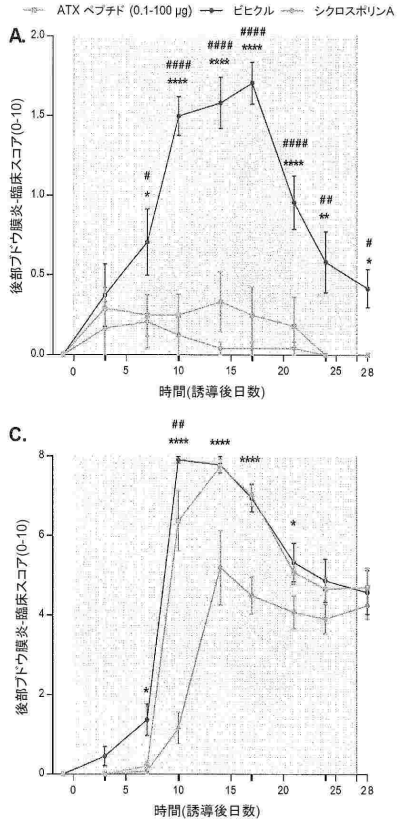
20

30

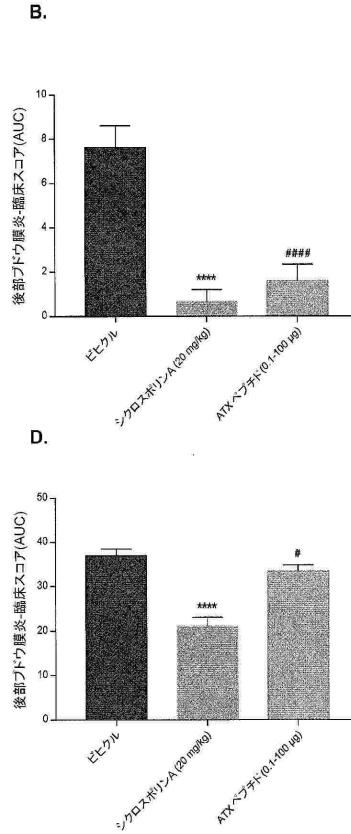
40

50

【 図 8 - 1 】



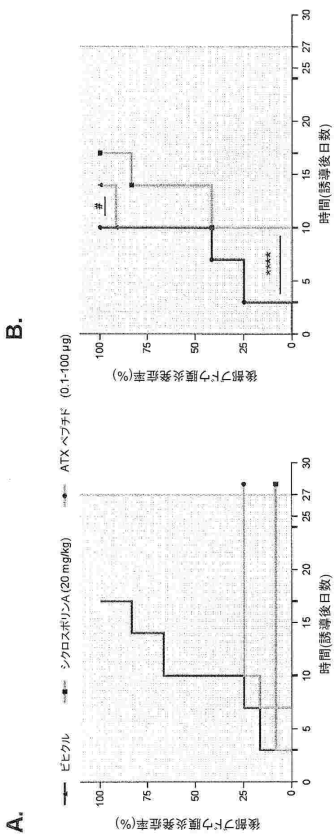
【 図 8 - 2 】



10

20

【 図 9 】



30

40

50

【配列表】

0007632996000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

英国(GB)

ートパーク, リバーサイドコート, アピトープテクノロジー (ブリストル) リミテッド

合議体

審判長 松波 由美子

審判官 富永 みどり

審判官 山村 祥子

(56)参考文献 特表2011-500776(JP,A)

特表2016-500677(JP,A)

Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006年, Vol. 47, p. 2555-2561, doi:https://doi.org/10.1167/iovs.05-1242

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K

CAplus/REGISTRY/BIOSIS(STN)