



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0818302-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 30/10/2008

**(45) Data de Concessão:** 12/04/2022

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO

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

**(30) Prioridade Unionista:** 18/01/2008 GB 0800962.3; 31/10/2007 GB 0721430.7.

**(73) Titular(es):** APITOPE TECHNOLOGY (BRISTOL) LIMITED.

**(72) Inventor(es):** DAVID WRAITH; HEATHER STREETER.

**(86) Pedido PCT:** PCT GB2008003673 de 30/10/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/056833 de 07/05/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 29/04/2010

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO. A presente invenção se refere a uma composição a qual compreende os seguintes peptídeos de proteína básica de mielina: MBP 30-44, MBP 83-99; MBP 131-145; e MBP 140-154. A composição pode ser usada para tratar uma doença, particularmente esclerose múltipla e/ou neurite ótica e a invenção também se refere a tais usos e métodos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**"COMPOSIÇÃO".**

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a uma composição a qual  
5 compreende os peptídeos da proteína básica de mielina. A  
composição pode ser usada para o tratamento de esclerose  
múltipla.

Antecedentes da Invenção

ESCLEROSE MÚLTIPLA

10 Esclerose Múltipla (EM) é a condição neurológica  
incapacitante mais comum que afeta os adultos jovens. Cerca  
de 85.000 pessoas no Reino Unido têm EM.

Na esclerose múltipla (EM), a inflamação do tecido  
nervoso causa a perda de mielina, um material graxo que  
15 atua como um isolante protetor para as fibras nervosas no  
cérebro e na medula espinal. Esta perda de mielina, ou  
desmielinação, deixa várias áreas de tecido de cicatriz, ou  
esclerose, ao longo das células nervosas. Consequentemente,  
a esclerose resulta em múltiplos e variados sinais e  
20 sintomas neurológicos, geralmente com reincidência e alívio  
repetido.

Sintomas comuns de EM incluem perda de visão ou visão  
reduzida, andar sem firmeza e andadura torta, pronúncia  
indistinta, assim como frequência urinária e incontinência.

Além disso, EM pode causar alterações de humor e depressão, espasmos musculares e paralisia severa.

É atualmente aceito de modo geral que EM é uma doença auto-imune mediada pelas células T auto-reativas.

5 Os tratamentos atuais para EM geralmente suprimem o sistema imune. Por exemplo, um tratamento inclui o transplante de medula óssea juntamente com a administração de fármacos citostáticos e imunossupressores. Esse tratamento é eficaz para alguns pacientes, mas é caro e de  
10 risco relativamente alto. Adicionalmente, a administração de citostáticos é considerada controversa no tratamento de MS porque seus efeitos são incertos e os efeitos colaterais potenciais são severos.

O tratamento com interferon-beta ( $\text{IFN}\beta$ ) reduz os  
15 sintomas de EM em alguns pacientes e é, deste modo, amplamente usado. Entretanto, o mecanismo de ação do interferon-beta é incerto e o tratamento com  $\text{IFN}\beta$  é ineficaz para muitos pacientes. Além disso, o tratamento com  $\text{IFN}\beta$  é composto pelo desenvolvimento de anticorpos  
20 anti- $\text{IFN}\beta$  na maioria dos pacientes Giovannoni, G., Munschauer, F. E., 3ª, e Deisenhammer, F. (2002) Neutralising antibodies to interferon beta during the treatment of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73, 465-469.

Atualmente, um tratamento eficaz para EM não existe. O tratamento é focado meramente na redução de seus sintomas, geralmente pela supressão generalizada do sistema imune. Existe, portanto, uma necessidade crítica para uma terapia a qual almeje especificamente as respostas imunes locais associadas com o início e progressão da doença.

#### PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Metzler e Wraith (Int. Immunol. 5:1159-1165 (1993)) foram os primeiros pesquisadores a descrever o uso de peptídeos sintéticos para induzir a supressão de uma resposta auto-imune no modelo de encefalomielite auto-imune experimental de camundongo (EAE), um modelo *in vivo* comumente usado de MS. Neste estudo, peptídeos derivados de MBP foram administrados pela via intranasal, e foi descoberto que o nível de supressão da doença se correlacionava com a força antigênica do peptídeo usado.

Posteriormente, em 1995, Liu e Wraith (Int. Immunol. 7:1255-1263) demonstraram que também era possível induzir a supressão de EAE em camundongos pela administração intraperitoneal de peptídeos derivados de MBP solúveis. Neste estudo, a supressão das respostas tanto de Th1 quanto de Th2 foi alcançada, e foi demonstrado que a administração dos peptídeos depois do início de uma resposta imune poderia levar à supressão da reação imune em progresso.



Entretanto, foi descoberto que nem todos os peptídeos capazes de atuar como epítomos de células T são capazes de induzir a tolerância. O peptídeo da proteína básica de mielina (MBP) 89 - 101 é um antígeno imunodominante depois da imunização e é também um imunógeno muito eficaz tanto em termos de iniciação para a reatividade da célula T quanto de indução de EAE. Entretanto, este peptídeo foi demonstrado como sendo ineficaz na indução da tolerância quando administrado em solução (Anderton e Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261).

Os presentes inventores demonstraram anteriormente que existe uma ligação entre a capacidade de um peptídeo de se ligar a uma molécula MHC de classe I ou II e ser apresentado a uma célula T sem processamento de antígeno adicional e sua capacidade de induzir tolerância *in vivo*. Peptídeos os quais são independentes do processamento de antígeno (isto é, não requerem processamento de antígeno adicional para se ligar ao MHC) podem ser previstos como sendo tolerogênicos *in vivo*. Esses peptídeos foram chamados de "apítomos", para Epítomos Independentes de Processamento de Antígeno.

O documento WO 02/16410 descreve os seguintes apítomos da proteína básica de mielina (MBP): 30-44, 80-94, 83-99, 81-95, 82-96, 83-97, 84-98, 110-124, 130-144, 131-145, 132-

146 e 133-147.

O documento WO 03/064464 identifica os seguintes peptídeos MBP como sendo apítomos: 134-148; 135-149; 136-150; 137-151; 138-152 e 140-154.

## 5 Sumário da Invenção

Os presentes inventores descobriram que um "coquetel" de quatro peptídeos MBP, todos os quais sendo apítomos, é particularmente eficaz no tratamento de MS. Acredita-se que os quatro peptídeos possam exercer um efeito sinérgico quando combinados.

Portanto, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição, a qual compreende os seguintes peptídeos da proteína básica de mielina:

MBP 30-44;

15 MBP 83-99;

MBP 131-145; e

MBP 140-154.

A composição pode consistir essencialmente de MBP 30-44, 83-99, 131-145 e 140-154.

20 A composição pode ser usada para tratar ou prevenir uma doença, particularmente esclerose múltipla.

A composição pode ser usada para tratar ou prevenir neurite ótica, particularmente neurite ótica associada com esclerose múltipla.

Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a um método de tratamento ou prevenção de esclerose múltipla e/ou neurite ótica pela administração de uma composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção a um indivíduo.

5        No método do segundo aspecto da invenção, a composição pode ser administrada após um protocolo de aumento gradativo de dose.

      Foi descoberto que dois dos peptídeos no coquetel são a ligação de HLA-DQ6 (MBP 30-44 e 131-145) e dois são a  
10      ligação de HLA-DR2 (MBP 140-154 e 83-99). O uso combinado desses apítopos fornece uma cobertura mais ampla dos diferentes haplótipos do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) vistos em pacientes com MS do que a terapia com um único peptídeo.

15        O método do segundo aspecto da invenção pode envolver a administração da composição a um indivíduo HLA-DQ6 ou HLA-DR2 positivo.

      Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece um kit, o qual compreende os seguintes peptídeos da proteína  
20      básica de mielina:

      MBP 30-44;

      MBP 83-99;

      MBP 131-145; e

      MBP 140-154

para a administração simultânea, separada ou sequencial.

#### Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é a apresentação de MBP 30-44 por HLA-DQ6 ao clone de célula T MS 49:D3.

5 A Figura 2 é a apresentação de MBP 130-144 por HLA-DQ6 ao clone de célula T MS 17:A2.

A Figura 3 é a apresentação de MBP 139-153 por HLA-DR2a e células L transfectadas com HLA-DR2b ao clone de células T N5:19.

10 A Figura 4 é a resposta proliferativa das células do nódulo linfático após a tolerização com o apítopo MS6

A Figura 5 é a proliferação dos esplenócitos em resposta ao apítopo MS7. Os esplenócitos obtidos de camundongos tratados por administração intranasal de PBS ou  
15 apítopo MS7 (83-99).

A Figura 6 é a proliferação dos esplenócitos em resposta ao apítopo MS7. Os esplenócitos obtidos de camundongos tratados por administração subcutânea/intradérmica de PBS ou de apítopo MS7 (83-99).

