

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 670**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/03** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2018** **PCT/IB2018/050062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018** **WO18127829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2018** **E 18701798 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3565570**

54 Título: **Composición**

30 Prioridad:

**04.01.2017 GB 201700095**

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

**30.10.2024**

73 Titular/es:

**WORG PHARMACEUTICALS (ZHEJIANG) CO., LTD. (100.0%)**  
**Room 215, Building 2 198 Bandaozhonglu Road**  
**Dipu Street Anji County**  
**Huzhou, Zhejiang, CN**

72 Inventor/es:

**MARTIN, KEITH y**  
**JANSSON, LISELOTTE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 984 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido o varios péptidos derivados de la proteína básica de mielina (MBP). La composición o el péptido puede ser útil en la prevención y/o inhibición de la autoinmunidad, por ejemplo, la prevención y/o inhibición de las células T auxiliares efectoras, que es útil en el tratamiento y/o la prevención de la uveítis. La invención también se refiere a los métodos correspondientes de tratamiento y los usos del péptido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la uveítis.

**10 Antecedentes de la invención**

La uveítis describe un grupo de enfermedades asociadas con la inflamación de la úvea. La úvea es una región del ojo localizada entre la esclerótica y la retina, e incluye el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. La úvea proporciona la mayor parte del suministro de sangre a la retina. Las enfermedades asociadas no se limitan a las que afectan directamente a la úvea, y las estructuras adyacentes tales como la retina, el nervio óptico, el cristalino, el vítreo y la esclerótica pueden verse afectadas en las manifestaciones de uveítis.

15 Todas las formas de uveítis se caracterizan por un infiltrado celular inflamatorio, normalmente visualizado mediante el uso de un biomicroscopio. En 2010, se estimó que 285 millones de personas tenían deterioro visual; de estas, 39 millones eran ciegas, y se realizó la aproximación de que el 10% de los casos se debían a uveítis. (Datos globales sobre deterioros visuales, Informe sobre la salud en el mundo, OMS (2010) <http://www.who.int/blindness/GLOBALDATAFINALforweb.pdf>)

Los tratamientos actuales para la uveítis incluyen el uso de esteroides glucocorticoides y otros agentes inmunosupresores amplios tales como metotrexato. Sin embargo, existe una necesidad en la técnica de tratamientos alternativos para la uveítis. La presente invención aborda esta necesidad.

25 Adamus et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006, 47, 2555-2561 describió el tratamiento de la uveítis anterior autoinmunitaria con ligandos de TCR recombinantes.

El documento WO 2009/056833 describe el uso de los péptidos MBP 30-44, 83-99, 131-145 y 140-154 para tratar pacientes con esclerosis múltiple secundaria mientras se monitorizan los efectos sobre la neuritis óptica asociada.

**Sumario de la invención**

30 Los presentes inventores han identificado varios péptidos derivados de la proteína básica de mielina (MBP) que pueden ser útiles en la prevención y/o el tratamiento de la uveítis.

Los presentes ejemplos demuestran que en un modelo *in vivo* de uveítis los péptidos MBP según la invención pueden reducir significativamente los signos clínicos de la uveítis.

Así, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido de la proteína básica de mielina seleccionado de los siguientes:

- 35 MBP 30-44 (SEQ ID N°: 1);  
MBP 83-99 (SEQ ID N°: 2);  
MBP 131-145 (SEQ ID N°: 3); y  
MBP 140-154 (SEQ ID N°: 4)

para el uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto.

40 En un aspecto, la composición para el uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto puede comprender MBP 30-44 (SEQ ID N°:1), 83-99 (SEQ ID N°:2), 131-145 (SEQ ID N°:3) y 140-154 (SEQ ID N°:4), es decir, la composición puede comprender un "cóctel" de los cuatro péptidos.

La composición para el uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto puede consistir esencialmente en MBP 30-44 (SEQ ID N°: 1), 83-99 (SEQ ID N°: 2), 131-145 (SEQ ID N°: 3) y 140-154 (SEQ ID N°: 4).

45 En la presente memoria se describe un método para tratar o prevenir la uveítis en un sujeto, en donde dicho método comprende la etapa de administración de una composición como se describe en la presente memoria al sujeto.

Se ha descubierto que los péptidos se unen a varias moléculas del MHC de clase II, que incluyen las moléculas HLA-DR y -DQ, y el uso combinado de estos apítosos proporciona una cobertura más amplia de los diferentes haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) observados en los pacientes con uveítis que la terapia con un único péptido.

- 5 El método de tratamiento o prevención puede implicar la administración de la composición, por ejemplo, a un sujeto positivo para HLA-DQ6 o HLA-DR2 o un sujeto que expresa cualquier otro tipo de HLA, por ejemplo, DRB1, DRB3, DRB5, DQA1 o DQB1.

En la presente memoria se describe el uso de la composición como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la uveítis en un sujeto.

- 10 La invención también abarca el uso de una composición como se describe en la presente memoria en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto.

La presente invención también proporciona un kit que comprende un péptido de la proteína básica de mielina seleccionado de los siguientes:

- MBP 30-44 (SEQ ID Nº: 1);
- 15 MBP 83-99 (SEQ ID Nº: 2);
- MBP 131-145 (SEQ ID Nº: 3); y
- MBP 140-154 (SEQ ID Nº: 4)

para el uso en el tratamiento de la prevención de la uveítis en un sujeto. En un aspecto, la composición comprende:

- MBP 30-44 (SEQ ID Nº: 1);
- 20 MBP 83-99 (SEQ ID Nº: 2);
- MBP 131-145 (SEQ ID Nº: 3); y
- MBP 140-154 (SEQ ID Nº: 4), en donde dichos péptidos de MBP pueden ser para la administración simultánea, por separado o secuencial.

### Lista de figuras

- 25 Figura 1: Puntuaciones clínicas de EAU (uveítis posterior). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM.
- Figura 2: Imágenes de TEFI representativas. (A) Puntuación 0. (B): Puntuación 1. (C) Puntuación 2, vasos inflamados. (D) Puntuación 3. (E) Puntuación 4. (F) Puntuación 5. (G) Puntuación 6.
- Figura 3: Puntuaciones clínicas de EAU (uveítis anterior). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Significaciones estadísticas: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .
- 30 Figura 4: Imágenes de TEFI representativas. Puntuaciones acumulativas de 1-10 debido a vasos sanguíneos agrandados, vascularización e infiltración aumentadas.
- Figura 5: Puntuaciones clínicas de EAU (uveítis posterior), grupos inmunizados con huMBP e IRBP. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM.
- Figura 6: Puntuaciones clínicas de EAU (uveítis posterior), área bajo la curva (AUC). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Significación estadística: \*\*\* $p < 0,001$ .
- 35 Figura 7: Puntuaciones clínicas de uveítis anterior (A.) y análisis del área bajo la curva (AUC) de las puntuaciones clínicas de uveítis anterior (B.) en el modelo de huMBP + IRBP. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Significación estadística: \*,  $p < 0,05$  y \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  para ciclosporina A frente al vehículo; #,  $p < 0,05$  y ####,  $p < 0,0001$  para los péptidos ATX frente al vehículo. Las marcas en negrita en el eje x representan los tratamientos con los péptidos ATX después del día 0. El área sombreada en gris representa el curso temporal del tratamiento con ciclosporina A.
- 40 Figura 8: Puntuaciones clínicas de uveítis posterior (A.) y análisis del área bajo la curva (AUC) de las puntuaciones clínicas de uveítis posterior (B.) en el modelo de huMBP. Puntuaciones clínicas de uveítis posterior (C.) y análisis del AUC de las puntuaciones clínicas de uveítis posterior (D.) en el modelo de huMBP + IRBP. Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  y \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  para ciclosporina A frente al vehículo; #,  $p < 0,05$ , ##,  $p < 0,01$  y ####,  $p < 0,0001$  para los péptidos ATX frente al vehículo. Las marcas en negrita en el eje x representan los tratamientos con los péptidos ATX después del día 0. El área sombreada en gris representa el curso temporal del tratamiento con ciclosporina A.
- 45

Figura 9: Inicio de la uveítis posterior (%) en los modelos de huMBP (A.) y de huMBP + IRBP (B.). Significación estadística: \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  para ciclosporina A frente al vehículo; #,  $p < 0,05$  para los péptidos ATX frente al vehículo. Las marcas en negrita en el eje x representan los tratamientos con los péptidos ATX después del día 0. El área sombreada en gris representa el curso temporal del tratamiento con ciclosporina A.

## 5 Descripción detallada

Proteína básica de mielina

La proteína básica de mielina (MBP) es una proteína aislable de la materia blanca del cerebro humano. La proteína madura tiene 170 aminoácidos y la secuencia está ampliamente disponible en la bibliografía (véase, por ejemplo: Chou et al. (1986) J. Neurochem. 46:47-53, Figura 1; Kamholz et al. (1986), PNAS 83:4962-4966, Figura 2; patente de EE. UU. nº 5.817.629, SEQ ID Nº: 1; Roth et al. (1987), J. Neurosci. 17: 321-328, Figura 4; Medevetzky et al. (2006), FEBS Letters 580:545-552, Figura 3B). Pueden producirse variantes/isoformas de corte y empalme alternativas de MBP debido al corte y empalme alternativo de MBP (véase, por ejemplo, Kamholz, anteriormente mencionado).

La composición para el uso según la presente invención comprende un péptido MBP seleccionado de:

- MBP 30-44 (SEQ ID Nº: 1);
- 15 MBP 83-99 (SEQ ID Nº: 2);
- MBP 131-145 (SEQ ID Nº: 3); y
- MBP 140-154 (SEQ ID Nº: 4).

La composición puede comprender MBP 30-44 (SEQ ID Nº:1), 83-99 (SEQ ID Nº:2), 131-145 (SEQ ID Nº:3) y 140-154 (SEQ ID Nº:4).

20 La composición puede consistir esencialmente en MBP 30-44 (SEQ ID Nº:1), 83-99 (SEQ ID Nº:2), 131-145 (SEQ ID Nº:3) y 140-154 (SEQ ID Nº:4).

Los péptidos presentes en la composición pueden consistir en MBP 30-44 (SEQ ID Nº:1), 83-99 (SEQ ID Nº:2), 131-145 (SEQ ID Nº:3) y 140-154 (SEQ ID Nº:4). Es decir, no están presentes otros péptidos de MBP. Los péptidos de MBP pueden consistir, por tanto, en las SEQ ID Nºs: 1 a 4.

25 "Que consiste en" significa que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. "Que consiste esencialmente en" significa que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren o que contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y

30 pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Péptidos

Los péptidos que pueden usarse en las composiciones y los kits para el uso según la presente invención son los siguientes:

- 35 MBP 30-44 (SEQ ID Nº: 1):  
H-Pro-Arg-His-Arg-Asp-Thr-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Ile-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>
- MBP 83-99 (SEQ ID Nº: 2):  
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 (SEQ ID Nº: 3):
- 40 H-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser-Ala-His-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-NH<sub>2</sub>
- MBP 140-154 (SEQ ID Nº 4):  
H-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-Ala-Gln-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys-Ile-Phe-NH<sub>2</sub>

El término "péptido" se usa en el sentido normal para significar una serie de residuos, típicamente L-aminoácidos, conectados entre sí, típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos  $\alpha$ -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye los péptidos modificados y los análogos de péptidos sintéticos.

45

El péptido de la presente invención puede prepararse mediante el uso de métodos químicos (Peptide Chemistry, A Practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante técnicas en fase sólida (Roberge JY et al. (1995) Science 269: 202-204), escindirlos de la resina, y purificarlos mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nueva York, NY). La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso del sintetizador de péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido puede prepararse alternativamente por medios recombinantes, o mediante escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido puede obtenerse mediante escisión de la proteína básica de mielina, que puede ir seguida de la modificación de uno o ambos extremos. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

Para fines prácticos, existen otras diversas características que puede mostrar el péptido. Por ejemplo, es importante que el péptido sea suficientemente estable *in vivo* para ser terapéuticamente útil. La vida media del péptido *in vivo* puede ser de al menos 10 minutos, 30 minutos, 4 horas o 24 horas.

El péptido también puede demostrar una buena biodisponibilidad *in vivo*. El péptido puede mantener una conformación *in vivo*, lo que permite unirse a una molécula del MHC en la superficie celular sin impedimentos.

En un aspecto, la composición puede comprender un péptido de MBP que tiene al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID N°s: 1 a 4. En un aspecto preferido, el péptido tiene al menos un 80%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID N°s: 1 a 4.

La identidad de secuencia puede evaluarse mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad entre secuencias, son útiles los programas informáticos que realizan múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo, Clustal W (Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680). Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como 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) y BLAST con huecos (Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402) también son útiles para este propósito. Además, el servidor Dali del Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineamientos basados en la estructura de secuencias de proteínas (Holm (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38; Holm (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480; Holm (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9).

