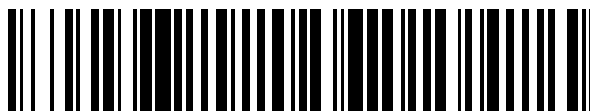


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 529**

51 Int. Cl.:

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 35/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2002 E 10178920 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2335720**

54 Título: **Vacunas de células T autólogas contra la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

14.09.2001 US 952532

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

14.08.2013

73 Titular/es:

OPEXA PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

1709 Dryden Road Suite 911

Houston, TX 77030, US y

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)

72 Inventor/es:

ZHANG, JINGWU

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 418 529 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

Vacunas de células T autólogas contra la esclerosis múltiple

5 **Antecedentes de la invención**

[0001] Existe una evidencia creciente que sugiere que las respuestas de células T autoinmunes a antígenos de mielina, incluyendo la proteína básica de mielina (MBP), están implicadas en la patogénesis de esclerosis múltiple (MS) (Stinissen et al., Crit. Rev. Immunol. 1997; 17: 33-75). Se observa que las células T reactivas a MBP experimentan una activación *in vivo* y aparecen a una frecuencia de precursor elevada en la sangre y el fluido cerebroespinal de pacientes con MS (Zhang et al., J. Exp. Med., 1994; 179: 973-984; Chou et al., J. Neuroimmunol., 1992; 38: 105-114; Allegretta et al., Science, 1990; 247: 718-721). Estas células T reactivas a MBP producen citoquinas Th1 proinflamatorias (IL-2, TNF- α e interferón- γ) y se cree que facilitan la inflamación destructora de mielina en el sistema nervioso central (Sharief et al., N. Engl. J. Med., 1991; 325: 467-472; Selmaj et al., J. Clin. Invest., 1991; 87: 949-954). Se ha observado que las células T reactivas a MBP pueden inducir la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal para MS (Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol., 1981; 11: 195-204). EAE también se puede prevenir o curar mediante inoculaciones repetidas con células T reactivas a MBP que han sido inactivadas mediante tratamiento químico o radiación, un procedimiento de tratamiento denominado vacunación de células T (Ben-Nun et al., Nature, 1981; 292: 60-61). Se ha demostrado que la vacunación de células T induce a respuestas inmunes reguladoras comprendidas de células T anti-idiotípicas y células T anti-ergotípicas, que contribuyen a los efectos del tratamiento sobre EAE y otros modelos de enfermedades autoinmunes experimentales (Lider et al., Science, 1988; 239: 820-822; Lohse et al., Science, 1989; 244: 820-822).

[0002] La vacunación de células T ha avanzado recientemente a pruebas clínicas en pacientes con MS en base a la hipótesis que el agotamiento de células T reactivas a MBP puede mejorar la evolución clínica de la enfermedad. En una prueba clínica piloto, se demostró que la vacunación con clones de células T reactivas a MBP autólogas irradiadas produjo respuestas de células T citolíticas CD8+ que reconocían específicamente y lisaban células T reactivas a MBP utilizadas para la vacunación (Zhang et al., Science, 1993; 261: 1451-1454, Medear et al., Lancet 1995: 346; 807-808). Tres inoculaciones subcutáneas con clones de células T reactivas a MBP irradiadas dieron lugar al agotamiento de las células T reactivas a MBP circulantes en pacientes con MS. El agotamiento de células T reactivas a MBP mediante la vacunación de células T parecía estar correlacionada con una mejora clínica, tal como se pone de manifiesto mediante la reducción en la tasa de reincidencia, la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS) y actividades de lesiones por MRI en pacientes con reincidencia-remisión (Medaer et al., 1995). Aunque no se podían sacar conclusiones a partir de la prueba piloto debido al número limitado de pacientes con MS estudiados, el excelente perfil de seguridad y el potencial beneficio clínico animó a realizar más investigaciones clínicas. Esta prueba clínica preliminar se llevó a cabo para investigar si el agotamiento de células T reactivas a MBP circulantes serían beneficiosas clínicamente para pacientes con MS.

40 **Descripción resumida de la invención**

[0003] La presente invención está dirigida a procedimientos para producir vacunas de células T autólogas y a la utilización de una vacuna de células T autólogas en la fabricación de un medicamento, tal como se indica en las reivindicaciones.

45 [0004] También se describe en este documento una vacuna de células T autólogas.

[0005] En particular, se describe una vacuna de células T autólogas preparada mediante un procedimiento denominado el procedimiento de expansión directa (DEM) que proporciona un procedimiento más rápido, sencillo y rentable para preparar una vacuna de células T. El procedimiento de expansión directa es el procedimiento preferido para la producción de vacunas cuando las células T, que han sido identificadas por ser reactivas con la proteína de mielina o fragmentos de la misma, tienen un índice de estimulación (S.I.) de 5 o superior. El procedimiento de expansión directa comprende la obtención a partir de un paciente con MS a tratar de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) o células mononucleares del fluido cerebroespinal de un paciente (CSFMCs). A continuación, las PBMCs o CSFMCs obtenidas del paciente se incuban en presencia de un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, tal como la proteína básica de mielina (MBP) o uno o más fragmentos inmunogénicos de MBP. Otros antígenos asociados con la esclerosis múltiple útiles en la realización de la presente invención incluyen lipoproteína de proteolípido de mielina, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina y glatirámer, y fragmentos de los mismos. En un ejemplo más preferido, el fragmento inmunogénico o fragmentos de MBP son fragmentos inmunodominantes. Los fragmentos de MBP más preferidos incluyen un fragmento que corresponde a los aminoácidos 83-99 de MBP y un fragmento que corresponde a los aminoácidos 151-170 de MBP. Las células también se pueden incubar sin considerar los antígenos y/o fragmentos de los mismos relacionados con la esclerosis múltiple. Después de la incubación con MBP o fragmentos de la misma, las PBMCs o CSFMCs se incuban de nuevo a continuación con MBP y/o fragmento de la misma en presencia de células presentadoras de antígeno (APCs). Las células presentadoras de antígeno preferidas para su uso en la realización de la presente invención incluyen PBMCs irradiadas obtenidas del paciente. Las células tratadas de este modo se someten a continuación a ciclos de estimulación alternativos con un mitógeno, preferiblemente fitohemaglutinina e IL-2. Entre