20 A Figura 7 é a produção de IFN $\gamma$  e IL-2 pelos esplenócitos obtidos de camundongos tratados por administração subcutânea/intradérmica de PBS ou Apítopo MS7 (83-99)

A Figura 8 é um Exemplo de Tabela de Snellens

A Figura 9 são as respostas do PBMC do paciente à proteína básica de mielina humana (MBP)

A Figura 10 são as respostas de PBMC do paciente a ATX-MS-1467

5 A Figura 11 é a comparação da resposta proliferativa da célula T à MBP antes de (visita 1) e após (visita 8) o tratamento com ATX-MS-1467

#### Descrição Detalhada da Invenção

10 O primeiro aspecto da invenção se refere a uma composição a qual compreende uma pluralidade de peptídeos da proteína básica de mielina.

#### PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA

A proteína básica de mielina (MBP) é uma proteína de 18,5 KDa isolável da massa branca do cérebro humano. A  
15 proteína madura tem 170 aminoácidos e a sequência é amplamente disponível na literatura (ver, por exemplo: Chou et al (1986) J. Neurochem. 46:47-53, Figura 1; Kamholz et al (1986), PNAS 83:4962-4966, Figura 2; Patente Americana No. 5.817.629, SEQ ID NO: 1; Roth et al (1987), J.  
20 Neurosci. Res. 17:321-328, Figura 4; Medeviczky et al (2006), FEBS Letters 580:545-552, Figura 3B).

#### PEPTÍDEOS MBP

O termo "peptídeo" é usado no sentido normal para significar uma série de resíduos, tipicamente L-



aminoácidos, conectados uns aos outros tipicamente por ligações peptídicas entre os grupos  $\alpha$ -amino e carboxila dos aminoácidos adjacentes. O termo inclui peptídeos modificados e análogos de peptídeos sintéticos.

5 Os peptídeos usados na composição e no kit da presente invenção podem ser feitos usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlim.). Por exemplo, peptídeos podem ser sintetizados por técnicas em fase sólida (Roberge JY et al  
10 (1995) Science 269: 202-204), clivado da resina e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (por exemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nova Iorque NY). A síntese automatizada pode ser  
15 conseguida, por exemplo, usando o Sintetizador de Peptídeo ABI 431 A (Perkin Elmer) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O peptídeo pode ser alternativamente feito por meios recombinantes ou por clivagem de um polipeptídeo mais  
20 longo. Por exemplo, o peptídeo pode ser obtido por clivagem de MBP de comprimento total. A composição do peptídeo pode ser confirmada por análise ou sequenciamento de aminoácidos (por exemplo, o procedimento de degradação de Edman).

Os peptídeos usados nas composições e kits da presente

invenção são os seguintes:

**MBP 30-44:**

H-Pro-Arg-His-Arg-Asp-Thr-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Ile-Gly-  
Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

5 **MBP 83-99:**

H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-  
Pro-Arg-Thr-Pro-NH<sub>2</sub>

**MBP 131-145:**

10 H-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser-Ala-His-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-  
Val-Asp-NH<sub>2</sub>

**MBP 140-154:**

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

Os termos "MBP 30-44", "MBP 83-99", "MBP 131-145" e  
15 "MBP 140-154" englobam peptídeo modificado. Por exemplo, os  
peptídeos podem ser modificados, por inserção, eliminação  
ou substituição de aminoácidos, contanto que a  
especificidade de ligação ao MHC do peptídeo não-modificado  
é retida, juntamente com a sua capacidade de ser  
20 apresentado a uma célula T. O peptídeo pode, por exemplo,  
ter 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 mutações da sequência não-  
modificada.

Alternativamente (ou, além disso), modificações podem  
ser feitas sem mudar a sequência de aminoácidos do

peptídeo. Por exemplo, D-aminoácidos ou outros aminoácidos não-naturais podem ser incluídos, a ligação amida normal pode ser substituída por ligações de estrutura éster ou alquil, substituintes N ou C-alquil, modificações de cadeia lateral, e restrições tais como ligações dissulfeto e amida de cadeia lateral ou ligações éster podem ser incluídas. Tais alterações podem resultar em uma maior estabilidade *in vivo* do peptídeo, e um tempo de vida biológico mais longo.

A modificação dos epítopos pode ser efetuada baseando-se nas previsões para a indução de células T mais eficientes derivadas usando o programa "Peptide Binding Predictions" planejado por K. Parker (NIH) o qual pode ser encontrado em [http://www.bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://www.bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (ver também Parker, K. C et al. 1994. J. Immunol. 152:163).

Peptídeos MBP podem ser formulados na composição como formas neutras ou de sal. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres do peptídeo) e os quais são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou tais ácidos orgânicos como acético, oxálico, tartárico e maleico. Sais formados com os grupos carboxila livre também podem ser derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio

ou férrico, e tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina e procaína.

#### COMPOSIÇÃO

A composição da presente invenção pode ser para uso  
5 profilático ou terapêutico.

A composição pode ser preparada como um injetável, ou como solução líquida ou suspensão; forma sólida adequada para a solução em, ou suspensão em líquido antes de a injeção puder ser preparada. A preparação pode também ser  
10 emulsificada, ou os peptídeos encapsulados em lipossomas. Os ingredientes ativos podem ser misturados com excipientes os quais são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, salina (por exemplo, salina tamponada com  
15 fosfato), dextrose, glicerol, etanol ou semelhante e combinações suas.

Além disso, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias adjuvantes como agentes de umidificação ou emulsificantes e/ou agentes tamponantes  
20 de pH. Os sais tamponantes incluem fosfato, citrato, acetato. Ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio podem ser usados para ajuste de pH. Para estabilização, dissacarídeos podem ser usados como sacarose ou trealose.

Na composição, a proporção relativa dos peptídeos (MBP



30-44:MBP 83-99:MBP 131-145:MBP 140-154) pode ser aproximadamente 1:1:1:1. Alternativamente, as proporções relativas de cada peptídeo podem ser alteradas, por exemplo, para focar na resposta tolerogênica em um subgrupo particular de células T auto-reativas ou se foi descoberto que um peptídeo funciona melhor do que os outros, particularmente tipos HLA.

Depois da formulação, a composição pode ser incorporada em um recipiente estéril o qual é a seguir lacrado e armazenado em uma baixa temperatura, por exemplo, de 4 °C, ou ela pode ser liofilizada.

Convenientemente, a composição é preparada como um pó liofilizado. A liofilização permite o armazenamento em longo prazo em uma forma estabilizada. Os procedimentos de liofilização são bem conhecidos na técnica, ver por exemplo <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>.

Agentes de carga são comumente usados antes da liofilização, como manitol, dextrana ou glicina.

A composição pode ser administrada de modo conveniente como pelas vias oral, intravenosa (quando solúvel em água), intramuscular, subcutânea, sublingual, intranasal, intradérmica ou supositória ou implante (por exemplo, usando moléculas de liberação lenta).

A composição pode ser vantajosamente administrada



através das vias intranasal, subcutânea ou intradérmica.

O método e composição farmacêutica da invenção podem ser usados para tratar um indivíduo humano. Tipicamente, um clínico irá determinar a dose efetiva o qual será mais adequado para um indivíduo individual e irá variar com a idade, peso e resposta do paciente particular.

Em uma modalidade preferida, um protocolo de "aumento gradual de dose" pode ser seguido, onde uma pluralidade de doses é dada ao paciente nas concentrações ascendentes. Tal abordagem pode ser usada, por exemplo, para os peptídeos da fosforilase A2 em aplicações imunoterápicas contra a alergia ao veneno de abelha (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101: 747-754 e Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102: 98-106).

## 15 KITS

Convenientemente, os quatro peptídeos MBP podem ser administrados juntos na forma de uma composição misturada ou coquetel. Entretanto, pode haver circunstâncias nas quais é preferível fornecer os peptídeos separadamente na forma de um kit, para a administração simultânea, separada, sequencial ou combinada.

Por exemplo, o kit pode compreender os quatro peptídeos em recipientes separados, ou dois recipientes, cada um compreendendo dois peptídeos. Os conteúdos dos

recipientes podem ou não ser combinados antes da administração.

O kit pode também compreender meios de mistura e/ou administração (por exemplo, um vaporizador para administração intranasal; ou uma seringa e agulha para a dosagem subcutânea/intradérmica). O kit pode também compreender instruções para uso.

A composição farmacêutica ou kit da invenção pode ser usado para tratar e/ou evitar uma doença.

Particularmente, a composição/kit pode ser usado para tratar e/ou prevenir esclerose múltipla e/ou neurite ótica.

ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla (ES) é o distúrbio neurológico mais comum dentre adultos jovens (20 a 40 anos de idade) afetando por volta de 385.000 pessoas na Europa e 300.000 nos Estados Unidos. É uma doença degenerativa crônica do sistema nervoso central na qual a destruição gradual da mielina ocorre em porções em todo o cérebro e/ou medula espinal, interferindo com a conectividade neural e causando fraqueza muscular, perda de coordenação e distúrbios de fala e visuais.