Pueden determinarse múltiples alineamientos de secuencias y cálculos del porcentaje de identidad mediante el uso de los parámetros de BLAST convencionales (usando secuencias de todos los organismos disponibles, matriz Blosum 62, costes por hueco: existencia 11, extensión 1).

Alternativamente, se pueden usar el siguiente programa y parámetros: Programa: Align Plus 4, versión 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Comparación de ADN: Comparación global, matriz de puntuación lineal estándar, penalización por emparejamiento incorrecto = 2, penalización por hueco abierto = 4, penalización por hueco extendido = 1. Comparación de aminoácidos: Comparación global, matriz de puntuación BLOSUM 62.

Por tanto, en el alcance de la invención se incluyen las variantes de las secuencias indicadas o dadas, siempre que la variante conserve la actividad funcional del precursor, es decir, las variantes son funcionalmente equivalentes, en otras palabras, tienen o exhiben una actividad del péptido precursor como se define en la presente memoria. Tales variantes pueden comprender sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (que incluyen truncamientos en uno o ambos extremos) de la secuencia precursora, por ejemplo, de uno o más, por ejemplo, de 1 a 14 aminoácidos.

Una sustitución puede ser una sustitución conservativa. Como se usa en la presente memoria, una "sustitución conservativa" se refiere a cambiar la identidad del aminoácido en una posición dada para reemplazarlo con un aminoácido de un tamaño, carga y/o polaridad aproximadamente equivalentes. Los ejemplos de sustituciones conservativas naturales de aminoácidos incluyen los siguientes 8 grupos de sustituciones (designados mediante el código convencional de una letra): (1) M, I, L, V; (2) F, Y, W; (3) K, R; (4) A, G; (5) S, T; (6) Q, N; (7) E, D; y (8) C, S.

También se incluyen derivados funcionalmente equivalentes, en donde uno o más de los aminoácidos se derivatizan químicamente, por ejemplo, se sustituyen con un grupo químico.

Los péptidos para el uso según la invención pueden comprender porciones o fragmentos de las SEQ ID N°s 1 a 4, siempre que el péptido retenga la actividad requerida. Las porciones o fragmentos de las SEQ ID N°s: 1 a 4 pueden tener, por ejemplo, una longitud de 6 a 16 residuos, por ejemplo, una longitud de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 residuos.

Los péptidos para el uso según la invención pueden estar comprendidos dentro de un péptido más largo, es decir, un péptido que comprende cualquiera de las SEQ ID N°s: 1-4. Los péptidos para el uso según la presente invención pueden comprender, por tanto, entre 8 y 30 aminoácidos, por ejemplo, de 8 a 25 aminoácidos, de 8 a 20 aminoácidos, de 8 a 15 aminoácidos o de 8 a 12 aminoácidos. En un aspecto, el péptido de la presente invención puede tener, por

tanto, una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos.

Una composición peptídica para el uso según la invención puede comprender las secuencias de aminoácidos según la invención como se describe en la presente memoria. En un aspecto, la composición peptídica comprende solo las secuencias de aminoácidos según la invención como se describe en la presente memoria, es decir, no comprende péptidos adicionales distintos de los que son según la invención.

Los péptidos pueden formularse en la composición como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina y procaína.

#### Apítopos

En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T son capaces de reconocer epítomos internos de un antígeno proteico. Las APC captan los antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a un complejo principal de histocompatibilidad (MHC de clase II) dentro de la célula y ser llevado a la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular junto con una molécula del MHC, el péptido puede ser reconocido por una célula T (a través del receptor de células T (TCR), en cuyo caso el péptido es un epítomo de células T.

Un epítomo es, por tanto, un péptido derivable de un antígeno que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula del MHC y de ser reconocido por una célula T.

El epítomo mínimo es el fragmento más corto derivable de un epítomo, que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula del MHC de clase I o II y de ser reconocido por una célula T. Para una región inmunogénica dada, es típicamente posible generar un conjunto anidado de péptidos solapantes que actúan como epítomos, todos los cuales contienen el epítomo mínimo pero difieren en sus regiones flanqueantes.

Del mismo modo, es posible identificar el epítomo mínimo para una combinación particular de molécula del MHC:célula T midiendo la respuesta a los péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta al péptido que comprende los residuos 1-15 en la biblioteca solapante, pueden usarse conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir, 1-14, 1-13, 1-12, etc. y 2-15, 3-15, 4-15, etc.) para identificar el epítomo mínimo.

Los presentes inventores han determinado previamente que existe una relación entre la capacidad de un péptido de unirse a una molécula del MHC y ser presentado a una célula T sin procesamiento adicional, y la capacidad del péptido de inducir tolerancia inmunitaria específica del antígeno *in vivo* (documento WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse al surco de unión a péptidos de una molécula del MHC sin procesamiento adicional (por ejemplo, recorte), o se une en una conformación inapropiada, entonces no será tolerogénico *in vivo*. Si, por otra parte, el péptido es de un tamaño y conformación apropiados para unirse directamente al surco de unión a péptidos del MHC y ser presentado a una célula T, entonces se puede predecir que este péptido es útil para la inducción de tolerancia.

Por tanto, es posible investigar la capacidad tolerogénica de un péptido investigando si puede unirse a una molécula del MHC y ser presentado a una célula T sin procesamiento adicional del antígeno *in vitro*.

Los apítomos de MBP (epítomos independientes del procesamiento de antígenos) son capaces de unirse a una molécula del MHC y estimular una respuesta de células T específicas de MBP sin procesamiento adicional del antígeno. Se puede predecir que dichos apítomos causan tolerancia hacia MBP, siguiendo el método basado en reglas descrito en el documento WO 02/16410.

Los péptidos que se unen a las moléculas del MHC de clase I tienen típicamente una longitud de 7 a 13, más habitualmente de 8 a 10 aminoácidos. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y sitios invariables en el surco de unión a péptidos de todas las moléculas del MHC de clase I. Existen sitios invariables en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino y carboxilo del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan mediante un retorcimiento de la cadena principal del péptido, a menudo en residuos de prolina o glicina que permiten la flexibilidad.

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

En una realización preferida, el péptido derivado de MBP es capaz de unirse a una molécula del MHC de clase II sin procesamiento adicional.

## Porción

El péptido de la presente invención puede comprender la totalidad o una porción de los péptidos derivados de MBP mostrados como SEQ ID N°s: 1 a 4.

- 5 El término "porción" se refiere a un péptido que deriva de las SEQ ID N°s: 1 a 4 y contiene al menos un epítipo mínimo, es decir, el péptido es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula del MHC de clase I o II, y es reconocido por una célula T e induce tolerancia.

## Uveítis

Clínicamente, la uveítis se clasifica comúnmente como una de las siguientes, basándose en la parte del ojo que se ve afectada principalmente: uveítis anterior, uveítis intermedia, uveítis posterior o uveítis panuveítis.

- 10 La uveítis anterior incluye la iridociclitis e iritis. La iritis es la inflamación de la cámara anterior y el iris, mientras que la iridociclitis incluye la inflamación en el cuerpo ciliar.

- 15 La uveítis intermedia (pars planitis) comúnmente se refiere a la vitritis (inflamación de células en la cavidad vítrea, asociada con la deposición de material inflamatorio en la pars plana). Un cuerpo vítreo inflamado, o una hemorragia o una precipitación de proteínas causada por la inflamación, se caracteriza como uveítis intermedia. En estos experimentos, los síntomas intermedios de uveítis se incorporan en la puntuación usando las imágenes de TEFI. Como se muestra en el Ejemplo 3, la puntuación 4 (x2) que constituye un total de 8 está causada por la turbidez. En la Figura 4, la imagen de TEFI para la puntuación más alta refleja una uveítis intermedia. En un aspecto de la invención, la uveítis es uveítis intermedia.

La uveítis posterior (coriorretinitis) es la inflamación de las regiones de la retina y el coroides.

- 20 La panuveítis uveítis es un término general que se refiere a la inflamación que afecta a todas las capas de la úvea.

En un aspecto, la uveítis es uveítis idiopática.

En una realización preferida de la presente invención, la uveítis es uveítis posterior. En otro aspecto de la invención, la uveítis es uveítis anterior. En otro aspecto de la invención, la uveítis es uveítis intermedia.

- 25 La uveítis también puede clasificarse como infecciosa o no infecciosa, siendo más común la uveítis relacionada con las enfermedades autoinmunitarias (es decir, principalmente no infecciosa) en los países desarrollados. Los modelos animales comunes usados para estudiar la uveítis también están controlados por la autoinmunidad, mostrando una asociación clara entre los dos. Se predice que el 25-30% de las uveítis están asociadas con enfermedades autoinmunitarias o autoinflamatorias sistémicas.

- 30 La uveítis según la presente invención descrita en la presente memoria es preferiblemente una uveítis no infecciosa, incluso más preferiblemente una uveítis autoinmunitaria.

## Tolerancia

- 35 Los epítopos de células T desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria adaptativa a cualquier antígeno, ya sea propio o extraño. El papel crucial desempeñado por los epítopos de células T en las enfermedades por hipersensibilidad (que incluyen la alergia, las enfermedades autoinmunitarias y el rechazo de trasplantes) se ha demostrado mediante el uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante la inyección del autoantígeno o péptidos sintéticos (basados en la estructura de los epítopos de células T) en combinación con un adyuvante.

- 40 Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir la tolerancia inmunogénica hacia antígenos particulares mediante la administración de epítopos peptídicos en forma soluble. Se ha demostrado que la administración de péptidos solubles es un medio eficaz de inhibición de la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE, un modelo de esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) Int. Immunol. 5: 1159-1165; Liu y Wraith (1995) Int. Immunol. 7: 1255-1263; Anderton y Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveorretinitis (revisados en Anderton y Wraith (1998), mencionados anteriormente). También se ha demostrado que es un medio para tratar una enfermedad en curso en la EAE (Anderton y Wraith (1998), mencionados anteriormente).

- 45 La tolerancia es el fracaso en la respuesta a un antígeno. La tolerancia a los autoantígenos es una característica esencial del sistema inmunitario, y cuando se pierde puede producirse una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad de responder a una enorme variedad de agentes infecciosos evitando al mismo tiempo el ataque autoinmunitario a los autoantígenos contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los autoantígenos se detectan en el timo, por lo que la muerte de los timocitos autorreactivos sigue siendo incompleta. Por tanto, también existen mecanismos mediante los cuales puede adquirirse tolerancia mediante los linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica).

Se proporciona una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica en Anderton et al. (1999) Immunological Reviews 169: 123-137.

Los datos disponibles sugieren que la uveítis puede resultar de las células T reactivas generadas a partir de las proteínas retinianas, lo que conduce a la inflamación y refleja el efecto de una infección crónica. La composición según la presente invención es capaz de inducir tolerancia hacia autoantígenos tales como MBP, de manera que cuando se administra a un sujeto puede restablecer la tolerancia a la proteína MBP y limitar la respuesta inmunitaria patógena.

#### Composición

La composición según la presente invención puede ser para uso profiláctico o terapéutico en pacientes con uveítis.

Cuando se administra para uso profiláctico, la composición puede reducir o prevenir la generación de una respuesta inmunitaria hacia MBP. El nivel de respuesta inmunitaria es menor que el que se obtendría si el paciente no se hubiera tratado con la composición. El término "reducir" indica que se observa una reducción parcial en la respuesta inmunitaria, tal como una reducción del 50%, 70%, 80% o 90% en la respuesta que se habría observado si el paciente no se hubiera tratado con la composición (o en la respuesta observada en un paciente no tratado durante el mismo periodo de tiempo). El término "prevenir" indica que no se observa ninguna respuesta inmunitaria apreciable hacia MBP.

Cuando se administra para uso terapéutico, la composición puede inhibir una respuesta inmunitaria existente hacia MBP. El término "suprimir" indica una reducción en el nivel de una respuesta inmunitaria existente, en comparación con el nivel antes del tratamiento con los péptidos, o los niveles que se habrían observado en el mismo momento si no se hubiera administrado el tratamiento.

El tratamiento con la composición según la presente invención puede causar una reducción del nivel de cualquiera o todos los siguientes:

- i) Autoanticuerpos hacia MBP
- ii) Células T CD4+ proinflamatorias específicas de MBP
- iii) Células B que secretan autoanticuerpos hacia MBP.

La detección de todos los factores puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, citometría de flujo, etc.