otras moléculas mitogénicas útiles en el proceso de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, concanavalina A y mitógeno de la hierba carmín. Otras moléculas mitogénicas útiles en la realización de la presente invención incluyen anticuerpos para receptores de la superficie de células T, tales como un anticuerpo monoclonal para CD3. Los ciclos de estimulación alternativa se pueden repetir una o más veces.

5 [0006] También se describen procedimientos para tratar MS utilizando vacunas de células T autólogas. Dichos procedimientos no se reivindican en el presente documento. El procedimiento comprende la administración a un paciente con necesidad de la misma, de una dosis eficaz de una vacuna de células T autólogas. Las dosis preferidas comprenden desde aproximadamente 40×10^6 a aproximadamente 80×10^6 células. La vacuna se puede administrar mediante cualquiera de una serie de vías de administración incluyendo, pero sin limitarse a, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. La inyección subcutánea es la vía de administración preferida de la vacuna. Una dosis eficaz es la dosis necesaria para dar lugar a un descenso en el número o frecuencia de precursor de células T reactivas a mielina en la circulación del paciente. Otros indicios de eficacia incluyen alteraciones en la causa clínica de la enfermedad medida mediante criterios ampliamente conocidos que incluyen un descenso en EDSS o mediante la prevención del aumento en EDSS o mediante el retraso en la progresión de EDSS. Otros indicios de eficacia incluyen la reducción en la velocidad de exacerbación clínica o una estabilización o una reducción en el tamaño de las lesiones cerebrales según se detecta mediante MRI u otras metodologías de diagnóstico.

20 [0007] De manera análoga también se describen procedimientos para tratar la artritis reumatoide utilizando las vacunas de células T preparadas tal como se describe en el presente documento.

25 [0008] Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para producir una vacuna de células T autólogas mediante el "procedimiento de clonación". Éste es preferible cuando las células T que han sido identificadas por ser reactivas con uno o más fragmentos de la proteína de mielina, tienen un índice de estimulación por debajo de 5.

30 [0009] El procedimiento de clonación comprende la identificación de líneas de células T reactivas a MBP o lipoproteína de proteolípido de mielina, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, glatirámer y/o fragmentos de cualquiera de los anteriores tal como se describe en este documento. Las líneas de células T que tienen un S.I. inferior a 5 se clonan mediante dilución limitante. El procedimiento comprende la obtención de células T reactivas con MBP y/o fragmentos de la misma mediante la incubación de PBMCs o CSFMCs con MBP o fragmentos de la misma (preferiblemente fragmentos que corresponden a los aminoácidos 83-99 y 151-170) durante 7 días sin cambio de medio. Aproximadamente el 50% de todos los pocillos se dividen por igual en dos pocillos (pocillo con antígeno y pocillo de control). Las células de ambos grupos de pocillos se incuban con APCs (PBMCs recientes o descongeladas irradiadas) en medio que contenía suero AB⁺ humano al 5% v/v, mientras que los pocillos con antígeno reciben MBP o fragmentos de la misma tal como se ha descrito anteriormente. El índice de estimulación (S.I.) se determina utilizando un ensayo de proliferación de incorporación de [³H] timidina tal como se describe en el presente documento. Los pocillos que contienen antígeno y que tienen un S.I. inferior a 5 se clonan a continuación utilizando dilución limitante donde las células reactivas a la línea de células T se agrupan, diluyen y cultivan en pocillos a una densidad de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 células por pocillo en un medio de recubrimiento de suero AB⁺ humano al 10%, y una interleuquina, preferiblemente interleuquina 2 junto con lectina, preferiblemente fitohemaglutinina (PHA) y con APCs. A continuación, se cambia el medio de cultivo cada tres a cuatro días por un medio que contiene IL-2. Después de aproximadamente 14 días, el S.I. de las células se ensaya de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células se expanden mediante ciclos de estimulación alternativos con MBP (o fragmentos de la misma) y PHA.

50 [0010] También se describe en el presente documento una vacuna de células T autólogas útil en el tratamiento de otros trastornos asociados con células T, tales como la artritis reumatoide. La preparación y la utilización de dichas vacunas de células T es análoga a la preparación y utilización de las vacunas de células T autólogas descritas anteriormente para el tratamiento de MS. Sin embargo, la fuente inicial de células T es el fluido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo, a diferencia de la preparación de la vacuna para MS, las células T derivadas del fluido sinovial se someten a estimulación mediante PHA; anticuerpo monoclonal para CD3 u otros mitógenos y no se someten a estimulación con antígenos asociados con MS.

55 **Breve descripción de los dibujos**

60 [0011] La figura 1 ilustra los cambios en la frecuencia estimada de precursor de células T reactivas a MBP circulantes antes y después de la vacunación. La frecuencia de precursor se estimó en todos los pacientes antes y 2-3 meses después de completar los protocolos de vacunación.