Depois de 10 anos, depois de metade dos indivíduos os quais são inicialmente diagnosticados com EM de reincidência-alívio (EMRA) descobriram que a frequência das

reincidências diminui, porém a inaptidão aumenta. Isto é conhecido como EM progressiva secundária (EMPS). Há a estimativa de que dentro de 25 anos, cerca de 90% das pessoas com EMRA irão progredir para o tipo secundário progressivo. Como com EMRA, EM Progressivo Secundário pode variar amplamente. Para alguns pacientes, o aumento ou progressão da inaptidão é muito gradual, e para outros ela pode ocorrer de maneira mais rápida. Em geral, entretanto, a recuperação dos ataques se torna cada vez menos completa, e sintomas tendem a aumentar e a inaptidão aumenta. Os ataques clínicos se tornam menos pronunciados e as reincidências tendem a desaparecer, porém mais tecido SNC foi agora destruído e o dano acumulado é mais evidente em MRIs.

15 A composição da invenção pode ser usada para tratar um paciente com início recente de EM, EMRA ou ESFS.

A composição da presente invenção pode reduzir ou melhorar um ou mais dos sintomas de EM, os quais incluem perda de visão ou visão reduzida, andar sem firmeza e andadura torta, pronúncia indistinta, frequência urinária e incontinência, alterações de humor e depressão. EMPS pode ser associado com espasmos musculares e paralisia severa.

Particularmente, a composição pode melhorar a neurite ótica.

## NEURITE ÓTICA

A neurite ótica (ON) é uma inflamação, acompanhada de desmielinização do nervo ótico que supre a retina ocular. É uma condição variável e pode se apresentar com qualquer um dos seguintes sintomas: visão embaçada, perda de acuidade visual, perda da visão de cores total ou parcial, cegueira completa ou parcial e dor atrás dos olhos.

A neurite ótica é um dos sintomas apresentados mais frequentes de esclerose múltipla e é o sintoma mais comum no início de MS. Entretanto, ON pode ser atribuída a causas diferentes de MS, como neuropatia ótica isquêmica.

ON se mostra unilateralmente (somente em um olho) em 70% dos casos.

Mais tipicamente, a Neurite Ótica primeiramente afeta pessoas com idade entre 15 e 50 anos de idade. Neste grupo de idade, estudos indicam que mais de 50% dos pacientes irão mudar para esclerose múltipla dentro de 15 anos. Como com MS, mulheres são cerca de duas vezes mais prováveis do que os homens de apresentar com ON e a prevalência em pessoas caucasianas é maior do que em outros grupos raciais.

Os principais sintomas da Neurite Ótica são:

- Perda de acuidade visual (visão embaçada).
- Dor ocular.



- Discromatopsia (visão colorida reduzida).
- Fosfenos de movimento e som (sensações de flash visual causadas por movimento do olho lateral ou som).
- Sintoma de Uhthoff, a piora dos sintomas com calor ou  
5 exaustão.

O tratamento de ON com uma composição e acordo com a invenção pode prevenir, reduzir ou melhorar qualquer um desses sintomas. Para monitorar a progressão de ON, a acuidade visual pode ser convenientemente medida usando uma  
10 tabela de Snellens.

#### EXEMPLOS

Os exemplos a seguir servem para ilustrar a presente invenção, mas não devem ser construídos como uma limitação desta. A invenção particularmente se refere às modalidades  
15 específicas descritas nesses exemplos.

Para os propósitos do Exemplos, os seguintes nomes podem ser usados para os peptídeos MBP:

Peptídeo MBP	Nome nos Exemplos (permutável)	
30-44	ATX-MS-01	Apítopo MS1
83-99	ATX-MS-07	Apítopo MS7
131-145	ATX-MS-04	Apítopo MS4
140-154	ATX-MS-06	Apítopo MS6

A composição de quatro peptídeos é chamada de ATX-MS-



1467.

Exemplo 1 - Identificação dos epítomos de célula T da  
proteína básica de mielina HLA-DQ6 restrito

Genes MHC de classe II conferem suscetibilidade à  
5 esclerose múltipla (Nepom e Ehrlich (1991) Ann. Rev.  
Immunol. 9: 493-525). Dentre os caucasianos na Europa  
Setentrional e Central, Austrália e América do Norte, a  
associação está ligada à molécula de MHC HLA-DR2 (DR2a  
[DRB5\*0101] e DR2b [DRB1\*1501]; Haines et al (1998) Human  
10 Mol. Genet. 7: 1229-1234). Embora os alelos DR2 e DQ6 de  
MHC sejam encontrados em diferentes locais, há um  
desequilíbrio de ligação significativo entre os dois  
alelos. A concordância entre os dois alelos é de 99%, muito  
maior do que o esperado se os alelos fossem aleatoriamente  
15 reassociados. Consequentemente, a surge a possibilidade de  
que certos epítomos de células T associados com MS podem  
ser HLA-DQ6 restritos ao invés de HLA-DR2 restritos.

O objetivo deste estudo foi identificar se os epítomos  
de células T MBP humanos são apresentados pela molécula  
20 HLA-DQ6 aos clones de células T isolados de pacientes MS  
HLA-DR2 positivos. A ativação de célula T foi medida por  
proliferação de célula T usando a incorporação de [<sup>3</sup>H]-  
timidina.

Antígenos de peptídeo

Peptídeos MBP 30-44, 130-144 e 139-153 foram sintetizados usando L-aminoácidos e química F-moc padrão em um sintetizador de peptídeo múltiplo Abimed AMS 422.

#### Células Apresentadoras de Antígeno

- 5       Células L transfectadas com qualquer um de HLA-DQ6, HLA-DR2a ou HLA-DR2b, ou células Mgar (EACC, Porton Down, UK) as quais expressam HLA-DQ, DP e DR foram usadas como APCs.

#### Clones de células T

- 10       Os clones de células T MS 49:D3 e MS 17:A2 foram gerado de pacientes com MS e o clone N5:19 foi gerado de um indivíduo normal. Todos os três clones foram isolados de indivíduos DR2 positivos.

#### Ensaio de apresentação de antígeno

- 15       Células apresentadoras de antígeno foram incubadas com as várias concentrações de peptídeo e de células T apropriadas. A proliferação, e então a ativação das células T foi medida pela incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, e expressa como o índice de estimulação (SI = contagens corrigidas por
- 20       minuto (ccpm) de peptídeo contendo cultura/ccpm de cultura sem peptídeo).

#### Resultados

Quando o peptídeo MBP 30-44 foi apresentado pelas células L transfectadas com HLA-DQ6, o clone de célula T MS

49:D3 forneceu uma resposta proliferativa muito forte (1,5  
vez maior do que a das células de controle Mar) na  
concentração peptídica mais alta (Figura 1). Quando MBP  
130-144 foi apresentado pelas células L transfectadas com  
5 HLA-DQ6 uma resposta ainda mais forte foi induzida em  
células T 17:A2 MS (aumento de 3,24 vezes na proliferação  
em comparação com as células de controle Mgar - Figura 2).

Um terceiro clone de célula T isolado de um N5:19  
individual DR2 respondeu ao epítipo principal MBP 140-154 e  
10 a uma série de peptídeos 15mer sobreponíveis se espalhando  
por essa região (138-156). O peptídeo 139-153 estimulou a  
proliferação do clone de célula T N5:19 quando apresentado  
por células L transfectadas HLA-DR2a, mas não com células L  
HLA-DR2b transfectadas (Figura 3).

## 15 Conclusão

Os clones de célula T isolados de indivíduos HLA-DR2  
positivos respondem aos epítopos de célula T MBP HLA-DQ6  
restritos. Isto implica no fato de que a associação de HLA-  
DR2 com esclerose múltipla não está confinada à restrição  
20 de DR2 dos epítopos de célula T MBP, mas também pode ser  
estrita a DQ6.

Na composição MBP da presente invenção, dois dos  
peptídeos se ligam a HLA-DQ6 (MBP 30-44 e 131-145) e dois  
se ligam a HLA-DR2 (MBP 140-154 e 83-99). Consequentemente,

a terapia com peptídeo com esses apítopos pode ser direcionada a indivíduos HLA-DR2 ou HLA-DQ6.

Exemplo 2 - Indução de tolerância com o apítopo MS6 em um camundongo transgênico HLA:DR2

5       Esse estudo foi projetado para demonstrar que um apítopo (Apítopo MS6), quando apresentado por uma molécula MHC classe II, pode induzir a tolerância imunológica em um modelo de camundongo humanizado de esclerose múltipla. O apítopo MS6 é um apítopo selecionado de epítomos de célula  
10   T de MBO correspondendo ao MBP 140-154, e é apresentado por MHC classe II em células apresentadoras de antígeno, e pode estimular as células T sem ser processado (ver WO 03/064464). O modelo de camundongo usado foi transgênico para a molécula MHC humana HLA:DR2 (DRB1\* 1501) (Madsen et  
15   al(1999) Nature Genetics 23:343-347).