El tratamiento con la composición de la presente invención puede también o alternativamente causar anergia en las células T CD4+ específicas de MBP. La anergia puede detectarse mediante, por ejemplo, una exposición posterior a MBP *in vitro*. El tratamiento con la composición de la presente invención puede provocar la generación de células T reguladoras específicas del antígeno, por ejemplo, caracterizadas por los factores de transcripción c-Maf y NFIL3, y las moléculas coestimuladoras negativas LAG-3, TIGIT, PD-1 y TIM-3 (véase Burton et al. Nature Communications (2014), número de artículo 4741).

#### Formulación

La composición según la invención tal como se describe en la presente memoria puede prepararse en forma de un inyectable, ya sea en disolución líquida o suspensión; también puede prepararse una forma sólida adecuada para la disolución o la suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o los péptidos pueden encapsularse en liposomas. El péptido puede encapsularse alternativamente en un portador o unirse a la superficie de un portador, por ejemplo, una nanopartícula. Los ingredientes activos pueden mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol o similares, y las combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes tamponadores del pH. Las sales tamponadoras incluyen fosfato, citrato, acetato. Se puede usar ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico para el ajuste del pH. Para la estabilización, se pueden usar disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

Después de la formulación, la composición puede incorporarse en un recipiente estéril que luego se sella y almacena a baja temperatura, por ejemplo 4 °C, o puede liofilizarse.

Convenientemente, la composición se prepara en forma de un polvo liofilizado. La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada. Los procedimientos de liofilización son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Se usan con frecuencia agentes de carga antes de la liofilización, tales como manitol, dextrano o glicina.



La composición puede administrarse de una manera conveniente, tal como por vía oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o en supositorios, o mediante implantación (por ejemplo, mediante el uso de moléculas o dispositivos de liberación lenta).

5 La composición puede administrarse ventajosamente por vía intranasal, subcutánea o intradérmica. En una realización preferida, la administración es intradérmica.

La composición farmacéutica para el uso según la invención puede usarse para tratar a un sujeto humano. Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular.

10 La composición tal como se describe en la presente memoria se administra típicamente en una "cantidad eficaz"; es decir, una cantidad eficaz para provocar uno cualquiera o más, entre otros, de un efecto terapéutico o profiláctico. Los expertos en la técnica podrían determinar, mediante experimentación rutinaria, una cantidad eficaz y atóxica que se incluirá en una composición farmacéutica o que se administrará para obtener el resultado deseado. En general, la composición tal como se describe en la presente memoria se puede administrar de una manera compatible con la vía de administración y las características físicas del receptor (que incluyen el estado de salud) y de tal manera que  
15 provoque el/los efecto(s) deseado(s) (es decir, es terapéuticamente eficaz y/o protectora). Por ejemplo, la dosificación apropiada de una composición puede depender de una variedad de factores que incluyen, pero sin limitación, las características físicas de un sujeto (por ejemplo, la edad, el peso, el sexo) y otros factores que los expertos en la técnica pueden reconocer. Otros ejemplos ilustrativos de las consideraciones generales que pueden tenerse en cuenta cuando se determina, por ejemplo, una dosificación apropiada de las composiciones se analizan en Gennaro (2000,  
20 "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; y Gilman et al., (Eds), (1990), Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press).

Se espera que la cantidad se halle en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de métodos conocidos por los expertos en la técnica, teniendo en cuenta algunas de las consideraciones descritas anteriormente.

25 El péptido y la composición de la invención pueden usarse para tratar a un sujeto humano. El sujeto según la invención tiene preferiblemente uveítis posterior. El sujeto puede tener células T específicas de MBP.

En una realización preferida, puede seguirse un protocolo de "aumento de la dosis", en donde se administra una pluralidad de dosis al paciente en concentraciones ascendentes. Dicho enfoque se ha usado, por ejemplo, para los péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de abeja (Müller et al. (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 y Akdis et al. (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

30 Kit

Los péptidos derivados de MBP pueden administrarse juntos, en forma de una composición o cóctel mixto. Sin embargo, puede haber circunstancias en donde sea preferible proporcionar los péptidos por separado en forma de un kit, para la administración simultánea, por separado, secuencial o combinada.

35 Por ejemplo, el kit puede comprender los tres péptidos en recipientes distintos. El contenido de los recipientes puede combinarse o no antes de la administración.

El kit también puede comprender medios de mezcla y/o administración (por ejemplo, un vaporizador para la administración intranasal; o una jeringa y aguja u otro dispositivo médico para la dosificación subcutánea/intradérmica). El kit también puede comprender instrucciones de uso.

40 La composición/kit puede usarse para inhibir o prevenir la producción de autoanticuerpos hacia MBP *in vivo*. En particular, la composición/kit puede usarse para tratar y/o prevenir la uveítis en un sujeto.

Modelo animal

En la presente memoria se describe un modelo animal de uveítis. Como se analiza en los ejemplos, el modelo animal proporciona la ventaja de que se induce la uveítis sin inducción de encefalomielit (EAE).

45 Por tanto, en la presente memoria se describe un modelo animal para la uveítis, en donde el animal comprende niveles aumentados de la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína interfotorreceptora de unión a retinoides (IRBP) en comparación con un animal de control.

La expresión "niveles aumentados de MBP e IRBP" pretende abarcar un nivel aumentado de cualquiera de la secuencia de MBP o IRBP de longitud completa, por ejemplo péptidos de MBP o IRBP.

50 La MBP puede ser, o derivar, de ser humano o cobaya (gpMBP). Las secuencias de la MBP humana y de cobaya se exponen a continuación:

MBP humana (entrada P02686 de UniProtKB, secuencia de MBP humana de longitud completa)

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNNGTSSQ  
DTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSESEDELQTI  
QEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFG  
GDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKG  
RGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFGVDAQGTLSKIFKLGGDRSRSGSP  
MARR (SEQ ID NO: 5)

También se conocen otras isoformas de MBP, por ejemplo UniProtKB P02686-3, P02686-4, P02686-5 y P02686-6.

MBP de cobaya (entrada P25188 de UniProtKB)

ASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGSDRAAPKRGSGKDS  
HHAARTTHYGSLLPQKSQRSQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQ  
KPGFGYGGGRADYKSKGFGKAHDAQGTLSKIFKLGGDRSRSGSPMARR (SEQ ID NO: 6)

La IRBP puede ser IRBP humana, o derivar de la IRBP humana. La secuencia de la IRBP humana se expone a continuación (entrada P10745 de UniProtKB):

MMREWVLLMSVLLCGLAGPHTLFQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAIIQQAISHE  
ILSISDPQTLASVLTAGVQSSNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLEEEELLAWLQRG  
LRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLRHCTGGQVSGI  
PYIISYLHPGNTILHVDITYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDVVLTSSQTRGVAE  
DIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRLKRIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGSQTWEGSG  
VLPCVGTPEAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLDYITLVDRVPTLLQHLASMDFS  
TVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWPAPDAAAEDSPGVAPELPEDEA  
IRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSDFADASVLGVLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRH  
NPGGPSSAVPLLLSYFQGPPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEHFSHMEPLGPRYSTQRGVYLL  
TSHRTATAAEEFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTVPVLTFFID  
NHGEAWLGGGVVDPDAIVLAEALDKAQEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGGT  
SALLRAKLAQGAYRTAVDLESASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPAV  
PSPEELTYLIEALFKTEVLPGLGLYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQQLVDTAALVI  
DLRYNPGSYSTAIPLLCSYFFAEPRQHLYSVFDRTSKVTEVWTLQVAGQRYGSHKDL  
YILMSHTSGSAAEFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSPLYASMPTQMAMS  
ATTGKAWDLGAVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAK  
MATKLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIP  
SPEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFGEGLLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMIID  
MRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKKSMV  
ILTSSVTAGTAAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSVGA  
SDGSSWEGVGVTPIHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLRVKRSPGLQDHL (SEQ ID NO: 7)

La IRBP puede ser la IRBP bovina (SEQ ID N° 8) (entrada P12661 de UniProtKB):

MVRKWAALLP	MLLCGLTGPA	HLFQPSLVLE	MAQVLLDNYC	FPENLMGMOG
60	70	80	90	100
AIEQAINKSQE	ILSISDPQTL	ANVLTAGVQS	SLNDPRLVIS	YEPSTLEAPP
110	120	130	140	150
RAPAVTNLTL	EEIIAGLQDG	LRHEILEGNV	GYLQVDDIEG	QEVMSKLRSE
160	170	180	190	200
LVANVWRKLV	NTSALVLDLR	HCTSGHVSST	PYVISYLHFG	STVSHVDTVY
210	220	230	240	250
DRPSNTTTEI	WTLPEALGEK	YSADKDVVVL	TSSRTGGVAE	DIAYILKQMR
260	270	280	290	300
RAIVVGERTV	GGALNLQKLR	VGQSDFFLTV	PVSRLGFLG	EGSQTWEGSG
310	320	330	340	350
VLPCVGTPEAE	QALEKALAVL	MLRRALPGVI	QRLQEALEPY	YTLVDRVPAL
360	370	380	390	400
LSHLAANDLS	SVVSEDDLVY	ELNAGLQAVS	EDPRLQVQVY	RPKEASSGPE
410	420	430	440	450
EEAEPEPEAV	PEVPEDEAVR	PALVDSVPQV	SVLPGNVGYL	REFDSFADASV
460	470	480	490	500
LEVLGFYILH	QVWEPLQDTE	HLIMDLRQNP	GGPSSAVPLL	LSYFQSPDAS
510	520	530	540	550
PVRLEFSTYDR	RTNITREHFS	QTELLGREYF	TQRGVYLLTS	HRTATAAEEL

```

560      570      580      590      600
AFIMQSLGWA TLVGEITAGS LLHTITVSHL ETEEGGLALT VPVLTFIDNH
610      620      630      640      650
GECWLGGGVV PDAIVLAEEA LDRAGEVLEF HRSIGELVEG TGRILLEAHYA
660      670      680      690      700
RPEVVGQMG A LLRAKLAQGA YRTAVDLESL ASQITADLQE MSGDHRLLVF
710      720      730      740      750
RSPGEMVAEE APPPPPVVES PEELSYLIEA LFKTEVLEPGQ LGYLRFDAMA
760      770      780      790      800
ELETVKAVGP QLVQIVWQKL VDTAALVVDL RYNEGSYSTA VPLLCSYFFE
810      820      830      840      850
AEPRRHLYSV FDRATSRVTE VWTLPHTVGQ RYGS HKDLYV LVSHTS GSAA
860      870      880      890      900
EAFATMQDL QRAFIIGEPT AGGALSVGIY QVGSSALYAS MPTQMAMSAS
910      920      930      940      950
TGEAWDLGV EPDITVPMSEV ALSTARDIVT LRKVPTVLQ TAGKLVADNY
960      970      980      990      1000
ASPELGVRMA AELSGLSRY ARVTSEAAAL ELLQADLQVL SCDPHLKTAN
1010     1020     1030     1040     1050
LPEDAKDRIF GIVPMQLPSP EVFEDLIKES FHTNVLEGNV GYLRFDMFQD
1060     1070     1080     1090     1100
CELLTQVSEL LVEHVWKKIV HTDALIVDMR FNIGGPTSSI SALCSYFFDE
1110     1120     1130     1140     1150
GPFILDLKIY NPPNNSVSEL WTLSQLLEGER YGSRKSMVIL TSTLTAGAAE
1160     1170     1180     1190     1200
EFTYIMKRLG RALVIGEVTS GGCQPPQTYH VDDFDLYLTI PTARSVGAAD
1210     1220     1230     1240     1250
GSSWEGVGVV PDVAVPAEAA LTRAQEMLQH TPLRARRSPR LHGRKKGHRH
1260     1270     1280
QSQGRAGSLG RNQGVVRPEV LTAPESGQKR GLLQCG

```

La IRBP puede ser un péptido derivado de IRBP, preferiblemente el IRBP1177-1191 ADGSSWEGVGVPDV (SEQ ID N° 9).

- 5 El nivel de MBP e IRBP aumenta con respecto a un animal de control adecuado, por ejemplo, un animal al que no se han administrado MBP e IRBP exógenas o transgénicas.

El nivel de MBP e IRBP puede aumentarse en el animal por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede hacerse inmunizando al animal con MBP e IRBP, como se describe en los presentes ejemplos.

Alternativamente, dicho aumento puede conseguirse administrando uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que codifican MBP y/o IRBP. El vector puede ser un vector viral.

- 10 En la presente memoria se describe un método para producir un modelo animal de uveítis, y dicho método comprende aumentar el nivel de MBP e IRBP en un animal.

El método puede comprender aumentar el nivel de MBP e IRBP administrando MBP e IRBP al animal, es decir, inmunizando al animal con MBP e IRBP, por ejemplo, como se describe en los presentes ejemplos.

- 15 El modelo animal tiene características que son relevantes para la uveítis. Por ejemplo, en el modelo animal, los signos clínicos de la uveítis pueden aumentar en comparación con los animales de control equivalentes en los que no se aumentan los niveles de MBP e IRBP.