Descripción detallada de la invención

65 [0012] Aunque las células T reactivas a MBP experimentan *in vivo* una activación y expansión clonal y expresan un uso limitado del gen V del receptor de células T en un individuo determinado, los receptores de células T de células T reactivas a MBP son muy diversas y varían entre diferentes pacientes con MS (Vandevyver et al., Eur. J. Immunol.,

1995; 25: 958-968, Wucherpfennig et al., J. Immunol., 1994; 152: 5581-5592; Hong et al., J. Immunol. 1999; 163: 3530-3538). Por lo tanto, la estrategia actual para agotar de manera eficaz las células T reactivas a MBP en pacientes con MS requiere la individualización del tratamiento. La presente invención proporciona dicho tratamiento individualizado y tiene en cuenta la diversidad de células T en un paciente para proporcionar una vacuna con una duración más larga y eficaz.

[0013] De acuerdo con los estudios previos (Zhang et al., J. Immunol., 1993; 164: 4011-4017, Medaer et al., 1995), los datos de la presente invención confirman que la vacunación con las propias células T reactivas a MBP proporciona un medio consistente y potente de inmunización de pacientes para agotar las células T reactivas a MBP circulantes. Aunque el mecanismo que subyace en la regulación inmune inducida por la vacunación con células T no está completamente descifrado, está cada vez más claro que la vacunación con células T puede actuar en múltiples mecanismos reguladores para inducir respuestas de células T CD8+ antiidiotípicas (Zhang et al., 1993, Zhang et al., 1995) y la desviación inmune Th2 (Zhang et al., 2000). En particular, se observó que estas células T antiidiotípicas inducidas por la vacunación con células T lisaban las células T inmunizantes en reconocimiento de las regiones variables de las células T en reconocimiento de las regiones variables de los receptores de las células T, que representan la regulación inmune dominante responsable del agotamiento de células T reactivas a MBP (Zhang et al., 2000). Es concebible que estas respuestas reguladoras inducidas por la vacunación con células T contribuyan de manera potencial al efecto beneficioso de la vacunación de células T en MS.

[0014] Aunque existe una evidencia indirecta que sugiere la potencial asociación de células T reactivas a mielina con los procesos de la enfermedad en MS (Zhang et al., 1994, Chou et al., 1992; Allegretta et al., 1990), ha sido difícil establecer o rechazar el papel de las células T reactivas a mielina en la patogénesis de la MS. En este aspecto, la vacunación con células T proporciona una única oportunidad para evaluar si el agotamiento de células T reactivas a mielina tiene un impacto beneficioso en la evolución clínica de la MS.

[0015] Los ejemplos descritos en la presente invención describen el uso de una vacuna de células T autólogas preparada mediante un método de selección clonal para el tratamiento de MS y una vacuna de células T autólogas preparada mediante el método de expansión directa. Los datos presentados en la presente invención muestran una correlación favorable de la vacunación con células T con variables clínicas mejoradas. En primer lugar, los resultados indican que el agotamiento de células T reactivas a MBP coincidía con un mayor tiempo en la progresión de cohortes tanto de reincidencia-remisión como SP-MS en comparación con la historia natural de MS y una vacuna de células T autólogas preparada por el método de expansión deseado. Sin embargo, debe indicarse que se observó una tendencia para una progresión acelerada en algunos pacientes 12 meses después de la última inyección. La significancia de esta aparente progresión acelerada es desconocida, pero puede estar asociada con el descenso gradual de la inmunidad inducida inicialmente por la vacunación con células T contra células T reactivas a MBP. De hecho, en aproximadamente el 10-12% de los pacientes inmunizados, las células T reactivas a MBP reaparecieron alrededor de ese tiempo, apoyando esta posibilidad. En algunos casos, la reaparición de células T reactivas a MBP se originó de diferentes poblaciones clonales que no se detectaron antes de la vacunación, lo cual ya se observó en los estudios previos (Zhang et al., 1995). Los descubrimientos sugieren que las células T reactivas a MBP experimentan un desplazamiento clonal o extensión del epítipo (Touhy et al., J. Exp. Med., 1999; 189: 1033) asociados potencialmente con los procesos en marcha de la enfermedad. Esta observación sugiere que pueden ser necesarias inyecciones de estimulación adicionales con los mismos clones de células T o de aparición reciente para mantener la inmunidad adecuada. Esto también sugiere que puede ser útil para proporcionar una vacuna de células T que es policlonal en origen, tal como la proporcionada mediante el método de expansión directa descrito en la presente invención para evitar problemas con el desplazamiento clonal o extensión del epítipo, debido a que el grupo de epítopos patentados que pueden ser reconocidos por dicha vacuna es mayor que un grupo reconocido por una población clonada.

[0016] Los exámenes anuales de MRI de pacientes tratados con las vacunas de células T descritas en el presente documento revelaron una ligera reducción en las actividades de lesiones por MRI en el primer año y sólo un incremento del 3,3% en el segundo año. Los descubrimientos mediante MRI pueden sugerir una estabilización significativa en pacientes tratados con la vacunación con células T. El descubrimiento mediante MRI es consistente con el retraso inicial en el tiempo de progresión que a continuación se aceleró aparentemente en el segundo año, reforzando la posibilidad de que el efecto inicial de la vacunación con células T había disminuido en el segundo año.

[0017] Los procedimientos descritos en el presente documento también dieron lugar a cambios favorables en otras variables clínicas, incluyendo la tasa anual de reincidencia y EDSS en pacientes vacunados, sugiriendo un efecto beneficioso de la vacunación con células T en la evolución clínica de MS. Los resultados del estudio son ampliamente consistentes con los descubrimientos descritos en la prueba clínica piloto (Medaer et al., 1995). Sin embargo, a diferencia de otras variables clínicas, el impacto de la vacunación con células T sobre la discapacidad clínica mediada mediante la EDSS era mínimo en ambos grupos de estudio. Puede reflejar la falta de sensibilidad de la EDSS para medir los cambios sobre un periodo de tiempo relativamente corto (24 meses). Existe también la posibilidad de que incluso después de eliminar o suprimir el componente autoinmune mediante la vacunación de células T, las lesiones inflamatorias puedan tardar aún mucho tiempo en curarse y parte del daño en el tejido existente permanecerá. A la vista de estos resultados, la presente invención proporciona la preparación de vacunas de células T autólogas para el tratamiento de MS.