A indução da anergia ou alterações na população de células T CD4+ em um camundongo depois da administração de um apítopo pode ser monitorada por uma redução na proliferação de célula T quando desafiada com o antígeno *in*  
20   vivo.

Síntese de peptídeo

O apítopo MS6 (peptídeo MBP 140-154) foi sintetizado usando L-aminoácidos e química F-moc padrão em um sintetizador de peptídeo múltiplo Abimed AMS 422.



### Camundongos e indução de tolerância

Camundongos transgênicos HLA:DR2 com idade entre 8 e 12 semanas foram usados no estudo. Os camundongos foram tolerizados pelo pré-tratamento com 100 µg do apítopo MS6 em 25 µL de salina tamponada com fosfato (PBS) 25 µL de PBS somente, por administração intranasal nos dias -8, -6 e -4 antes da imunização no dia 0.

Após a tolerização, os camundongos foram imunizados subcutaneamente com 100 µL de uma emulsão contendo um volume igual de Adjuvante de Freund Completo (CFA) e PBS contendo 200 µg do Apítopo MS6 e 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* morta por calor. Um grupo controle de camundongo, previamente tolerizado com PBS intranasalmente, foi imunizado sem peptídeo.

Aos 10 dias após a imunização subcutânea, a drenagem poplítica e os nódulos linfáticos inguinais foram removidos e a ativação da célula T foi avaliada pela avaliação da proliferação das células T em resposta a várias concentrações de Apítopo MS6. A proliferação foi medida pela incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, e expressa como o índice de estimulação (SI = contagens corrigidas por minuto (ccpm) de peptídeo contendo cultura/ccpm de cultura sem peptídeo).

### Resultados



Os camundongos de grupo A foram tolerizados com PBS e a seguir imunizados com o Apítopo MS6 responderam ao estímulo antigênico quando redesafiados com o Apítopo MS6 de modo dose-dependente (Figura 4). Com o aumento da concentração do peptídeo, o SI aumentou de um número médio de 2,5 para 10. Todos os camundongos nesse grupo demonstraram que PBS administrado intranasalmente não poderia induzir a tolerância ao Apítopo MS6.

Ao contrário, o pré-tratamento intranasal com o Apítopo MS6 teve um efeito profundo na resposta proliferativa dos linfócitos estimulada com este peptídeo. Os linfócitos dos camundongos do grupo B foram incapazes de responder a qualquer grau significativo, mesmo na alta concentração de peptídeo de 150 µg/mL (média de SI 3, Figura 4). Esses dados sugerem que o Apítopo MS6 induziu a tolerância nos linfócitos de camundongo HLA-DR2.

Os linfócitos extraídos de camundongos, os quais foram pré-tratados e imunizados com PBS (Grupo C) falharam em apresentar qualquer resposta ao Apítopo MS6 (Figura 4). Esta falta de resposta ao peptídeo no Grupo C confirma que a resposta proliferativa observada no Grupo A foi de fato uma resposta à imunização com o Apítopo MS6.

### Conclusão

Esses dados sustentam a hipótese de que um peptídeo

MBP (Apítopo MS6) que não requer processamento e se liga às moléculas MHC de classe II HLA:DR2 pode induzir a tolerância quando administrado intranasalmente.

5 Exemplo 3 - Indução da tolerância com Apítopo MS7 (MBP 83-99) em HLA:DR2 e receptor de célula T de camundongo duplo transgênico (MBP) 82-100

Este estudo investiga a capacidade do Apítopo MS7 (peptídeo 83-99 MBP) de induzir a tolerância em camundongos transgênicos duplos expressando HLA:DR2 juntamente com o receptor de célula T para a proteína básica de mielina HLA:DR2 ligada (MBP) ao peptídeo (MBP) 82-100.

Esplenócitos desses animais duplamente transgênicos se proliferam *in vivo* em resposta ao Apítopo MS7. A redução ou anulação da resposta do esplenócito *in vitro* a um apítopo após a sua administração repetida *in vivo* indica que um estado de tolerância foi alcançado.

A indução de tolerância foi obtida usando as vias tanto intranasal quanto subcutânea/intradérmica da administração do apítopo.

20 Indução de Tolerância

Os camundongos transgênicos duplos de sexo emparelhado dos grupos de idade 6 ou 7 (8 a 12 semanas) e foram usados. No primeiro experimento, um grupo foi tratado dez vezes intranasalmente com 100 µg de apítopo MS7 em 25 µL de PBS

em intervalos regulares por um período de três semanas. O grupo de controle recebeu somente PBS. No segundo experimento, a mesma quantidade de peptídeo foi dada por administração subcutânea/intradérmica em 100 µL de PBS. O grupo controle recebeu o mesmo volume de PBS.

#### Ensaio de proliferação

Três dias depois da última administração de peptídeo ou PBS, os baços foram coletados e as suspensões celulares preparadas. Os esplenócitos foram incubados com 0,5 a 5 µg/mL do ApotipoMS7, e avaliados para a proliferação por incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina depois de 48, 72 e 96 horas após do cultivo. Os resultados são expressos como índices de estimulação (SI = contagens por minuto (cpm) de cultura contendo antígeno/contagens por minuto sem antígeno).

#### 15 Medição de citocina

No segundo experimento, onde a indução de tolerância foi induzida através da via subcutânea/intradérmica, os sobrenadantes da cultura de células dos esplenócitos foram coletados em 48 e 72 h de cultura, e avaliados em relação à presença de IFN-γ e interleucina-2 (IL-2) usando um ensaio de imunossorvência ligado à enzima (ELISA).

#### Resultados

Em todos os três pontos de tempo investigados, os esplenócitos de camundongos tratados com PBS através das

vias tanto intranasal e subcutânea/intradérmica mostram a forte proliferação para o Apítopo MS7, a magnitude da resposta aumentando com a concentração do peptídeo. Uma forte redução na proliferação foi observada em cultuas de  
5 esplênócitos de camundongos tratados com Apítopo MS7 por ambas as vias de administração. Conforme mostrado na Figura 5, depois de 72 h, a SI média observada com culturas contendo 5 µg/mL de Apítopo MS7 foi 17 em camundongos tratados intranasalmente com o Apítopo MS7. Nas culturas  
10 correspondentes dos camundongos de controle tratados com PBS, um SI médio de 89 foi observado. Semelhantemente, conforme mostrado na Figura 6, a administração do Apítopo MS7 pela via subcutânea/intradérmica resultou em um decréscimo na SI média de 124 nos animais tratados com PBS  
15 para 49 em animais tratados com o Apítopo MS7.

Os níveis de IFN $\gamma$  e IL-2 detectados nos sobrenadantes da cultura de culturas de 48 h são mostrados na Figura 7. O tratamento repetido com o peptídeo *in vivo* é observado como uma redução impressionante na secreção de ambas as citocinas,  
20 assemelhando a redução na resposta proliferativa.

### Conclusão

Esses resultados indicam que a tolerância ao Apítopo MS7 pode ser induzida com sucesso em um modelo de camundongo manipulado para mimetizar o sistema humano e



sustentar o seu potencial para uso na terapia de esclerose múltipla. Além disso, a sua eficácia é retida quando administrada pela via subcutânea/intradérmica, a via de escolha para os seres humanos.

5       Embora a eficácia *in vivo* dos apítopos MS6 e MS7 tenha sido demonstrada, não é no momento possível demonstrar a eficácia dos apítopos MS1 e MS4. Isto ocorre devido à falta de camundongos transgênicos expressando a molécula HLA-DQ6. Os camundongos expressando a molécula foram criado, porém  
10       foi descoberto que eles falham ao gerar células T CD4 no timo e não armam, deste modo, uma resposta imune ao antígeno no contexto de HLA-DQ6.

Exemplo 4 - Estudo de aumento gradativo da dose com uma composição de quatro peptídeos MBP

15       A combinação dos quatro peptídeos MBP 30-44, 131-145, 140-154 e 83-99) foi usada em um estudo de aumento de dose gradativo de fase aberta de ATX-MS-1467 em pacientes com esclerose múltipla progressiva secundária.

Os pacientes foram monitorados em quatro semanas e  
20       três meses depois da dose de estudo final para a acuidade visual (isto é, redução na neurite ótica), parâmetros imunológicos e inflamação no SNC.

Exemplo 4A - Monitoramento da acuidade visual

A Neurite Ótica (ON) é uma inflamação, com a



desmielinização associada do Nervo Ótico que funciona com a retina do olho. ON é um dos sintomas mais frequentemente apresentados de esclerose múltipla, e é o sintoma mais comum no início da MS.