Las MBP y/o IRBP pueden ser MBP y/o IRBP humanas.

- 20 Las MBP o IRBP pueden ser una parte o fragmento o porción de MBP o IRBP, siempre que la función requerida se conserve en el modelo animal. La IRBP puede ser el péptido IRBP1177-1191 (ADGSSWEGVGWPDV (SEQ ID N° 9), también denominado R16).

Las MBP y/o IRBP pueden administrarse al animal de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por vía oral, intravenosa (cuando son solubles en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o mediante supositorio o implante (por ejemplo, mediante el uso de moléculas de liberación lenta).

La administración puede ser subcutánea.

- 25 Una dosis adecuada de la MBP que se administra al animal puede ser de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 o 500 µg. En un aspecto, se administran aproximadamente 100 µg de MBP.

Una dosis adecuada de la IRBP que se administra al animal puede ser de aproximadamente 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 o 100 µg. En un aspecto, se administran aproximadamente 20 µg de IRBP.

Las MBP y/o IRBP pueden administrarse con un adyuvante, por ejemplo, adyuvante de Freund.

- 5 Puede proporcionarse un ácido nucleico que codifica MBP y/o IRBP mediante el uso de procedimientos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, basados en las secuencias de MBP y/o IRBP descritas en la presente memoria.

El ácido nucleico puede ser natural, sintético o recombinante. Puede ser de bicatenario o monocatenario, puede ser ADN o ARN o combinaciones de los mismos. Puede ser, por ejemplo, ADNc, un producto de PCR, una secuencia genómica o ARNm.

- 10 La secuencia de nucleótidos se puede optimizar mediante codones para la producción en el huésped/célula huésped de elección.

La administración de la secuencia de nucleótidos que codifica MBP y/o IRBP puede estar mediada por una infección vírica. Los vectores virales adecuados son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el vector viral puede ser un adenovirus, retrovirus o lentivirus.

- 15 La producción del modelo animal puede comprender múltiples administraciones del vector.

El vector, por ejemplo el adenovirus, puede administrarse a intervalos de 3 semanas. Por ejemplo, el vector se puede administrar a un intervalo de 18-25, 18-23, 19-23 o 20-22 días. El vector puede administrarse en un intervalo de 20, 21 o 22 días.

- 20 El modelo animal puede comprender administrar el vector de adenovirus en al menos dos ocasiones. Por ejemplo, el vector de adenovirus puede administrarse en dos o tres ocasiones.

El vector, por ejemplo el adenovirus, puede administrarse a una dosis de  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas virales por administración. En particular, el adenovirus puede administrarse a una dosis de  $10^9$  a  $10^{11}$  partículas virales por administración. El adenovirus puede administrarse a una dosis de  $10^9$  partículas virales por administración.

- 25 El vector puede administrarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, en el caso de un vector adenoviral, el vector puede administrarse mediante inyección intramuscular.

El animal puede ser un mamífero. Por ejemplo, el animal puede ser un ratón, rata, conejo, cobaya o primate. Preferiblemente, el animal es una rata.

El animal puede ser una rata Lewis, preferiblemente una rata Lewis hembra.

- 30 A modo de ejemplo, el modelo descrito en los presentes ejemplos se generó mediante la administración por inyección subcutánea de 200 microlitros de una emulsión que contenía 20 microgramos de IRBP1177-1191 y 100 microgramos de proteína básica de mielina humana (huMBP) o de cobaya (gpMBP) en adyuvante incompleto de Freund complementado con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Como se analiza en la presente memoria, el modelo proporciona la ventaja de que se induce la uveítis con una inducción marginal de encefalomiелitis.

La invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

- 35 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Este estudio tiene como objetivo estudiar el efecto, en ratas Lewis, de inmunizaciones con proteína básica de mielina de cobaya (gpMBP), proteína básica de mielina humana (huMBP) y/o proteína interfotorreceptora de unión a retinoides con respecto al desarrollo de encefalomiелitis (EAE) y/o uveítis (EAU).

- 40 **Esquema experimental**

Se asignaron aleatoriamente ratas Lewis hembra adultas a grupos experimentales y se dejaron aclimatar durante una semana. El día 0, se administraron a los animales mediante inyección subcutánea 200 microlitros de una emulsión que contenía 20 microgramos de IRBP1177-1191 (Cambridge Bioscience, RU) y/o 100 microgramos de proteína básica de mielina de cobaya (gpMBP) o humana (Fitzgerald Industries International, MA, EE.UU.) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, RU) complementado con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (500 µg por rata) (Becton Dickenson, RU). Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se pesaron diariamente. Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron diariamente para detectar signos clínicos de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental para incluir la flacidez, paresia y/o parálisis de la cola, las extremidades traseras y/o las extremidades delanteras. Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para determinar los signos clínicos de uveítis. El día 21 (grupos 1, 2 y 3) o el día 28 (grupos 4 y 5),

los animales se sacrificaron y las siguientes muestras se diseccionaron y se almacenaron en fijador tisular para el análisis histopatológico opcional: cerebro, médula espinal, ojos derecho e izquierdo.

Grupos de tratamiento y dosificaciones

Los grupos 1, 2 y 3 son n = 8 por grupo.

5 Los grupos 4 y 5 son n = 14 por grupo.

Grupo	Exposición antigénica	Necropsia
1 IRBP	Día 0: 200 µl de emulsión que contenía 20 µg de IRBP en CFA con 5 mg/ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	Día 21
2 gpMBP	Día 0: 200 µl de emulsión que contenía 100 µg de gpMBP en CFA con 5 mg/ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	
3 IRBP y gpMBP	Día 0: 200 µl de emulsión que contenía 20 µg de IRBP y 100 µg de gpMBP en CFA con 5 mg/ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	
4 huMBP	Día 0: 200 µl de emulsión que contenía 100 µg de huMBP en CFA con 5 mg/ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	Día 28
5 IRBP y huMBP	Día 0: 200 µl de emulsión que contenía 20 µg de IRBP y 100 µg de huMBP en CFA con 5 mg/ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	

n/a: no aplicable, IRBP: proteína interfotorreceptora de unión a retinoides, gpMBP: proteína básica de mielina de cobaya, huMBP: proteína básica de mielina humana, CFA: adyuvante completo de Freund, SC: inyección subcutánea, \*500 µg por rata.

Lecturas

10 Observaciones clínicas inespecíficas

Desde el día 0 hasta el final del experimento, se comprobaron diariamente en los animales los signos clínicos inespecíficos, que incluían una postura anormal (encorvada), un estado anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

Pesos corporales

15 Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se pesaron diariamente.

Puntuaciones clínicas (uveítis)

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron visualmente dos veces por semana para determinar los signos clínicos de uveítis anterior mediante el uso del siguiente sistema de puntuación. La puntuación máxima posible fue 3. Los datos se representaron gráficamente (media ± EEM).

	Descripción
0	Normal
1	Ligera dilatación de los vasos del iris y estroma del iris engrosado, unas pocas células inflamatorias dispersas
2	Vasos sanguíneos inflamados en el iris, contracción anormal de la pupila
3	Cámara anterior turbia

- 5 Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para determinar los signos clínicos de uveítis intermedia y posterior. Las imágenes retinianas se capturaron mediante el uso de TEFI en animales no anestesiados pero restringidos después de la dilatación de la pupila mediante el uso de tropicamida al 1% y después hidrocloreto de fenilefrina al 2,5%. Las imágenes retinianas se puntuaron mediante el uso del siguiente sistema. La puntuación máxima posible fue 6. Los datos se representaron gráficamente (media  $\pm$  EEM). Las imágenes de TEFI muestran síntomas de uveítis tanto intermedia como posterior.

	Descripción
	Vasos retinianos
1	1 vaso dilatado
2	Más de 1 vaso dilatado
3	Todos los vasos principales dilatados
	Infiltración del tejido retiniano
1	1-2 pequeñas áreas de daño retiniano
2	3+ áreas pequeñas o 1+ área grande
3	No visible (turbidez o desprendimiento grave) (causado, p. ej., por la inflamación o hemorragia del cuerpo vítreo)

## Resultados

### Observaciones clínicas inespecíficas

- 10 Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales no mostraron ningún signo clínico inespecífico, tal como postura anormal (encorvada), estado anormal del pelaje (piloerección) o niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada). En los animales a los que se administró gpMBP, se observó una pérdida significativa de peso corporal desde el día 11 hasta el final del experimento en el día 21 en comparación con el grupo al que se administró IRBP ( $p < 0,0001$ ).
- 15 En los animales a los que se administró IRBP y gpMBP, se observó una pérdida significativa de peso corporal desde el día 11 hasta el final del experimento en el día 21 en comparación con el grupo al que se administró IRBP ( $p < 0,05$  el día 11,  $p < 0,001$  el día 12,  $p < 0,0001$  del día 13 hasta el día 20 y  $p < 0,001$  el día 21). No hubo diferencia en la pérdida de peso corporal entre los animales a los que se administró gpMBP sola y los animales a los que se administró gpMBP e IRBP. No se observó ninguna pérdida significativa de peso corporal en los animales a los que se administró IRBP sola, MBP humana o MBP humana con IRBP.
- 20

### Puntuaciones clínicas: Uveítis

Se consideró que los animales con una puntuación promedio para ambos ojos mayor de 0,5 en al menos dos sesiones de TEFI consecutivas (véase la Figura 2) o una puntuación mayor de 1,0 en cualquier ocasión habían desarrollado signos clínicos de uveítis posterior. En base a este criterio, la incidencia de EAU fue:

Grupo	Incidencia	Inicio (día)	Puntuación máxima
IRBP	100% (8/8)	10,5 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,3
gpMBP	50% (4/8)	11,5 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,2
gpMBP e IRBP	100% (8/8)	9,0 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 0,4
huMBP	100% (14/14)	10,2 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,5
huMBP e IRBP	100% (14/14)	9,9 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,3

Debido a la falta de pigmentación en la retina de las ratas Lewis, se usó el sistema de puntuación siguiente. Esto se debe a la incapacidad de identificar las áreas de infiltración que causan opacidad y formación de rebordes en un fondo pálido. La inflamación del disco óptico no pudo identificarse claramente y por tanto no se puntuó, tampoco se observó ningún daño estructural. La infiltración de los vasos retinianos pudo identificarse por la apariencia inflamada en una escala de 0-3, de leve a grave. La inflamación retiniana se identificó por la aparición de áreas pequeñas a grandes de enrojecimiento causado por el aumento de la vascularización también en una escala de 0-3, dando una puntuación total posible de 6.

	Descripción
	Vasos retinianos
1	1 vaso inflamado
2	Más de 1 vaso inflamado
3	Todos los vasos principales inflamados
	Infiltración del tejido retiniano
1	1-2 pequeñas áreas de daño retiniano
2	3+ áreas pequeñas o 1+ área grande
3	No visible (turbidez o desprendimiento grave)

La incidencia de los signos clínicos de uveítis posterior fue máxima en todos los grupos experimentales a los que se administró IRBP, ya sea sola o en combinación con gpMBP o huMBP. También se observaron signos clínicos de EAU en el 50% de los animales a los que se administró gpMBP y en el 100% de los animales a los que se administró huMBP en ausencia de IRBP (véase la Figura 1).

La aparición de los signos clínicos de EAU no difirió estadísticamente entre los grupos experimentales.

La gravedad de los signos clínicos de EAU fue significativamente menor en los animales a los que se administró gpMBP en comparación con el grupo experimental al que se administró IRBP ( $p < 0,001$ ), IRBP y gpMBP ( $p < 0,01$ ), IRBP y huMBP ( $p < 0,01$ ) o huMBP ( $p < 0,05$ ).

También se observaron signos clínicos de uveítis anterior durante el experimento.

Los datos recogidos hasta el día 21 se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples entre grupos experimentales.

En los animales a los que se administró IRBP, se observaron signos clínicos a partir del día 11. Los signos fueron significativamente mayores que en el grupo al que se administró gpMBP en el día 11, el día 14 y el día 18 ( $p < 0,0001$ ) (véase la Figura 3).

En los animales a los que se administró IRBP y gpMBP, también se observaron signos de uveítis anterior a partir del día 11 ( $p < 0,0001$  el día 11,  $p < 0,01$  el día 14 y el día 18 y  $p < 0,05$  el día 21) en comparación con el grupo al que se administró gpMBP.

En los animales a los que se administró IRBP y huMBP, se observaron signos de uveítis anterior el día 11 y el día 14 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el grupo al que se administró gpMBP.

En los animales a los que se administró huMBP, se observaron signos de uveítis anterior el día 14 ( $p < 0,0001$ ) y el día 18 ( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo al que se administró gp-MBP.