[0018] Debería indicarse que los resultados clínicos descritos en la presente invención se compararon con el propio estado de pretratamiento del paciente, así como con una estimación de la historia natural de MS tal como se documenta en pruebas previas de MS y no con controles placebo. El estudio también está limitado por el potencial efecto del placebo asociado con el diseño clínico de etiqueta abierta del estudio. Por lo tanto, aunque el estudio proporcionó importantes indicaciones clínicas a favor del papel de la vacunación con células T en MS, la eficacia del tratamiento de la vacunación con células T se evalúa mejor en pruebas clínicas de doble ciego y controladas por placebo.

[0019] La presente invención proporciona nuevos procedimientos para la preparación de vacunas de células T autólogas que son más fáciles de preparar que las vacunas de células T anteriores y que proporcionan una población heteróloga de células (no clonales) que pueden actuar conjuntamente para proporcionar una respuesta inmunológica mejorada en pacientes, y para evitar los problemas potenciales con la extensión de epítipo o desplazamiento clonal, y que se diseña para eliminar mejor una mayor diversidad de células T responsables de la enfermedad.

Ejemplo 1

Estimación de la frecuencia de células T reactivas a MBP en la sangre de pacientes con MS

[0020] La frecuencia de las células T reactivas a MBP en la sangre de pacientes con MS se estimó utilizando procedimientos descritos por Zhang et al., 1994, Zhang et al., 1993, Medaer et al., 1995. En cada caso, el material utilizado para el procesado celular y el cultivo celular era estrictamente autólogo. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de sangre venosa heparinizada mediante la separación por gradiente de Ficoll. Las PBMCs se sacaron de las placas a 200.000 células/pocillo (para un total de 96 pocillos) en RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UTA) complementado con suero autólogo inactivado por el calor al 10% y 50 IU/ml de interleuquina-2 (IL-2) recombinante, en presencia de dos péptidos sintéticos de proteína mielina básica (MBP) humana correspondiente a dos regiones inmunodominantes (residuos de aminoácidos 83-99 y 151-170, Tejada-Simon et al., Eur. J. Immunol, 2001, Mar; 31(3) 907-917, respectivamente, a una concentración de 20 µg/ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C. Siete días más tarde, todos los cultivos se reestimularon con PBMCs autólogas irradiadas con pulsos (congeladas o naturales). El co-cultivo ("pulsing") de PBMCs se llevó a cabo mediante la incubación de cada péptido PBMCs a una concentración de 100 µg/ml a 37°C durante tres horas seguido de radiación con una fuente de ⁶⁰Co a 4.000 rads antes de su uso. Después de otra semana de incubación, en cada cultivo se examinó la proliferación específica en respuesta a los péptidos MBP en ensayos de proliferación descritos a continuación.

[0021] Brevemente, cada pocillo se dividió en cuatro alícuotas (aproximadamente 10⁴ células por alícuota) y se cultivaron por duplicado con 10⁵ PBMCs autólogas irradiadas con pulsos en presencia y ausencia (controles) de los péptidos MBP descritos anteriormente. Los cultivos se incubaron durante tres días y se pulsaron con [³H]-timidina (Amersham, Arlington Heights, IL) a 1 µCi por pocillo durante las últimas 16 horas de cultivo. A continuación, las células se recogieron utilizando un recogedor de células automatizado y se midió la incorporación de [³H]-timidina en un contador de placas beta. Las células se definieron como reactivas para los péptidos MBP cuando el recuento por minuto de ³H-timidina incorporada en las células fue superior a 1.500 y superaban el recuento por minuto de control (en ausencia de péptidos) mediante por lo menos tres veces. A continuación, se estimó la frecuencia de células T reactivas a MBP dividiendo el número de pocillos que muestran reactividad entre el número total de PBMCs (19,2 x 10⁶ células) sembradas en el cultivo inicial (véase, por ejemplo, Zhang et al., 1994, Zhang et al., 1993, Medaer et al., 1995). El mismo método de cálculo se utilizó de manera consistente para comparar los cambios de frecuencia de células T reactivas a MBP a lo largo del estudio.

[0022] Tal como se muestra en la figura 1, la frecuencia de células T reactivas a MBP circulantes detectadas en estos pacientes con MS fue aproximadamente 14 x 10⁻⁵ que es comparable con la frecuencia de aproximadamente 10 x 10⁻⁵ descrita por Zhang et al., (1994), y Ota et al., Nature, 346: 183-187 (1990) (Véase también el ejemplo 5).

Ejemplo 2

La generación de células T reactivas a mielina para la preparación de PBMC para la vacunación con células T y la estimulación primaria

[0023] Se procesaron muestras de sangre recién extraídas en 2 horas de recogida. Alternativamente, se pueden obtener células monoclonales del fluido cerebroespinal (CSFMCs) de pacientes con MS. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de la sangre completa mediante el método de separación estándar del gradiente de Ficoll. Específicamente, la sangre heparinizada se diluyó con una solución equilibrada de Hanks (HBSS) (1:1 sangre/HBSS) y, a continuación, se depositó lentamente sobre la solución de Ficoll-hypaque en un tubo de centrifugación y se centrifugó durante 20 minutos a 1800 rpm, 18°C a 25°C, sin descanso. A continuación, las PBMCs se lavaron mediante la adición de HBSS en exceso y se centrifugaron a 1700 rpm durante 10 minutos a 18°C a 25°C. Las PBMCs purificadas se lavaron tres veces en medio RPMI 1640 mediante centrifugación y,

posteriormente, se volvieron a suspender en medio AIM V (Gibco, Grand Island, N.Y.). Se contó el número de células y se sacaron de las placas y se pudieron en placas de cultivo con base en forma de U de 96 pocillos a la concentración de 200.000 células/pocillo. Todas las placas se marcaron con el número y las iniciales del paciente. Los péptidos de mielina descritos en el Ejemplo 1 se añadieron al cultivo en 20 µg/ml, respectivamente. Las placas se colocaron en un incubador de CO₂ y se inspeccionaron diariamente de manera visual. Las células se cultivaron durante siete (7) días sin cambiar el medio de cultivo para desarrollar de manera selectiva las células T específicas del péptido.