5 Os sintomas típicos de ON incluem: visão embaçada, perda de acuidade visual, perda de parte ou toda a visão colorida, cegueira completa ou parcial e dor atrás do olho.

O efeito do tratamento com ATX-MS-1467 na neurite ótica resultante do processo neuroinflamatório envolvido em MS foi investigado. ATX-MS-1467 foi administrado seguindo o protocolo de aumento gradual da dose esboçado acima, então um mês após o tratamento a acuidade visual do paciente foi testada usando uma tabela de Snellens padrão (Figura 8).

Os resultados mostram uma melhoria clinicamente significativa na acuidade visual um mês após o tratamento. Isto foi demonstrado na análise do exame de acuidade visual inicial na varredura em comparação com o teste de acompanhamento de um mês. As medições da visibilidade da varredura inicial de 6/24 e 6/9 (nos olhos direito e esquerdo, respectivamente) melhoraram para 6/9 (olho direito) e 6/6 (olho esquerdo) pós-tratamento. A visão do paciente tinha sido inalterada pelos últimos dois anos.

#### Exemplo 4B - Monitoramento dos Parâmetros Imunológicos

Conforme explicado acima, o efeito da terapia do

peptídeo com um coquetel contendo quatro peptídeos apítomos<sup>TM</sup> da proteína básica de mielina (ATX-MS-1467) foi investigado em pacientes com MS. Cada paciente foi examinado na admissão no teste, até 14 dias antes da primeira dose (visita 1). A primeira dose de 25 µg de ATX-MS-1467 foi administrada na visita 2, 50 µg na visita 3, 100 µg na visita 4, 400 µg na visita 5 e 800 µg em ambas as visitas 6 e 7. Outros exames foram efetuados nos acompanhamentos de um mês e de três meses (visitas 8 e 9).

A tabela a seguir resume o protocolo e mostra a quantidade de visitas ao clínico feitas por cada paciente juntamente com a dose de peptídeo e amostragem de sangue.

**TABELA 1**

NÚMERO DA VISITA	DOSE DE ATX-MS-1467 (µg)	COMENTÁRIOS
1	-	Visita pré-exame. 50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia
2	25	Nenhuma amostra coletada para a imunologia
3	50	50 mL de amostra

		de sangue coletado para imunologia
4	100	50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia
5	400	50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia
6	800	50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia
7	800	50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia
8	-	50 mL de amostra de sangue coletado para imunologia tomada quatro semanas após a visita 7

As amostras de sangue foram coletadas nas visitas 1 e nas visitas 3 a 9 e testadas para as respostas imunes a vários antígenos, incluindo derivado de proteína purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis*, como um controle

positivo, proteína básica de mielina humana purificada (MBP) e ATX-MS-1467. As respostas imunes a serem medidas incluem a proliferação de células T *in vitro*, a secreção de citocinas nos sobrenadantes de cultura tecidual e a geração  
5 do RNA de citocina.

### Resultados

Uma resposta significativa ao MBP foi observado, com um pico na proliferação na visita 3 (Figura 9). Esta foi correlacionada com um pico na secreção do interferon gama.  
10 De modo importante, entretanto, o nível de secreção de interferon gama caiu após a terceira visita e foi até um nível abaixo do fundo na época da visita 8. Os níveis de IL-10 não modificaram significativamente até a visita 7 em cujo ponto houve um aumento significativo na secreção desta  
15 citocina. Os níveis de IL-4, IL-5 e TNF-alfa foram próximos do fundo em resposta ao MBP em todos os pontos de tempo.

Nenhuma resposta proliferativa ou resposta à citocina aumentada foi observada para ATX-MS-1467 (Figura 10).

### Conclusão

20 A resposta à MBP foi observada na visita três, demonstrando uma secreção intensificada de IL-2 e de interferon gama, correlacionando-se com um pico na proliferação neste ponto de tempo. Este aumento na resposta é considerado como sendo atribuível à administração de

peptídeos.

Entretanto, de modo importante, o aumento temporário na secreção de citocina foi seguido por um retorno para os níveis da linha de base de interferon gama. Também houve um aumento significativo na secreção de IL-10, após a segunda administração de ATX-MS-1467 na dose mais elevada. Foi previamente reportado que, em modelos animais, a imunoterapia específica com os peptídeos sintéticos é eficaz e resulta na indução de células T regulatórias secretoras de IL-10. A indução das células T regulatórias secretoras de IL-10 em camundongos envolve uma resposta transiente aos peptídeos com a secreção do interferon gama em baixos níveis (Burkhart et al., 1999 Int`Immunol 11: 1625-1634; Sundstedt et al, 2003 J Immunol 170:1240-1248). Isto é acompanhado por um decréscimo no interferon gama e um aumento concomitante na IL-10. A cinética da secreção de citocina exibida após o tratamento com ATX-MS-1467 efetivamente reproduz o padrão previamente observado em camundongos experimentais, sugerindo que ATX-MS-1467 pode induzir as células T regulatórias secretoras de IL-10.

Exemplo 4C - Resposta à MBP é significativamente infrarregulada pelo tratamento com ATX-MS-1467

Seis pacientes com esclerose múltipla progressiva secundária (EMPS) foram admitidos e completaram um teste



clínico de fases I/IIa após o protocolo de aumento progressivo de dose dado no Exemplo 4B.

A genotipagem de HLA mostrou que os seis pacientes admitidos no teste representaram uma ampla faixa de  
5 haplótipos HLA, incluindo o MS associado com o haplótipo HLA-DR15. A ampla distribuição de HLA-DRB1 representada pelos pacientes admitidos neste teste implica que ATX-MS-1467 será seguro e bem tolerado em pacientes MS independentemente de seus genótipos HLA-DR.

10 O tratamento dos pacientes com ATX-MS-1467 não gerou anticorpos anti-peptídicos. Isto indica que o uso de ATX-MS-1467 é seguro e se correlaciona com a falta de complicações do sítio de injeção ou manifestações alérgicas associadas com o ensaio.

15 Uma análise completa das respostas das células T mostrou que:

a) O tratamento com ATX-MS-1467 não tinha um efeito imunossupressor não-específico. Isto é claramente mostrado pelo fato de que a resposta imune ao derivado da proteína  
20 purificada, um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* foi mantida (dados não mostrados).

b) Tratamento com ATX-MS-1467, usando este protocolo, não levou a uma resposta imune agressiva ou ao ATX-MS-1467 ou proteína básica de mielina (dados não mostrados).

c) Comparação da resposta proliferativa à célula T antes da (Visita 1) e após o tratamento (Visita 2) com ATX-MS-1467 revelou uma redução significativa na resposta à proteína básica de mielina (Figura 11). Todos os três indivíduos os quais responderam à MBP em V1 mostraram uma redução na resposta à proteína por V8. Tomando todas as patentes em conjunto, há evidências para uma redução significativa na resposta à MBP de V1 a V8 ( $P = 0,0313$ ).

### **Materiais e Métodos**

#### 10 **Formulações e Dosagens**

Cada um dos quatro peptídeos é produzido independentemente sob limitações usando a síntese de peptídeo em fase sólida, e purificado usando HPLC. Eles são armazenados liofilizados.

15 ATX-MS-1467 é uma mistura 1:1:1:1 de Apítos MS1, MS4, MS6 e MS7 em salina tamponada com fosfato para a administração intradérmica.

20 Duas forças de ATX-MS-1467, designadas ATX-MS-1467A e ATX-MS-1467B contendo 4 mg/mL e 0,5 mg/mL do peptídeo foram respectivamente preparados para permitir o aumento gradual de dose. O regime emprega cinco injeções de aumento de dose (25, 50, 100, 400 e 800 µg de dose total) dadas em um intervalo de 7 a 14 dias. Os pacientes então recebem uma segunda dose de 800 µg de 7 a 14 dias após a primeira dose

de 800 µg.

Depois de receber todas as seis doses da medicação de estudo, o paciente é avaliado em quatro semanas e em 3 meses depois da dose de estudo final.

## 5 Teste de Acuidade Visual

Uma tabela de Snellens de tamanho padrão para teste em 6 metros é usada, com iluminação por detrás e o paciente sentando a 6 metros de distância (Figura 8).

Cada olho é examinado separadamente para a linha mais baixa na tabela que o paciente é capaz de ler. Isto é então denotado como acuidade visual = 6/(a linha a qual o paciente foi lido).