La MBP de cobaya puede inducir la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratas Lewis, un modelo de esclerosis múltiple (EM). En este experimento, se desarrolló EAE grave en ratas Lewis inmunizadas con gpMBP sola (incidencia 8/8 ratas; puntuación media máxima 3,5) o en combinación con péptido IRBP (incidencia 8/8 ratas; puntuación media máxima 3,9) mediante el uso del sistema de puntuación para síntomas de parálisis: 0) sin anomalías, (0,5) flacidez parcial de la cola, (1) flacidez completa de la cola, (2) paresia de una extremidad posterior, (2,5) paresia de dos extremidades posteriores, (3) parálisis de una extremidad posterior, (4) parálisis de dos extremidades posteriores, (5) incontinencia y (6) moribundo. A diferencia de las ratas inmunizadas con gpMBP, se mostraron síntomas muy leves en los otros grupos: Inmunizadas con IRBP sola (incidencia 2/8, puntuación máxima media 1,0);

inmunizadas con huMBP (incidencia 3/14, puntuación máxima media 1,0) y huMBP en combinación con péptido IRBP (incidencia 3/14, puntuación máxima media 1,0).

#### Conclusión

La administración de huMBP dio como resultado signos de uveítis tanto anterior como posterior.

- 5 Cuando se administró al mismo tiempo que IRBP, los signos clínicos de uveítis tanto anterior como intermedia/posterior aumentaron y proporcionaron un modelo robusto para probar la eficacia contra la uveítis autoinmunitaria.

10 Con la adición de la incidencia y gravedad muy bajas de la EAE desarrollada después de la inmunización con MBP humana, se decidió usar el modelo de uveítis que implica la inmunización con MBP humana sola o con la adición del péptido IRBP para estudiar los efectos de los péptidos de MBP según la presente invención, como se describe en el Ejemplo 2.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo detalla los estudios del efecto de ATX-UV-3 en un modelo de rata Lewis de proteína básica de mielina humana (huMBP) y uveítis inducida por proteína interfotorreceptora de unión a retinoides (IRBP), como se describió en el Ejemplo 1.

- 15 El ATX-UV-3 comprende:

MBP 30-44 (SEQ ID N°: 1);

MBP 83-99 (SEQ ID N°: 2);

MBP 131-145 (SEQ ID N°: 3); y

MBP 140-154 (SEQ ID N°: 4)

- 20 Métodos

#### Esquema experimental

25 Se asignaron aleatoriamente ratas Lewis hembra adultas a los grupos experimentales y se dejaron aclimatar durante una semana. El día 0, se administró a los animales mediante inyección subcutánea 200 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de proteína básica de mielina (MBP) humana (Fitzgerald Industries International, MA, EE.UU.) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Reino Unido) complementado con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (500 µg por rata) (Becton Dickinson, Reino Unido) y 20 microgramos de IRBP 1177-1191 (Cambridge Bioscience, Reino Unido). Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para determinar los signos clínicos de uveítis.

30 El día 21, se analizaron las puntuaciones clínicas y el estudio se extendió al día 35. El día 35, los animales se sacrificaron y los ojos (derecho e izquierdo) se diseccionaron y se almacenaron en fijador tisular para el análisis histopatológico.

Tabla 1: Grupos de tratamiento y dosificaciones

(Todos los grupos son n = 12)					
	Grupo	Tratamiento			Inducción de la enfermedad
		Dosis	Vía	Régimen	
1	Vehículo	n/a	SC	Días -8, -6 y -4	Día 0: 100 µg de huMBP y 20 µg de IRBP
2	ATX-UV-3	100 µg	SC	Días -8, -6 y -4	

n/a: no aplicable, IRBP: proteína interfotorreceptora de unión a retinoides, huMBP: proteína básica de mielina humana, SC: inyección subcutánea.



*Observaciones clínicas inespecíficas*

Desde el día 0 hasta el final del experimento, se comprobaron diariamente en los animales los signos clínicos inespecíficos, que incluían una postura anormal (encorvada), un estado anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

5 *Puntuaciones clínicas (uveítis)*

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para detectar signos clínicos de inflamación ocular (uveítis anterior) mediante el uso del siguiente sistema de puntuación: (0) normal, (1) ligera dilatación de los vasos del iris y estroma del iris engrosado, unas pocas células inflamatorias dispersadas, o ambas, (2) vasos sanguíneos inflamados en el iris, contracción anormal de la pupila y (3) cámara anterior turbia. Los datos se representaron gráficamente (media  $\pm$  EEM).

Tabla 2: Puntuación de uveítis anterior:

Puntuación	Descripción
0	Normal
1	Ligera dilatación de los vasos del iris y estroma del iris engrosado, unas pocas células inflamatorias dispersas
2	Vasos sanguíneos inflamados en el iris, contracción anormal de la pupila
3	Cámara anterior turbia

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para determinar los signos clínicos de uveítis. Las imágenes retinianas se capturaron mediante el uso de TEFi en animales no anestesiados pero restringidos después de la dilatación de la pupila mediante el uso de tropicamida al 1% y después hidrocloreuro de fenilefrina al 2,5%. Las imágenes retinianas se puntuaron mediante el uso del sistema de puntuación modificado descrito a continuación con una puntuación máxima posible de 10. Los datos se representaron gráficamente (media  $\pm$  EEM).

Tabla 3: Puntuación de uveítis intermedia/posterior:

Puntuación	Criterios
	Vasos retinianos
1	1 vaso inflamado
2	Más de 1 vaso inflamado
3	Todos los vasos principales inflamados
4	No visible debido a la "turbidez" <sup>1</sup>
	Infiltración del tejido retiniano
1	1-2 pequeñas áreas de daño retiniano
2	3+ áreas pequeñas o 1+ área grande
3	Daño generalizado
4	No visible (turbidez o desprendimiento grave)

Puntuación	Criterios
	Daño estructural
1	Desprendimiento de retina con plegamiento
2	No visible (turbidez o desprendimiento grave)

<sup>1</sup> También se refiere a la uveítis intermedia

#### Observaciones clínicas inespecíficas

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales no mostraron ningún signo clínico inespecífico, tal como postura anormal (encorvada), estado anormal del pelaje (piloerección) o niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

#### Puntuaciones clínicas (uveítis)

##### Uveítis posterior

Se consideró que los animales con una puntuación promedio para ambos ojos mayor de 0,5 en al menos dos sesiones de TEF1 consecutivas o una puntuación mayor de 1,0 en cualquier ocasión habían desarrollado signos clínicos de uveítis posterior (Figura 5).

Tabla 4: Incidencia de EAU posterior/intermedia:

Grupo	Incidencia	Inicio (día)	Puntuación máxima
huMBP/IRBP, vehículo	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

Las puntuaciones clínicas se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos experimentales en cada día experimental (Figura 5).

En los grupos expuestos a huMBP e IRBP, el péptido ATX redujo significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con el grupo tratado con el vehículo en el día 10 ( $p < 0,0001$ ), el día 14 ( $p < 0,01$ ) y el día 17 ( $p < 0,05$ ).

Las puntuaciones clínicas se analizaron adicionalmente calculando los valores del área bajo la curva (AUC) y comparando el AUC para cada grupo experimental mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Sidak para comparaciones múltiples entre todos los grupos experimentales (Figura 6).

En los grupos expuestos a huMBP e IRBP, el péptido ATX redujo significativamente las puntuaciones clínicas en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,001$ ).

#### Ejemplo 3

Se llevó a cabo un estudio adicional para investigar la eficacia de ATX-UV-3 en un modelo animal de uveítis. Se incluyó ciclosporina A como control positivo. (Se usó una dosis elevada de ciclosporina A que no sería una dosis fisiológica para seres humanos, pero se eligió con el fin de validar el modelo).

#### Esquema experimental

Se asignaron aleatoriamente ratas Lewis hembra adultas a grupos experimentales y se dejaron aclimatar durante una semana. Los tratamientos se administraron según el programa siguiente. El día 0, se administraron a los animales mediante inyección subcutánea 200 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de proteína básica de mielina (MBP) humana en adyuvante incompleto de Freund complementado con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (500 µg por rata) y/o 20 microgramos de IRBP1177-1191. Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana para detectar signos clínicos de uveítis anterior y posterior. El día 28, los animales se sacrificaron y los ojos (derecho e izquierdo) se diseccionaron, se transfirieron a fijador tisular y después se procesaron para su incrustación en parafina y se almacenaron en bloques de parafina para el análisis histopatológico opcional.

## Grupos de tratamiento y dosificaciones

Todos los grupos experimentales fueron n = 12.

El volumen de administración fue de 5 ml/kg para la administración PO y 100 µl de volumen fijo por rata para la administración SC.

Tabla 5

	Grupo	Tratamiento			Inducción de la enfermedad
		Dosis	Vía	Régimen	
1	Vehículo	n/a	SC	13 dosis*	Día 0: 100 µg de huMBP
2	Ciclosporina A	20 mg/kg	PO	SID, día 0 - día 27	
3	Péptidos ATX	0,1-100 µg	SC	13 dosis*	
4	Vehículo	n/a	SC	13 dosis*	Día 0: 100 µg de huMBP y 20 µg de IRBP
5	Ciclosporina A	20 mg/kg	PO	SID, día 0 - día 27	
6	Péptidos ATX	0,1-100 µg	SC	13 dosis*	
n/a: no aplicable, IRBP, proteína interfotorreceptora de unión a retinoides; huMBP, proteína básica de mielina humana; CFA, adyuvante completo de Freund; SC, inyección subcutánea; PO, por vía oral, mediante sonda oral; SID, una vez al día.					
* Se administraron péptidos ATX o vehículo en los días siguientes y en las dosis siguientes: 0,1 µg/rata el día -22, 1 µg/rata el día -20, 10 µg/rata el día -18, 100 µg/rata los días -15, -13, -11, -8, -6, -4, 3, 10, 17 y 24.					

5

## Lecturas

## Observaciones clínicas inespecíficas

Desde el día 0 hasta el final del experimento, se comprobaron diariamente en los animales los signos clínicos inespecíficos, que incluían una postura anormal (encorvada), un estado anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada). Los animales se sacrificaron antes del final programado del estudio si los signos clínicos inespecíficos se juzgaron demasiado graves.

10

## Pesos corporales

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se pesaron diariamente.

## Puntuaciones clínicas (uveítis)

Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces por semana por parte de un solo operador con enmascaramiento del tratamiento con respecto a los signos clínicos de inflamación ocular (uveítis anterior) mediante el uso del siguiente sistema de puntuación: (0) normal, (1) ligera dilatación de los vasos del iris y estroma del iris engrosado, unas pocas células inflamatorias dispersas, o ambos, (2) vasos sanguíneos inflamados en el iris, contracción anormal de la pupila y (3) cámara anterior turbia. Los datos se representaron gráficamente (media ± EEM).

20

Tabla 6

Puntuación de uveítis anterior:	
	Descripción
0	Normal
1	Ligera dilatación de los vasos del iris y estroma del iris engrosado, unas pocas células inflamatorias dispersas
2	Vasos sanguíneos inflamados en el iris, contracción anormal de la pupila
3	Cámara anterior turbia

- 5 Desde el día 0 hasta el final del experimento, los animales se puntuaron dos veces a la semana por parte de un único operario con enmascaramiento del tratamiento con respecto a los signos clínicos de uveítis posterior. Las imágenes retinianas se capturaron mediante el uso de TEFI en animales no anestesiados pero restringidos después de la dilatación de la pupila mediante el uso de tropicamida al 1% y después hidrocloreto de fenilefrina al 2,5%. Las imágenes retinianas se puntuaron usando el sistema de puntuación modificado descrito a continuación con una puntuación máxima posible de 10. Los datos se representaron gráficamente (media  $\pm$  EEM).

Tabla 7

- 10 Puntuación de uveítis posterior/intermedia:

	Criterios
	Vasos retinianos
1	1 vaso inflamado
2	Más de 1 vaso inflamado
3	Todos los vasos principales inflamados
4	No visible debido a la "turbidez"
	Infiltración del tejido retiniano
1	1-2 áreas pequeñas de daño retiniano
2	3+ áreas pequeñas o 1+ área grande
3	Daño generalizado
4	No visible (turbidez o desprendimiento grave)
	Daño estructural <sup>1</sup>
1	Desprendimiento de retina con plegamiento
2	No visible (turbidez o desprendimiento grave)

<sup>1</sup> La uveítis posterior se puntuó finalmente sin tener en cuenta el daño estructural, ya que no era aplicable.

## RESULTADOS

## Observaciones clínicas inespecíficas

Desde el día -22 hasta el final del experimento, los animales no mostraron ningún signo clínico inespecífico.