Identificación y selección de líneas de células T específicas de péptidos MBP

[0024] Se extrajeron aproximadamente el 50% de las células de todos los pocillos y se dividieron por igual en dos pocillos (pocillos de antígeno y control). Las PBMCs recién extraídas o congeladas se irradiaron a 8.000 (utilizando una fuente de ⁶⁰Co) rads y se utilizaron a razón de 100.000 células/pocillo como fuente de células presentadoras de antígenos (APC). Las células se cultivaron en RPMI 1640 que contenía suero AB+ humanos al 5%. Los péptidos de mielina descritos en el Ejemplo 1 anterior se añadieron a razón de 20 µg/ml, respectivamente, a los pocillos de antígeno. El medio sin péptidos de mielina se añadió a los pocillos de control apareados. Alternativamente, se pueden utilizar otros antígenos relacionados con la esclerosis múltiple, es decir, antígenos de mielina y/o fragmentos de los mismos, incluyendo aquellos descritos por Markovic-Plese et al., J. Immunol., (1995), 982-992 (epítomos de proteína proteolípido); Genain et al., J. Clin. Invest. (1995), 2966-2974; Kerlero de Rosbo et al., J. Clin. Invest. (1993) 92: 2602-2608; Trotter et al., J. Neuroimmunol., (1998) 84: 172-178 u Trotter et al., J. Neuroimmunol. (1997) 75:95 (proteína proteolípido de mielina); Linder et al., Brain, (1999) 122: 2089 (glicoproteína de mielina del oligodendrocito); y Johnson et al., Neurol. (1995) 45: 1264 ([copolímero 1] de glatirámer). También se contempla mediante la presente invención la utilización de la combinación de los antígenos y/o fragmentos de los mismos anteriores.

[0025] A continuación, las células se recogieron utilizando un recoger de células automatizado y se midió la incorporación de [³H] timidina en un contador de placas Beta. La reactividad de cada línea de células T/pocillo al correspondiente péptido de mielina se determinó mediante el ensayo de proliferación de la incorporación de [³H] timidina. De manera específica, las células de cada pocillo se dividieron en cuatro alícuotas (~10⁴ células por alícuota) y se cultivaron con 10⁵ PBMCs autólogas irradiadas como fuente de APC en presencia y ausencia de los péptidos de mielina en los duplicados. Los cultivos se incubaron durante 3 días y se pulsaron con [³H] timidina a razón de 1 µCi/pocillo durante las últimas 16 horas del cultivo. Se define que una línea de células T es específica de péptido de mielina cuando el cociente entre los recuentos por minutos (cpm) del pocillo con antígeno y los cpm del pocillo de control es superior o igual a tres; y los cpm totales del pocillo con antígeno es superior a 1.500. La frecuencia de las células T reactivas a mielina se estimó según la estadística de Poisson. El 50% de células restantes de las líneas de células T reactivas a mielina identificadas se vuelven a estimular para la expansión con PBMCs irradiadas.

Expansión y establecimiento de líneas de células T/clones seleccionados.

[0026] Después de identificar una línea de célula T como reactiva de péptido de mielina y posteriormente estimulada de nuevo durante una vez, se propaga adicionalmente para producir suficientes células para la vacunación utilizando uno de los siguientes procedimientos: procedimiento de expansión directa y procedimiento de clonación de T. La selección del procedimiento de propagación depende de la especificidad y reactividad de las líneas de células T a los péptidos de mielina. Estas propiedades se miden mediante el Índice de Estimulación (SI) que se calcula a partir de los resultados del ensayo de proliferación de la incorporación de [³H] timidina descrito anteriormente. El SI es el cociente entre los recuentos por minuto (cpm) de los pocillos con antígeno y los cpm de los pocillos de control. Cuando el SI es 5 o superior, se utiliza el procedimiento de expansión directa. Cuando el SI está por debajo de 5, se utiliza el procedimiento de clonación.

Procedimiento de expansión directa

[0027] Brevemente, las células T reactivas a mielina identificadas que tenían un S.I. de 5 o superior, se expandieron a continuación mediante ciclos de estimulación alternativos del procedimiento de expansión directa (DEM) con los correspondientes péptidos de mielina y PHA en presencia de PBMCs autólogas irradiadas. Cada ciclo de estimulación se llevó a cabo durante 7-10 días. De manera más específica, las células T reactivas a mielina identificadas tal como se describe anteriormente, se pusieron en placas a razón de 20.000-40.000 células por pocillo en presencia de PBMCs irradiadas (APCs) (100.000 células por pocillo). Los péptidos de mielina correspondientes se añadieron a 20 µg/ml para el ciclo de estimulación de antígenos y se añadió PHA a 1 µg/ml para cada ciclo de estimulación de PHA. También se añadió IL-2 humana recombinante a razón de 100 IU/ml en el segundo día del ciclo de estimulación. Los cultivos se renovaron cada tres o cuatro días con medio RPMI 1640 que contenía suero AB+ humano al 10% y 100 IU/ml de rIL-2. Las líneas de células T reactivas a mielina se propagaron en ciclos de estimulación alternativos hasta que el número de células totales alcanzó aproximadamente los 20 millones.