## Imunoensaaios

### i) Proliferação de células T:

PBMC criopreservado é estabelecido em culturas de 1 mL contendo  $1,5 \times 10^6$  células em um  $\alpha$ -MEM em placas de cultivo de tecido de 48 poços (Nunc International, Costar, Corning Inc. Nova Iorque EUA). As respostas à MBP e antígenos de peptídeo em várias concentrações são monitoradas em um período de 10 dias. Os poços de controle não têm antígeno. Depois de 20 h ou 2, 4, 6, 8 e 10 dias de cultura, alíquotas de 100 µL duplicadas de suspensão de células são removidas de cada cultura de 1 mL para medir a proliferação em resposta ao antígeno pela captação de [ $^3$ H]timidina.

ii) Medição das citocinas secretadas (IL-2 e IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ):

Ensaio de Arranjo de Pérolas Citométrico:

Os níveis de citocina no sobrenadante da cultura são  
5 determinados usando o Ensaio de Pérola Citométrica (Becton  
Dickenson Biosciences, Cowley, Oxford, UK) seguindo as  
instruções do fabricante. Após a aquisição de dados da  
amostra usando FACS Calibur (BD Biosciences), os resultados  
são gerados na forma de gráfica e de tabela usando o  
10 software BD CBA. Os níveis quantificáveis mínimos de  
citocina são os seguintes: IL-2 e IL-4 2,6 pgml<sup>-1</sup>, IL-5 2,4  
pgml<sup>-1</sup>, IL-10 e TNF- $\alpha$  2,8 pgml<sup>-1</sup>, IFN- $\gamma$  7,1 pgml<sup>-1</sup>.

PCR em tempo real quantitativo para medir o RNA de  
citocinas (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ )

15 Para a análise de IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as  
reações de PCR são efetuadas um volume final de 20  $\mu$ L  
contendo DNAC, tampão de PCR, MgCl<sub>2</sub> 6,25 mM, dNTP 0,4 mM  
foram misturados, os iniciadores normal e reverso  
(concentrações de iniciador normal: IL-2 300 nM, IL-10 600  
20 nM, IFN- $\gamma$  600 nM, TNF- $\alpha$  600 nM, concentrações de iniciador  
reverso: IL-2 600 nM, IL-10 900 nM IFN- $\gamma$  900 nM, TNF- $\alpha$  600  
nM), 200 nM de sonda FAM-TAMRAe 0,05 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> de platina Taq-  
polimerase (Invitrogen). As condições de ciclicização são as  
seguintes: uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 30



s, seguido por 35 ciclos com 15 s a 94 °C e 1 min a 60 °C. Para a microglobulina  $\beta$ -2, a mistura de PCR descrita acima foi suplementada com os iniciadores normal e reverso a 0,1 uM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM e quantificada com SYBR Green 1 (Molecular Probes Inc., X30000 diluição do estoque). Após uma etapa de desnaturação de 1 min a 95 °C, a amplificação continua com 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 1 min a 61 °C e 1 min a 72 °C. As reações de PCR e detecção de fluorescência de amplicons gerada é efetuada em um sistema Optcon 2 (MJ Research, EUA). A fluorescência de linha de base é estabelecida tomando-se medições do ciclo 1 ao 10. Os valores de Ct são calculados pela determinação do ponto no qual a fluorescência excede 8 a 10 vezes o desvio padrão da linha de base. As amostras são analisadas em duplicata e o número de cópias é calculado a partir de uma curva padrão para cada DNA alvo. Diferenças no número de cópias de entrada de RNA e na síntese de DNAC são corrigidas pela normalização da expressão de citocina para a expressão de  $\beta$ -2 microglobulina.

#### 20 Tipagem de HLA

A análise da expressão gênica de HLA é efetuada por um polimorfismo conformacional de fita única padrão, técnica da reação em cadeia da polimerase em DNA extraído de leucócitos sanguíneo periféricos. O tipo de HLA de cada



paciente é usado para a interpretação dos resultados dos ensaios imunológicos.

#### Ensaios de Anticorpo Anti-peptídeo do Soro

Placas com 96 poços são revestidas com 1 a 10 µg/mL de cada epítipo MS1, MS4, MS6 ou MS7 em pH 9,6 de um dia para o outro a 4 °C. As placas são lavadas quatro vezes com salina tamponada com fosfato, pH 7,2, Tween 0,05% (PBS-Tween) e as placas são bloqueadas com FCS 5% em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Os soros são diluídos em 1:100 em PBS-Tween e incubados em poços em duplicata por uma hora em temperatura ambiente. Depois de 4 lavagens, conjugado de IgG anti-humana de cabra-peroxidase de rábano silvestre (Sigma) diluída 1:12000 em PBS é adicionado a cada poço e as placas incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Depois de 4 lavagens 0,4 mg/mL de dicloridrato de o-fenilenodiamina (Sigma) mais peróxido de hidrogênio a 30% é adicionado e incubado em temperatura ambiente por 15 - 20 min. O desenvolvimento de cor é interrompido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0 M (50 µL) e os valores de densidade ótica (ODs) medidos a 490 nm com um leitor de placa de ELISA. Os resultados são reportados como OD para soro diluído em 1:100.

#### Varredura MRI

A inflamação no SNC é investigada usando uma varredura de MRI intensificada por gadolínio. O volume e quantidade

das lesões aumentadas são examinados e comparados com a varredura de linha de base.

Várias modificações e variações dos métodos descritos e sistema da invenção serão evidentes para as pessoas versadas na técnica sem sair do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita juntamente com modalidades preferidas específicas, deve ser entendido que a invenção conforme reivindicada não deve ser indevidamente limitada a tais modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para efetuar a invenção, os quais são óbvios para as pessoas versadas em química ou biologia ou campos relacionados são tencionadas a serem englobadas pela presente invenção. Todas as publicações mencionadas no relatório descritivo acima são aqui incorporadas por referência.

### REIVINDICAÇÕES

1. Composição **caracterizada pelo** fato de consistir dos seguintes peptídeos de proteína básica de mielina:

MBP 30-44 conforme definido na SEQ ID NO: 1;

MBP 83-99 conforme definido na SEQ ID NO: 2;

MBP 131-145 conforme definido na SEQ ID NO: 3; e

MBP 140-154 conforme definido na SEQ ID NO: 4;

e um excipiente farmacologicamente aceitável.

2. Uso de uma composição como definida pela reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ser na produção de um medicamento para tratar esclerose múltipla.

3. Uso de uma composição como definida pela reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ser na produção de um medicamento para tratar neurite ótica.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizado pelo** fato de que o medicamento é para tratamento após um protocolo de aumento de dose gradual.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, **caracterizado pelo** fato de o medicamento é para o tratamento de um indivíduo HLA-DQ6 ou HLA-DR2 positivo.

6. Kit **caracterizado pelo** fato de consistir nos seguintes peptídeos de proteína básica de mielina:

MBP 30-44 conforme definido na SEQ ID NO: 1;

MBP 83-99 conforme definido na SEQ ID NO: 2;

MBP 131-145 conforme definido na SEQ ID NO: 3; e

MBP 140-154 conforme definido na SEQ ID NO: 4;

e um excipiente farmacologicamente aceitável para a administração simultânea, separada ou sequencial.