## Pesos corporales

Los pesos corporales para los modelos de huMBP y de huMBP + IRBP, expresados como un porcentaje de los pesos corporales iniciales (día -22), se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples entre los grupos experimentales y el grupo de vehículo. El ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo del tiempo y el tratamiento tanto en los modelos de huMBP y de huMBP + IRBP (todos  $p < 0,0001$ ). En el modelo de huMBP, la prueba posterior de Dunnett reveló un aumento significativo del peso corporal en los días 22, 24 y 28 en el grupo de ciclosporina A (todos  $p < 0,05$ ) y en el grupo de péptidos ATX ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) frente al grupo del vehículo. En el modelo de huMBP + IRBP, la prueba posterior de Dunnett reveló un aumento significativo del peso corporal en los días 13, 15, 22, 24 y 28 en el grupo de ciclosporina A ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) frente al grupo de vehículo.

## Puntuaciones clínicas de uveítis anterior

Se consideró que los animales con una puntuación total promedio (promedio del ojo izquierdo más el ojo derecho) de 1 en dos ocasiones consecutivas o  $>1$  después de cualquier sesión de TEFI habían desarrollado signos clínicos de uveítis anterior. Las puntuaciones clínicas de uveítis anterior se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples entre los grupos experimentales y el grupo de vehículo. En el modelo de huMBP, ningún ratón mostró signos clínicos de uveítis anterior a lo largo del transcurso del estudio. En el modelo de huMBP + IRBP, un ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo del tiempo y el tratamiento (ambos  $p < 0,0001$ ). La prueba posterior de Dunnett reveló una mejora significativa de las puntuaciones clínicas en el grupo de ciclosporina A en los días 7, 10, 14, 17, 21 y 28 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) y en el grupo de péptidos ATX en el día 10 ( $p < 0,0001$ ) frente al grupo de vehículos (Fig. 7A). Una prueba t de Student bilateral para dos muestras independientes del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la puntuación clínica de uveítis anterior reveló un efecto significativo de la ciclosporina A ( $p < 0,0001$ ) y los péptidos ATX frente al vehículo ( $p < 0,05$ ) (Fig. 7B).

## Puntuaciones clínicas de uveítis posterior/intermedia

Se consideró que los animales con una puntuación total promedio (promedio del ojo izquierdo más el ojo derecho) de 1 en dos ocasiones consecutivas o  $>1$  después de cualquier sesión de TEFI habían desarrollado signos clínicos de uveítis posterior. Las puntuaciones clínicas de uveítis posterior se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples entre los grupos experimentales y el grupo de vehículo. En el modelo de huMBP, un ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo del tiempo y el tratamiento (ambos  $p < 0,0001$ ). La prueba posterior de Dunnett reveló una mejora significativa de las puntuaciones clínicas en el grupo de ciclosporina A en los días 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) y en el grupo de péptidos ATX en los días 7, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) frente al grupo de vehículo (Fig. 8A). En el modelo de huMBP, una prueba t de Student bilateral para dos muestras independientes del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la puntuación clínica de uveítis posterior reveló un efecto significativo de la ciclosporina A ( $p < 0,0001$ ) y los péptidos ATX ( $p < 0,0001$ ) frente al vehículo (Fig. 8B).

En el modelo de huMBP + IRBP, un ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo del tiempo y el tratamiento (ambos  $p < 0,0001$ ). Una prueba posterior de Dunnett reveló una mejora significativa de las puntuaciones clínicas en el grupo de ciclosporina A en los días 7, 10, 14, 17 y 21 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) y en el grupo de péptidos ATX en el día 10 ( $p < 0,01$ ) frente al grupo de vehículo (Figura 8C). La prueba t de Student bilateral para dos muestras independientes del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la puntuación clínica de uveítis posterior reveló un efecto significativo de la ciclosporina A frente al vehículo ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 8D). Una prueba t de Student bilateral para dos muestras independientes del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la puntuación clínica de uveítis posterior reveló un efecto significativo de los péptidos ATX frente al vehículo ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8D).

## Incidencia de uveítis posterior/intermedia

Se consideró que los animales con una puntuación total promedio (ojo izquierdo más ojo derecho) de uno en dos ocasiones consecutivas o  $>1$  después de cualquier sesión de TEFI habían desarrollado signos clínicos de uveítis posterior.

En el modelo de huMBP, los animales tratados con ciclosporina A y péptidos ATX tenían una incidencia reducida en comparación con los animales tratados con el vehículo (Fig. 9A). Sólo un animal tratado con ciclosporina A y tres animales tratados con los péptidos ATX continuaron desarrollando signos clínicos de EAU (véase la Tabla 8).

Tabla 8

Grupo	Incidencia de uveítis	Inicio (día)	Puntuación máxima media
huMBP, vehículo	100% (12/12)	10,4 ± 1,3	1,8 ± 0,07
huMBP, ciclosporina A	5% (1/12)	3	1,2 ± 0,7
huMBP, péptido ATX	25% (3/12)	8 ± 1	1,08 ± 0,2 <sup>\$</sup>
huMBP/IRBP, vehículo	100% (12/12)	7,7 ± 0,8	7,9 ± 0,08
huMBP/IRBP, ciclosporina A	100% (12/12)	12,8 ± 0,7	6,1 ± 0,5
huMBP/IRBP, péptido ATX	100% (12/12)	10,3 ± 0,3	7,9 ± 0,08

<sup>\$</sup> Para el animal 3.10, la puntuación de 4 (promedio de la puntuación del ojo izquierdo y el derecho) del día 21 no se incluyó en el análisis de datos (valor atípico identificado analizando los datos de la puntuación clínica de uveítis posterior del día 21 con la prueba de Grubb con alfa = 0,05)

En el modelo de huMBP + IRBP, la ciclosporina A retrasó significativamente la aparición de uveítis posterior en comparación con el grupo tratado con el vehículo ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 9B). Los péptidos ATX retrasaron significativamente la aparición de uveítis posterior/intermedia en comparación con el grupo tratado con el vehículo ( $p < 0,05$ ) (Fig. 9B).

#### CONCLUSIONES

La administración de huMBP solo o combinado con IRBP indujo signos clínicos de uveítis posterior que dieron como resultado vasos sanguíneos inflamados, inflamación retiniana e infiltración celular, como se esperaba en estos modelos de EAU. Los signos clínicos de uveítis posterior fueron menos graves en el modelo de huMBP en comparación con los animales que recibieron huMBP + IRBP.

Se observaron signos clínicos de uveítis anterior en el modelo de huMBP + IRBP, pero no en el modelo de huMBP. En el modelo de huMBP + IRBP, los signos clínicos de uveítis anterior incluyeron una vascularización aumentada del iris e infiltración celular de la cámara anterior, así como una contracción anormal de la pupila.

En general, en el modelo de huMBP + IRBP, la ciclosporina A y los péptidos ATX redujeron significativamente los signos clínicos de uveítis anterior.

En el modelo de huMBP, la ciclosporina A y los péptidos ATX redujeron la incidencia de uveítis posterior en comparación con los animales tratados con el vehículo.

La ciclosporina A y los péptidos ATX retrasaron significativamente la aparición de uveítis posterior en el modelo de huMBP + IRBP, en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

En general, en los modelos de huMBP y de huMBP + IRBP, la ciclosporina A y los péptidos ATX redujeron significativamente los signos clínicos de uveítis posterior/intermedia.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología molecular, inmunología celular o los campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un péptido de la proteína básica de mielina seleccionado de los siguientes:  
MBP 30-44, que consiste en SEQ ID N°: 1;  
MBP 83-99, que consiste en SEQ ID N°: 2;  
5 MBP 131-145, que consiste en SEQ ID N°: 3; y  
MBP 140-154, que consiste en SEQ ID N°: 4  
para el uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto.
2. Una composición para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende:  
MBP 30-44, que consiste en SEQ ID N°: 1;  
10 MBP 83-99, que consiste en SEQ ID N°: 2;  
MBP 131-145, que consiste en SEQ ID N°: 3; y  
MBP 140-154, que consiste en SEQ ID N°: 4.
3. Una composición para el uso según la reivindicación 1, en donde la uveítis es uveítis posterior, uveítis anterior o uveítis intermedia.
- 15 4. Un kit que comprende un péptido de la proteína básica de mielina seleccionado de los siguientes:  
MBP 30-44, que consiste en SEQ ID N°: 1;  
MBP 83-99, que consiste en SEQ ID N°: 2;  
MBP 131-145, que consiste en SEQ ID N°: 3; y  
MBP 140-154, que consiste en SEQ ID N°: 4  
20 para el uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis en un sujeto.
5. Un kit para el uso según la reivindicación 4, en donde dicho kit comprende  
MBP 30-44, que consiste en SEQ ID N°: 1;  
MBP 83-99, que consiste en SEQ ID N°: 2;  
MBP 131-145, que consiste en SEQ ID N°: 3; y  
25 MBP 140-154, que consiste en SEQ ID N°: 4.
6. Un kit para el uso según la reivindicación 5, en donde dichos péptidos de MBP se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