Reactividad de líneas de células T preparadas mediante DEM**[0028]**

Línea de célula T	Antígeno	Ronda de expansión	CPM Ag/control	S.I.	Número de células (10^6)
3E5	MBP83-99	0	2.399/410	5,8	0,2
	MBP83-99	1	6.991/2.021	3,4	3,4
	PHA	2	5.804/1.266	4,5	23,5
2C9	MBP83-99	0	4.421/312	14	0,16
	MBP83-99	1	8.220/1.882	4,3	4,2
	PHA	2	10.221/3.142	3,2	21,4

5 **[0029]** En el procedimiento de clonación, las líneas de células T se clonaron utilizando ensayos de dilución limitante. Las células de cada línea de células T reactivas a mielina se agruparon y se sembraron a una razón de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 células/pocillo en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía suero AB+ humano al 10% y rIL-2 en 100 IU/ml. Se añadió PHA en 1 μ g/ml y se añadieron APC autólogas irradiadas a razón de 100.000 células/pocillo. El medio de cultivo, RPMI 1640 que contenía rIL-2 en 100 IU/ml, se cambió cada tres o
10 cuatro días. Después de 14 días de cultivo, se ensayaron los pocillos positivos en el crecimiento para determinar su reactividad específica a los péptidos de mielina correspondientes tal como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo una expansión adicional de estas líneas de células T específicas de péptido siguiendo el procedimiento de expansión directa descrito anteriormente en ciclos de estimulación alternativos con los correspondientes péptidos de mielina y PHA.

Ejemplo 3***El agotamiento de células T reactivas a MBP mediante la vacunación con células T***

20 **[0030]** Se reclutaron cincuenta y cuatro pacientes con RR-MS (n = 28) y SP-MS (n = 26) para este estudio de etiqueta abierta. Las características clínicas de base de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Cada paciente recibió tres serie de inyecciones subcutáneas con clones de células T reactivas a MBP autólogas irradiadas (preparados mediante el procedimiento de clonación) en intervalos de dos meses preparadas tal como se ha descrito anteriormente. A los pacientes se les hizo un control para los cambios en la frecuencia de precursor de células T reactivas a MBP, tasa de reincidencia, EDSS y actividades de lesiones por MRI durante un periodo de 24
25 meses. Los resultados se compararon con los valores antes de la vacunación en una manera autoapareada. Además, los datos clínicos de los brazos placebo de RR-MS en la prueba clínica de beta-interferón 1a (Jacobs et al., 1996) y SP-MS en un estudio reciente de beta-IFN (European Study Group, Lancet, 352: 1491-1497 (1998)) se incluyeron para proporcionar datos de la historia natural de MS para la comparación. Las características de base de los sujetos de control con placebo descritas en los estudios fueron similares a las de la población de pacientes estudiados aquí con la excepción de una EDSS media inferior.

35 **[0031]** Tal como se muestra en la figura 1 y se describe brevemente en el ejemplo 1, la frecuencia de precursor de células T reactivas a MBP circulantes detectadas de base en estos pacientes con MS (14×10^{-5}) fue altamente comparable con la descrita en estudios previos (aproximadamente 10×10^{-5} en células mononucleares de sangre periférica) (Zhang et al., 1994, Ota et al., 1990). No se observó una diferencia significativa en la frecuencia de precursor de células T reactivas a MBP entre cohortes con RR-MS y SP-MS. La frecuencia de células T era indetectable en el 92% de los pacientes o disminuía sustancialmente en los pacientes restantes 2-3 meses después de completar las tres series de vacunas (14×10^{-5} vs. $1,9 \times 10^{-5}$, $p < 0,0001$). Los resultados confirmaron el
40 agotamiento de células T reactivas a MBP mediante la vacunación con células T en pacientes con MS.

Ejemplo 4***Vacunación de paciente con MS utilizando células T reactivas a MBP autólogas***

45 **[0032]** Se apuntaron cincuenta y cuatro pacientes con MS para esta prueba. Los criterios de inclusión fueron una MS clínicamente definida durante por lo menos dos años, una escala expandida del estado de discapacidad (EDSS) base de 1,5 a 6,5 para RR-MS y de 4,0 a 8,0 para pacientes con una MS secundaria progresiva (SP-MS) y por lo menos una exacerbación en los últimos dos años antes de la entrada en el estudio para la cohorte de MS de
50 reincidencia-remisión (RR-MS). Aproximadamente el 25% de los pacientes no consiguieron previamente responder a o tolerar el tratamiento con beta-interferón o glatirámer, y los pacientes restantes no fueron tratados con estos agentes por lo menos un mes antes de la entrada y a lo largo del estudio. Los pacientes no tomaron ningún fármaco inmunosupresor, incluyendo esteroides, por lo menos tres meses antes de apuntarse al estudio. Los esteroides fueron permitidos durante el estudio si tenía lugar una exacerbación. No se prohibieron tratamientos sintomáticos para fatiga, espasticidad y dolores de vejiga. Se obtuvo el consentimiento por escrito de los pacientes después de
55 explicar los procedimientos experimentales. El protocolo fue aprobado por el Institutional Human Subject Committee

del Baylor College of Medicine.