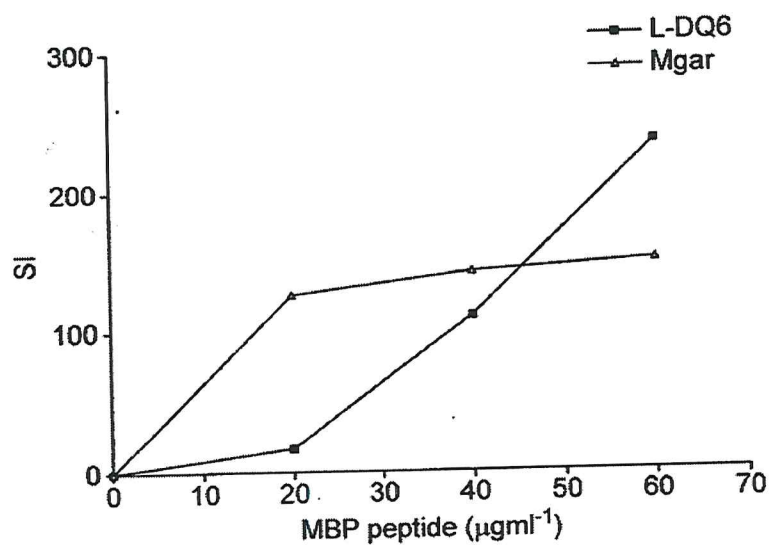


FIG. 1

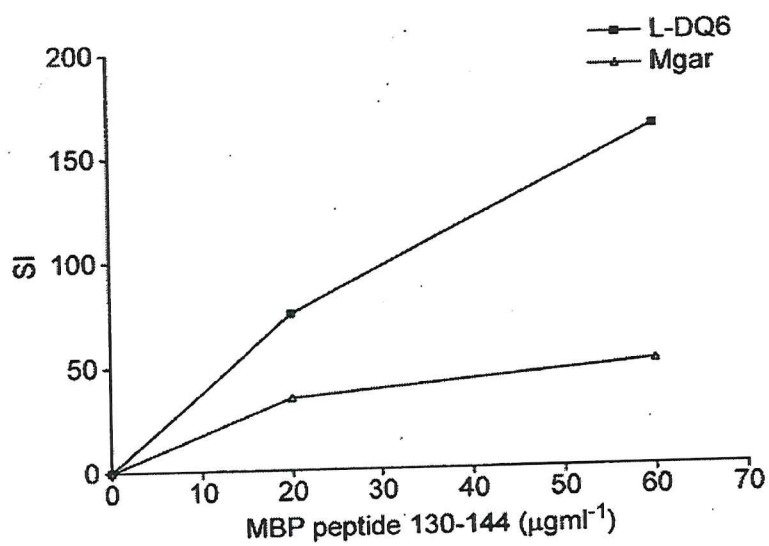


FIG. 2

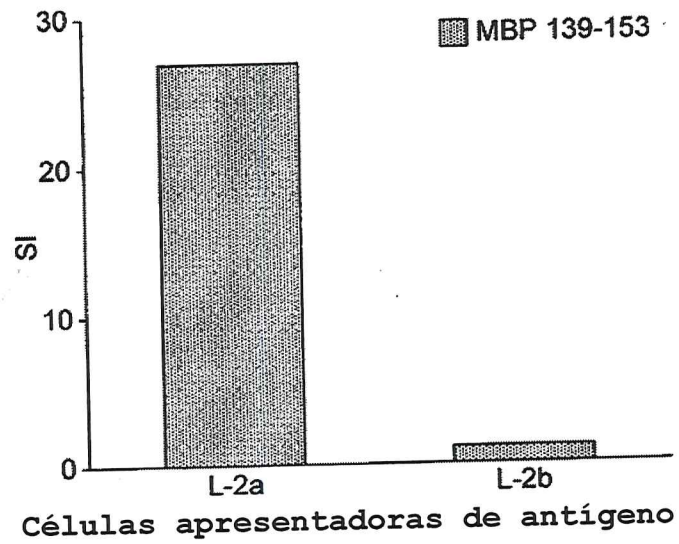


FIG. 3

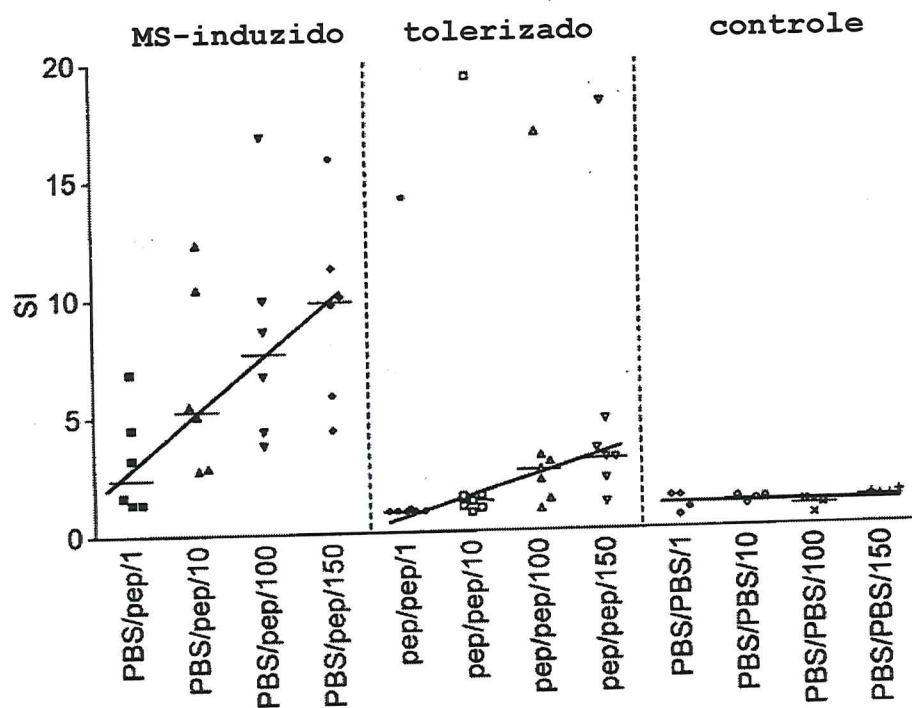


FIG. 4



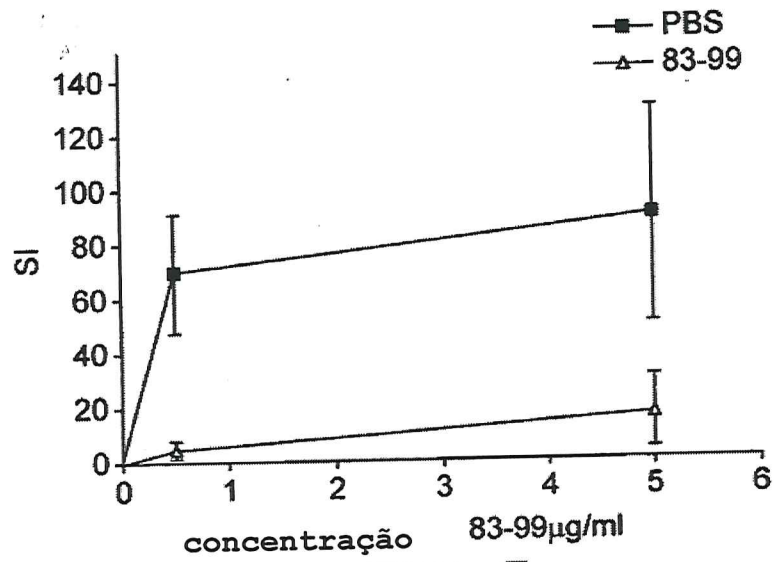


FIG. 5

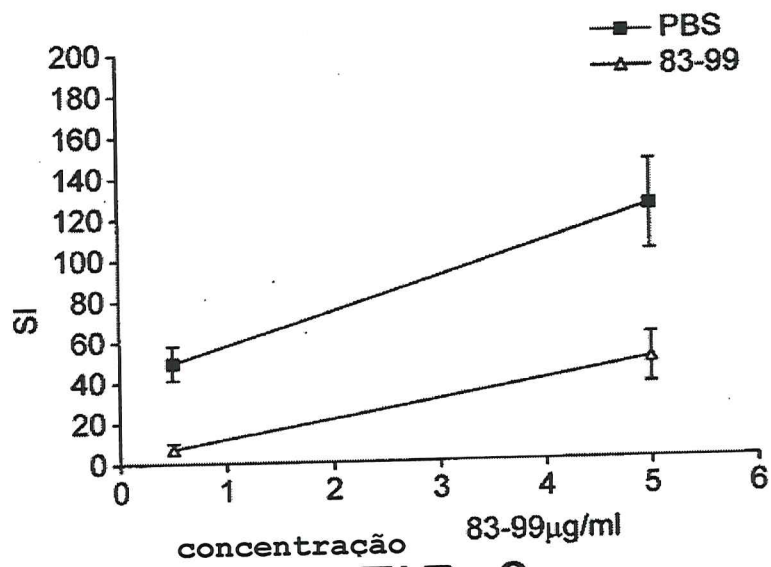


FIG. 6

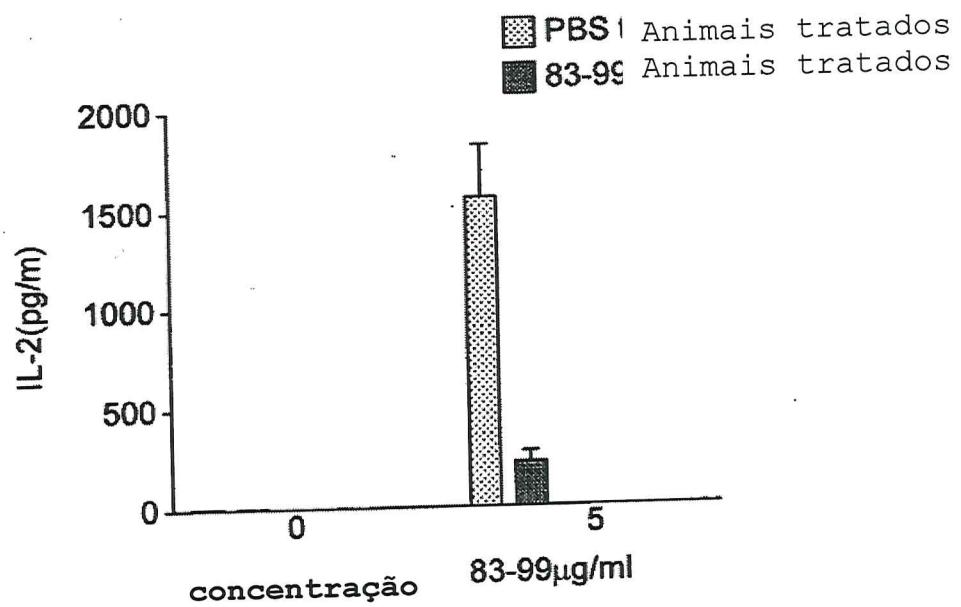