FIGURA 1

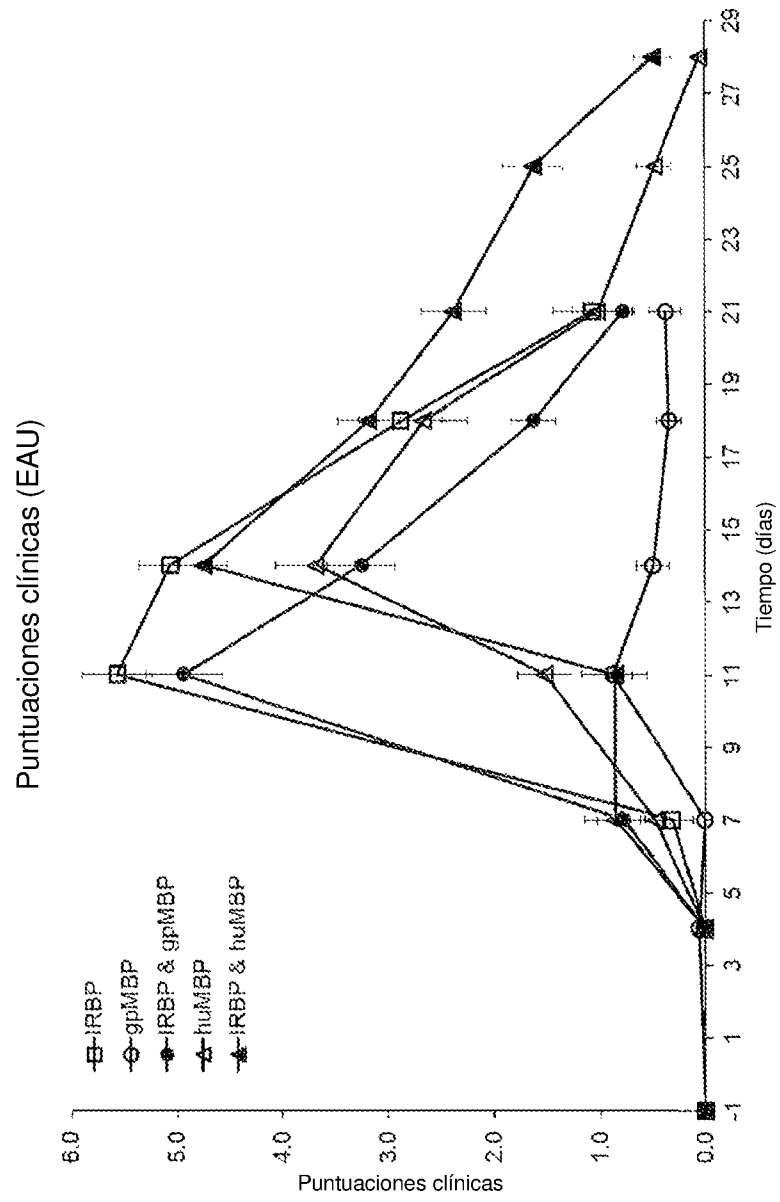




FIGURA 2

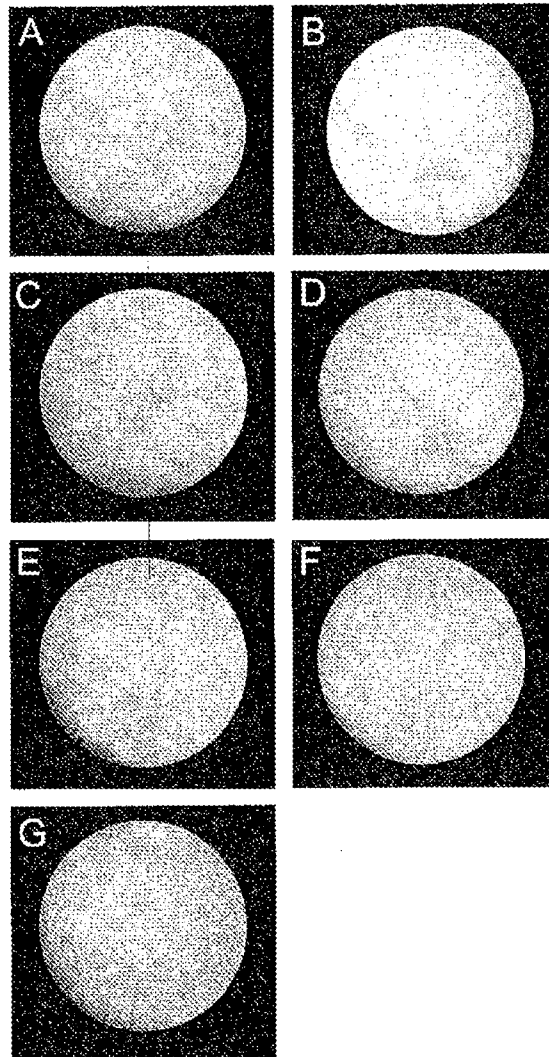


FIGURA 3

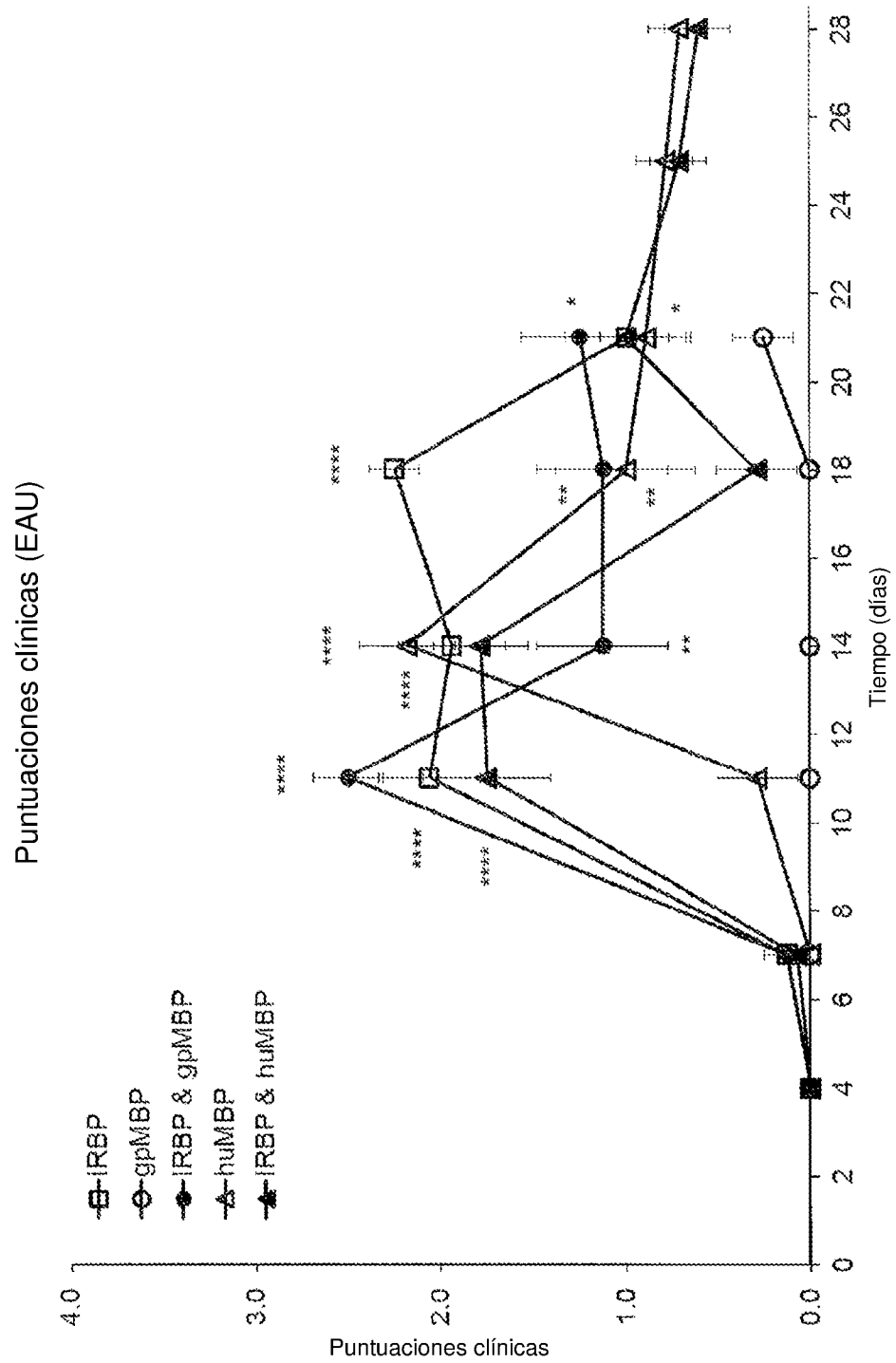
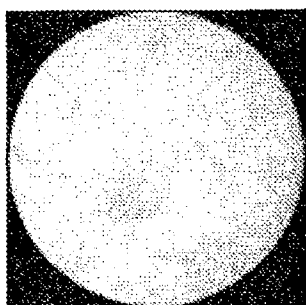
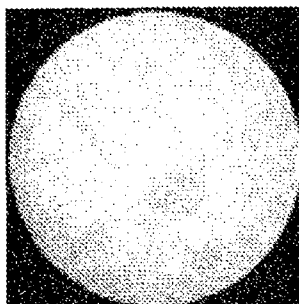