[0033] El protocolo de vacunación fue similar al utilizado en estudios clínicos previos (Zhang et al., 1993, Medaer et al., 1995). Brevemente, los clones de células T reactivas a MBP preparados mediante el procedimiento de clonación descrito anteriormente se activaron previamente con fitohemaglutinina (PHA) (1 µg/ml) en presencia de PBMCs irradiadas como fuente de células accesorias. A continuación, las células se cultivaron durante 5-6 días en medio RPMI 1640 complementado con suero autólogo inactivado por calor al 10% y 50 unidades de rIL-2. Las células T reactivas a MBP activadas se lavaron posteriormente tres veces con solución salina estéril para eliminar la PHA residual y la debris celular. Después de radiación (8.000 rads, fuente de ⁶⁰Co), las células se resuspendieron en 2 ml de solución salina y se inyectaron subcutáneamente en dos brazos (1 ml/brazo). El número de células T utilizadas para la vacunación varió desde 40 x 10⁶ a 80 x 10⁶ células por inyección y se eligió mediante extrapolación de dosis eficaces de células T en animales experimentales en base a las áreas superficiales relativas de piel (Ben-Nun et al., 1981). Cada paciente recibió tres inyecciones subcutáneas en intervalos de dos meses.

[0034] A continuación, se observó en los pacientes el tiempo para el inicio de la progresión confirmada de la discapacidad, EDSS, tasa de reincidencia y actividades de lesiones por MRI. Los resultados se compararon con la evolución del propio paciente antes del tratamiento, así como con los brazos placebo de dos pruebas clínicas recientes en pacientes con RR-MS y SP-MS, que sirvieron como una estimación de la historia natural de MS (Jacobs et al., 1996), European Study Group, 1998). El tiempo para la progresión se determinó mediante el aumento de por lo menos un 1,0 en el EDSS (Poser et al., 1983) que persistía durante por lo menos 2 meses. Las exacerbaciones en el estudio se definieron mediante la aparición de nuevos síntomas neurológicos o un empeoramiento de síntomas neurológicos preexistentes que duraban por lo menos 48 horas, acompañados por un cambio objetivo en el examen neurológico (empeoramiento de por lo menos 0,5 puntos en el EDSS). Se instruyó a los pacientes para que indicaran los sucesos entre las visitas regulares programadas y fueron examinados por un neurólogo si los síntomas sugerían una exacerbación. Las valoraciones de seguridad incluían sucesos adversos, signos vitales y exámenes físicos en las visitas regulares. Las diferencias en las variables clínicas en pacientes del estudio antes y después de la vacunación con células T se analizaron utilizando el test de la suma de los rangos de Wilcoxon.

Ejemplo 5

Alteración de la evolución clínica de MS después de la vacunación

[0035] Se realizaron intentos para saber si el agotamiento de células T reactivas a MBP circulantes mediante la vacunación con células T alteraría la evolución clínica de la MS. Los pacientes recibieron vacunas de células T autólogas preparadas tal como se ha descrito anteriormente. A excepción de eritemas leves y transitorios observados en el punto de inyección de algunos pacientes, no se asociaron efectos adversos con la vacunación con células T y todos los pacientes fueron tratados en un centro ambulatorio. Tal como se muestra en la Tabla 2, la EDSS media disminuyó ligeramente en pacientes con RR-MS (3,21 en la entrada vs. 3,1 a la salida) durante un periodo de 24 meses después de la vacunación. Por comparación, hubo un incremento de la EDSS media de 0,61 en la historia natural de RR-MS (n = 56) durante el mismo periodo de observación, tal como se describió en una prueba realizada utilizando un ensayo con beta-IFN-1a (Jacobs et al., 1996). Además, la proporción de los pacientes que no habían cambiado o mejorado la EDSS era considerablemente superior que la de los pacientes con la historia natural de MS (75% vs. 50%). Sólo un paciente (3,5%) en el grupo con RR-MS tratado había progresado en la EDSS más allá de 2,0 en 24 meses en comparación con el 18% de los pacientes en la historia natural de MS (Tabla 2).

[0036] En la cohorte de SP-MS, la EDSS media progresó ligeramente (+0,12) durante un periodo de 24 meses en comparación con +0,6 registrado en la historia natural de SP-MS (European Study Group, Lancet 1998; 352: 1492-1497). Además, la estimación de tiempo para confirmar la progresión utilizando el procedimiento de Kaplan-Meier mostró un retraso considerable (progresión del 20% en 18 meses para ambos grupos tratados) en comparación con la historia natural de pacientes con MS (progresión del 20% en 12 meses para RR-MS y 9 meses para SP-MS) (Jacobs et al., Ann. Neurol, 1996; 39: 285-294, European Study Group, 1998). Sin embargo, la progresión pareció acelerarse después de 18 meses (12 meses después de la última vacuna) en ambos grupos de estudio.

Ejemplo 6

Cambios en la tasa de exacerbación clínica

[0037] Tal como se muestra en la Tabla 3, la tasa anual de reincidencia disminuyó en pacientes con RR-MS después de la vacunación con células T, lo cual representa una reducción del 40% respecto a la tasa de reincidencia de base. No se pudieron observar diferencias significativas en la tasa de reincidencia entre el primer año y el segundo año de la prueba. Por comparación, se observó una reducción del 25% en la tasa anual de reincidencia en la historia natural de RR-MS (Jacobs et al., 19996). Además, la proporción de pacientes que no muestran un ataque o pocos ataques era considerablemente mayor que la de los pacientes en la historia natural de MS (tabla 3). Aunque la tasa de reincidencia disminuyó en un 50% en la cohorte SP-MS, sólo un pequeño número de los pacientes progresivos secundarios examinados aquí (6/26) habían reincidido durante los dos años antes de la entrada en el estudio.