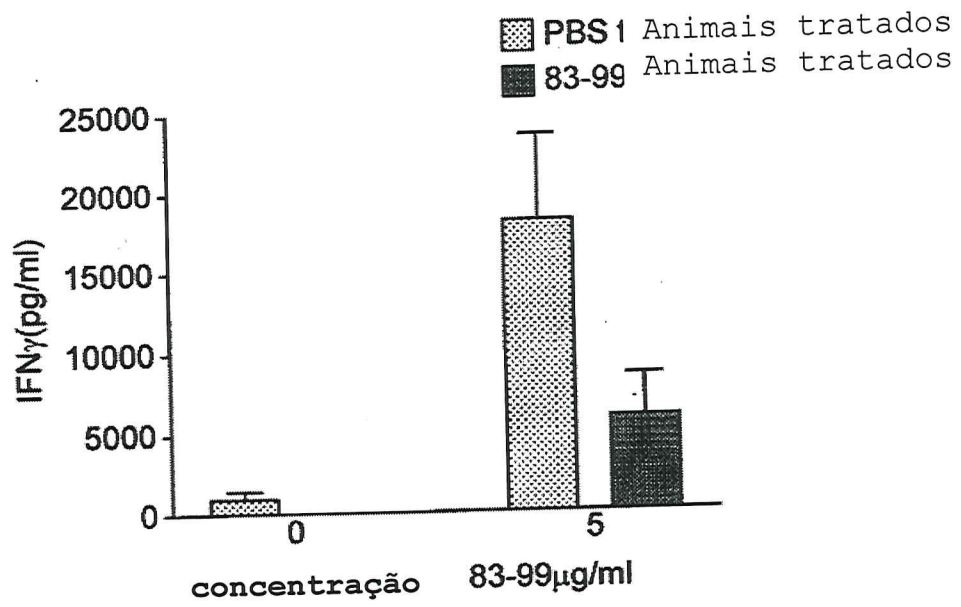


FIG. 7

A

36

D F

24

H Z P

18

T X U D

12

Z A D N H

9

P N T U H X

6

U A Z N F D T

5

N P H T A F X U

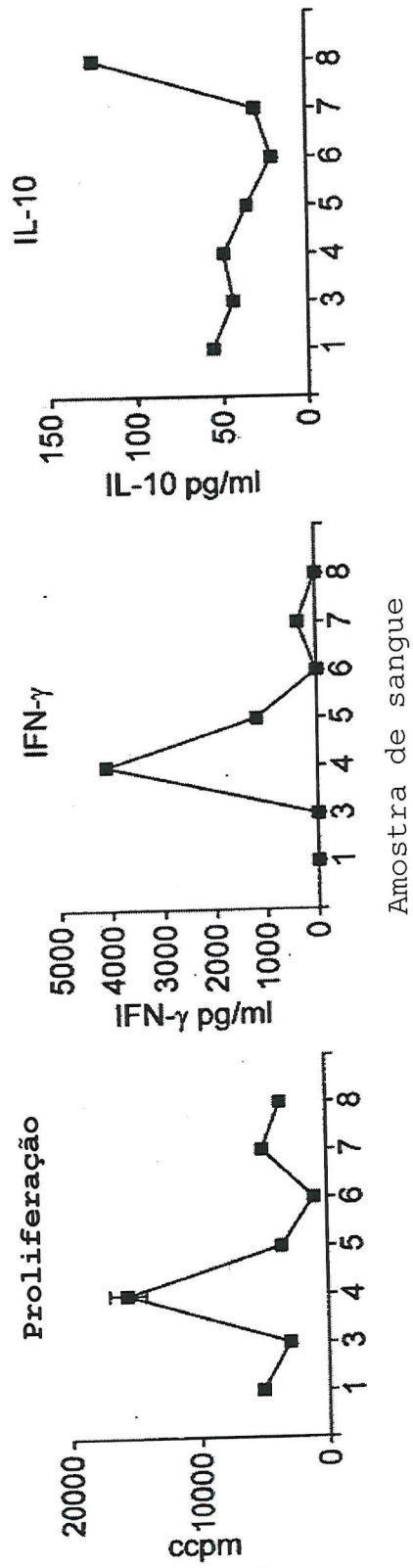
4

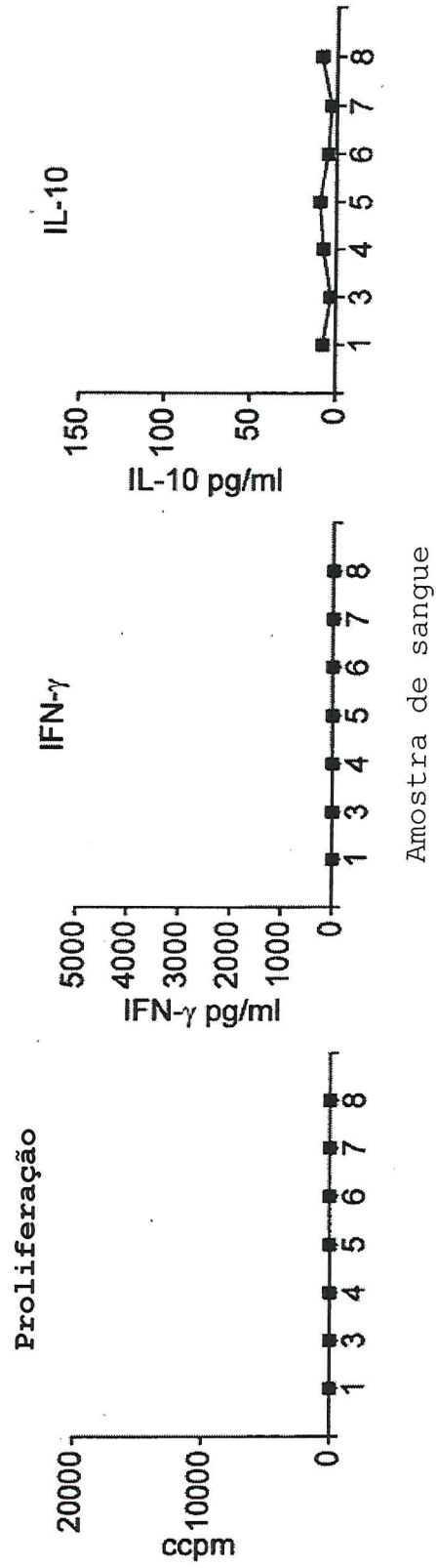
X D F H P T Z A N

3

F A X T D N H U P Z

FIG. 8

**FIG 9**

**FIG 10**



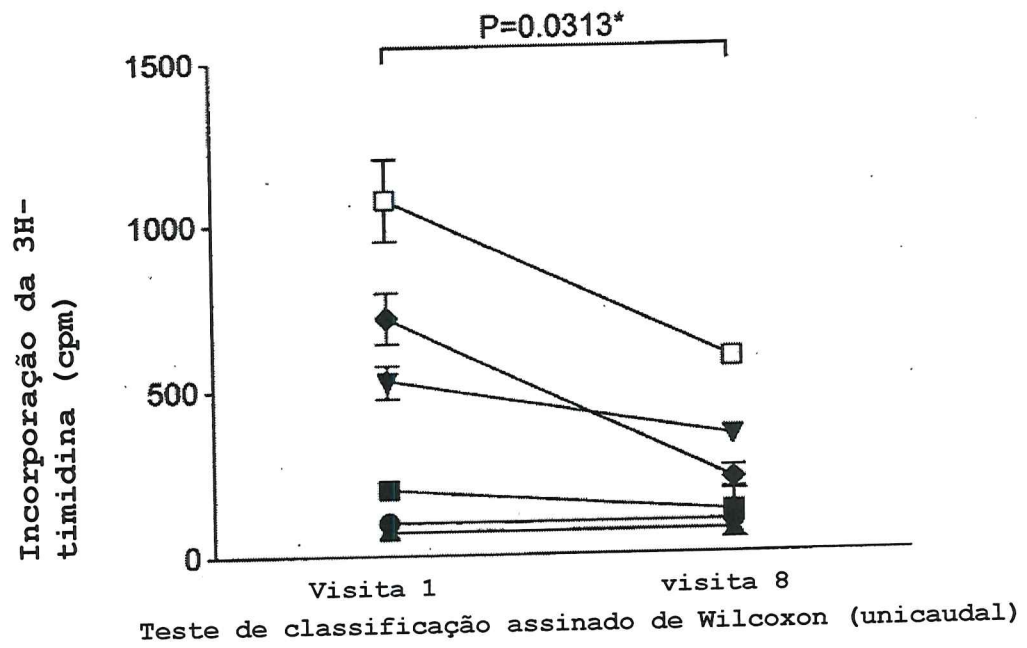


FIG. 11