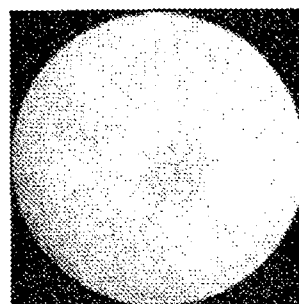
FIGURA 4



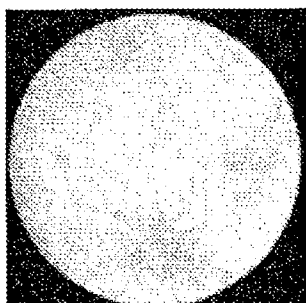
Puntuación 0



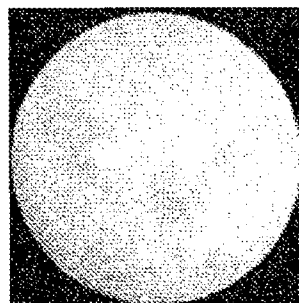
Puntuación 1



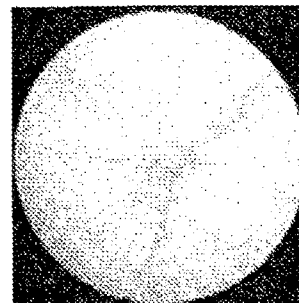
Puntuación 2



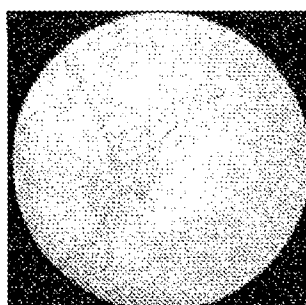
Puntuación 3



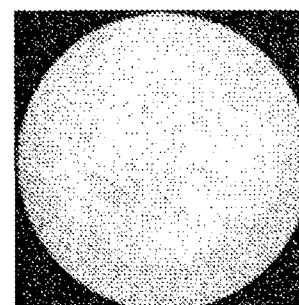
Puntuación 4



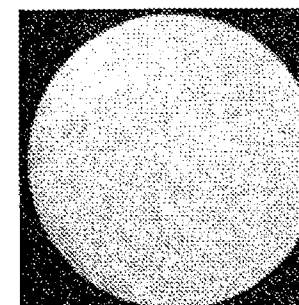
Puntuación 5



Puntuación 6



Puntuación 8



Puntuación 10

FIGURA 5

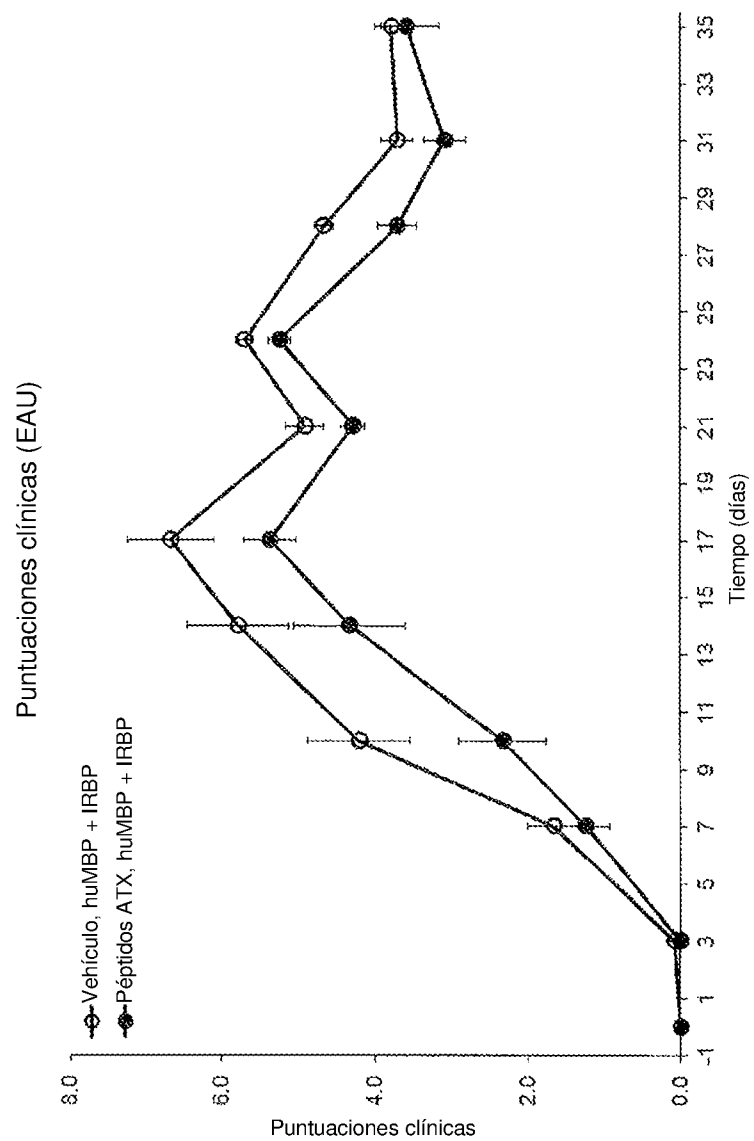


FIGURA 6

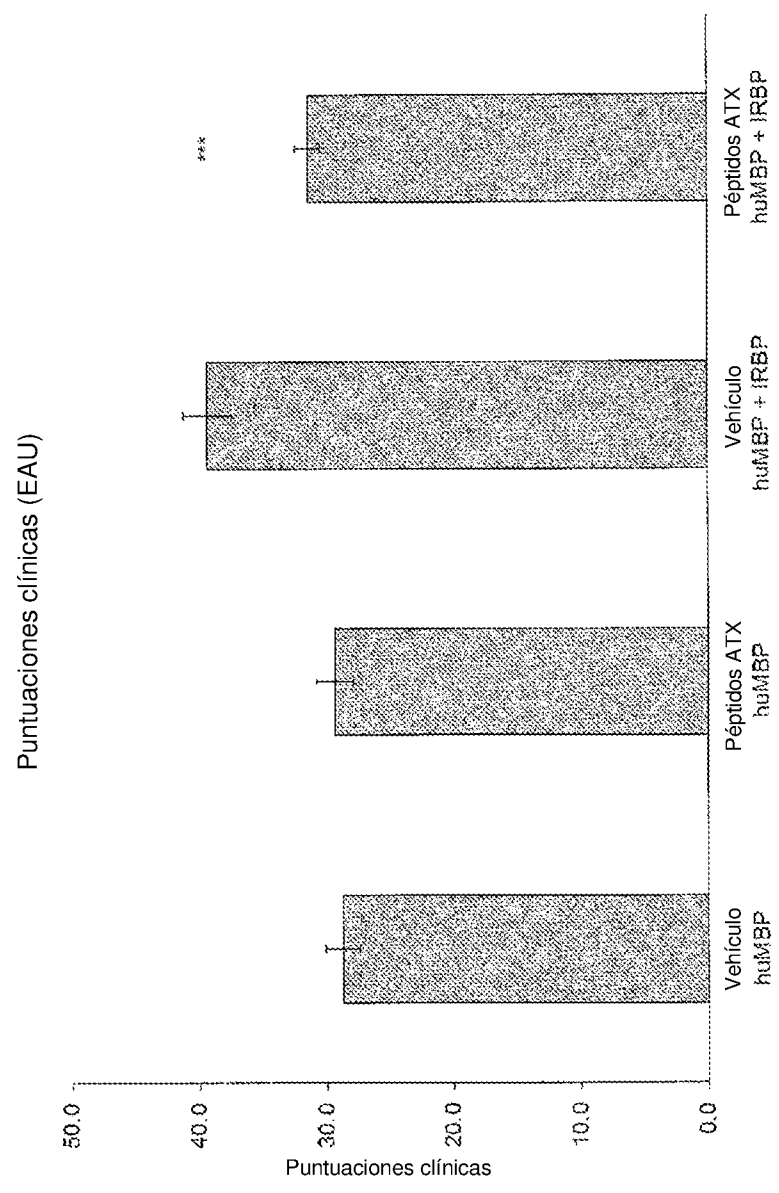
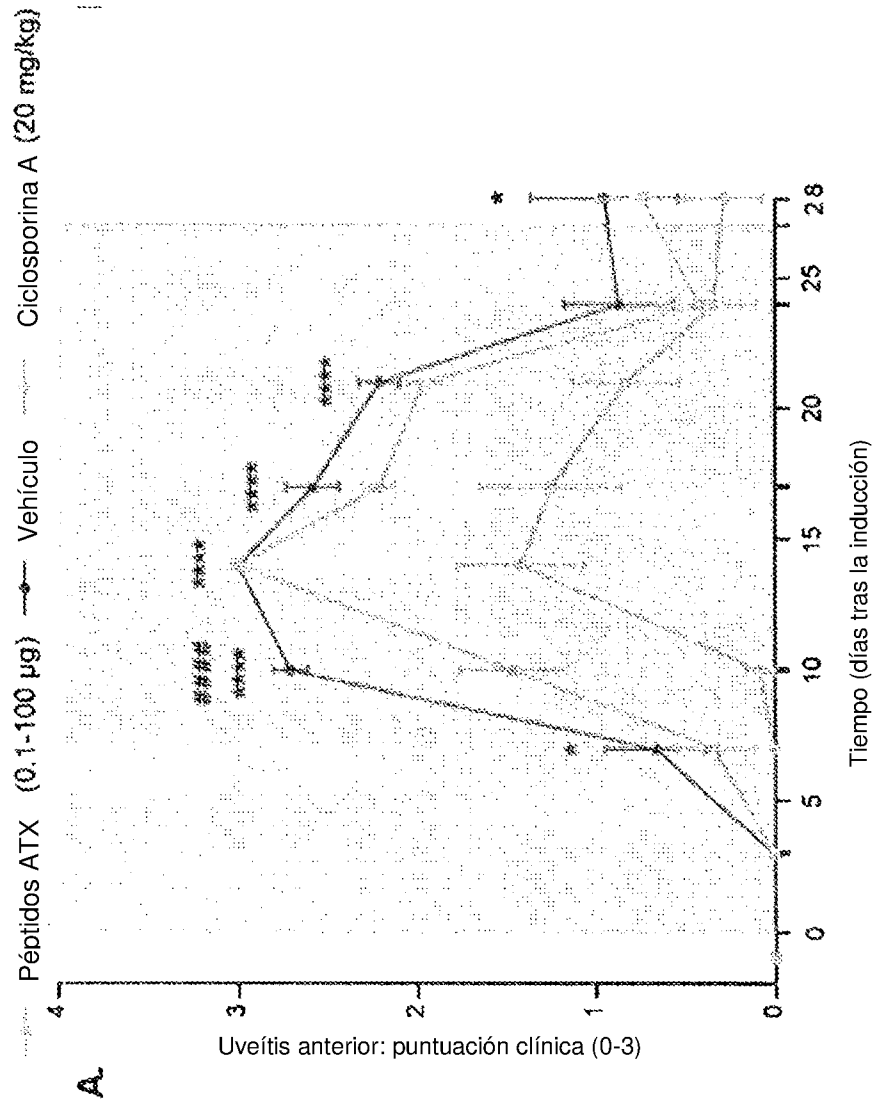


FIGURA 7



**B.**

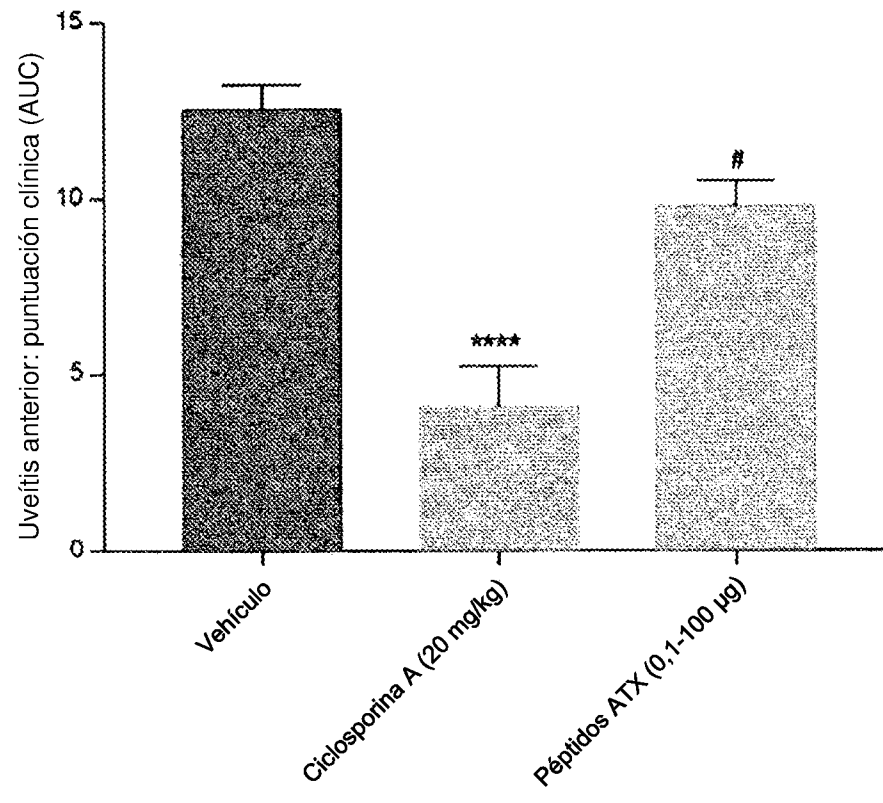


FIGURA 8

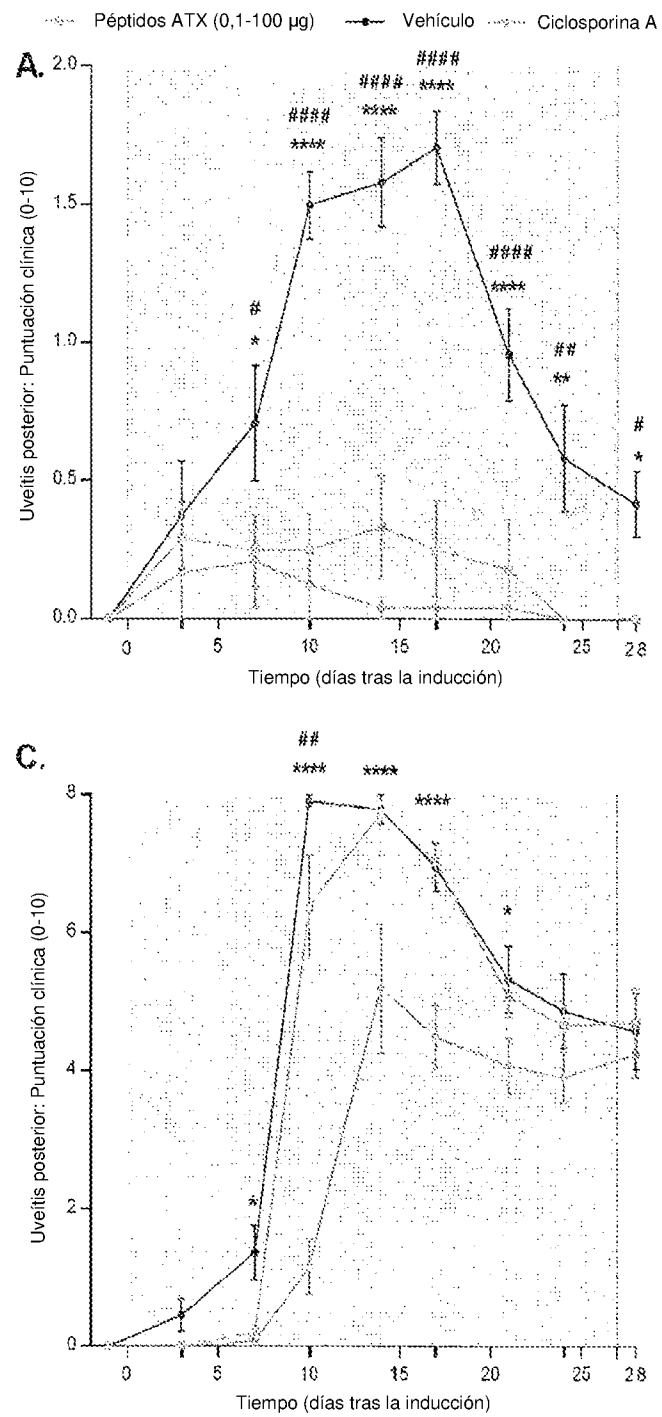
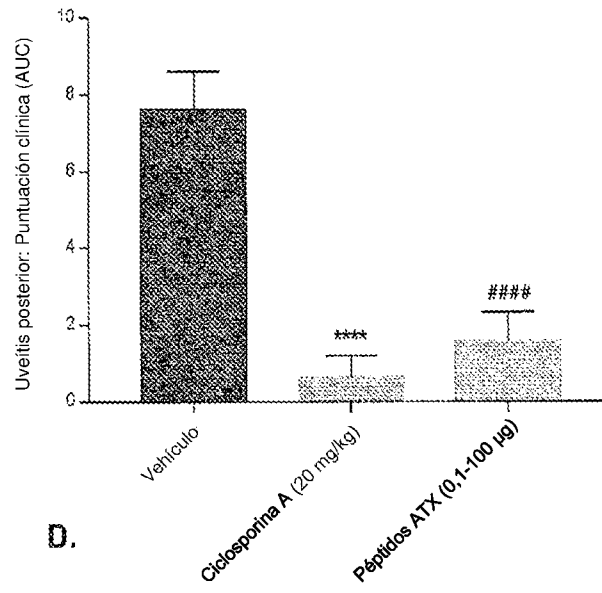




FIGURA 8 (CONTINUACIÓN)

**B.**



**D.**

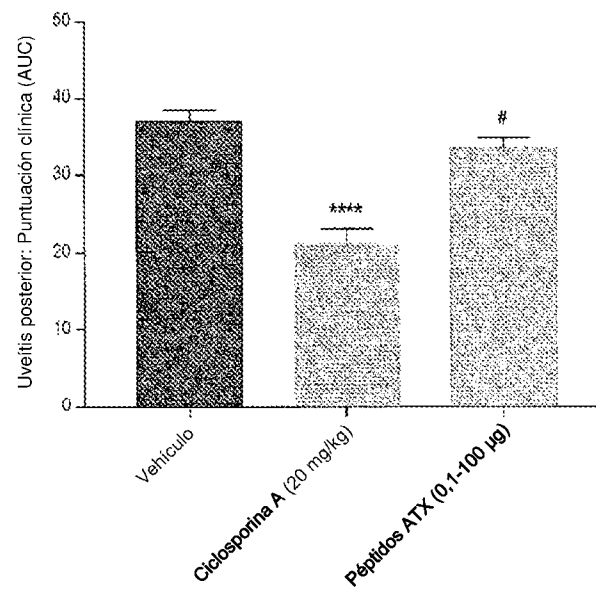
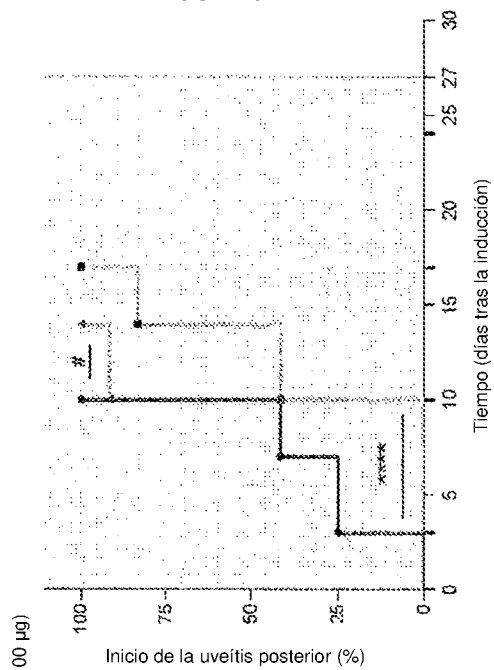


FIGURA 9

B.



A.