Ejemplo 7**Actividades de lesiones cerebrales mediante el examen de obtención de imágenes por resonancia magnética**

5 **[0038]** La obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) se realizó como imágenes ponderadas en T2
 potenciadas con gadolinio. Las áreas de mayor intensidad de señal se valoraron de forma semicuantitativa
 (Scheltens et al, Brain, 1992; 115: 735-748, Truyen et al., J. Neurol. Sci., 1990; 96: 173-182). Este procedimiento de
 valoración produjo una puntuación relativa a tanto el tamaño como el número de focos de mayor hiperintensidad de
 10 señal. Las hiperintensidades de señal se valoraron en las siguientes regiones: (i) periventricular, en la región frontal
 y occipital y paralela a los ventrículos laterales; (ii) materia blanca lobar, de manera separada en las regiones frontal,
 temporal, parietal y occipital; (iii) los ganglios basales, núcleo caudado, putamen, el globo pálido y el tálamo y (iv) la
 15 región infratentorial, cerebelo, mesencéfalo, pons y médula. Las lesiones se valoraron de la siguiente manera: una
 lesión con un diámetro inferior a 0,5 cm se le dio una puntuación de "1", entre 0,5 cm y 1,0 cm como "2", entre 1,0
 cm y 1,5 cm como "3", entre 1,5 cm y 2,0 cm como "4" y más de 2,0 cm como "5". Las lesiones confluyentes se
 midieron de la siguiente manera: se da una puntuación de "5" cuando menos de un 25% de la región de interés tal
 como se ha definido anteriormente se consideraba de intensidad de señal anormal, "10" y "15" para el 25% y el 50%
 cuando más del 50% de la región visualizada de interés estaba afectada. A continuación, estos valores se añadieron
 a las puntuaciones de lesiones "individuales".

20 **[0039]** Estos exámenes de MRI ponderadas en T2 potenciadas con gadolinio se realizaron en la entrada (base), a
 los 12 meses y a la salida (24 meses) para controlar los cambios en las actividades de las lesiones cerebrales como
 un índice de la progresión de la enfermedad. Debido a la incompatibilidad técnica de algunos barridos realizados en
 diferentes centros médicos, se pudieron analizar los barridos de MRI de únicamente 34 pacientes. Todos los
 barridos de MRI se evaluaron por un neuroradiólogo externo que no estaba implicado en la prueba clínica. Para
 25 evaluar la actividad de la lesión se utilizaron un procedimiento de valoración semicuantitativo utilizado previamente
 en nuestra prueba clínica piloto y otros estudios relacionados (Medaer et al., 1995; Scheltens et al., 1992; Truyen et
 al., 1990). Este procedimiento de valoración produjo una puntuación en relación tanto al tamaño como al número de
 focos con mayor hiperintensidad de señal de imágenes ponderadas en T2. Tal como se muestra en la Tabla 4, los
 30 resultados revelaron que en un 70% de los pacientes examinados las puntuaciones de las lesiones de MRI fueron
 invariables o mejoradas tal como se define mediante la reducción de por lo menos un punto en la puntuación de la
 lesión, mientras que el 30% de pacientes restantes tuvieron mayores puntuaciones de las lesiones durante el
 transcurso del estudio. Como grupo, los cambios en la puntuación de la lesión por MRI promedio representaron una
 reducción de un 1,2% en el primer año y un aumento del 3,3% desde la MRI base en el segundo año. Los cambios,
 sin embargo, no fueron significativos ($p > 0,4$).

35 **[0040]** Los resultados pueden reflejar la estabilización o cierta mejora atribuible a la vacunación con células T, ya
 que las lesiones por MRI progresan generalmente en aproximadamente un 10% en una base anual en paciente con
 RR-MS no tratado tal como se documenta en pruebas clínicas previas (European Study Group, 1998, IFNB Multiple
 Sclerosis Study Group, Neurol., 1993; 43: 655-661). Tomados en conjunto, los descubrimientos sugieren una
 40 correlación favorable entre el agotamiento de células T reactivas a MBP por una vacunación con células T y la
 mejora clínica en pacientes con MS examinados.

45 **[0041]** La presente invención se ha descrito mediante ejemplos no limitantes y mediante realizaciones preferidas,
 que no pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se establece en las reivindicaciones que se
 acompañan.

TABLA 1
 Características clínicas del pretratamiento de los pacientes

Grupo de pacientes	# de casos	Edad media	Hombre/Mujer	Duración (años)	EDSS en la entrada	Tasa de reincidencia
Grupo de estudio						
RR-MS	28	45 ± 9,7	13/15	7,4 ± 7,3	3,2 ± 2,1	1,25
SP-MS	26	49 ± 8,1	10/16	15,5 ± 9,3	6,1 ± 0,9	
Historia natural de MS						
RR-MS ^a	143	36,9 ± 0,05	40/103	6,4 ± 0,5	2,3 ± 0,07	1,2
SP-MS ^b	358	40,9 ± 7,2	128/230	13,4 ± 7,5	5,2 ± 1,1	

^a Grupo de control con placebo del ensayo con beta-IFN-1a.

^b Grupo de control con placebo del ensayo con beta-IFN-1b.

TABLA 2

Cantidad de cambio prolongado en EDSS en 2 años

Grupo de pacientes	Cambio	EDSS	# de casos	Percentil
Grupo de estudio RR-MS (n=28)	Sin cambio	0,0	15	53,5
	Mejor	≥ 0,5	6	21,4
		> 1,0	2	7,1
	Peor	0,5	4	14,2
		1,0	0	0
		1,5	0	0
	> 2,0	1	3,5	
Cambio de EDSS promedio ^a	-0,11			
SP-MS (n=26)	Sin cambio	0,0	12	46,1
	Mejor	≥ 0,5	4	15,3
		> 1,0	1	3,8
	Peor	0,5	5	19,2
		1,0	1	3,8
		1,5	1	3,8
	> 2,0	2	7,6	
Cambio de EDSS promedio	+0,12			
Historia natural RR-MS ^b (n=56)	Sin cambio	0,0	14	25
	Mejor	≥ 0,5	9	16,1
		> 1,0	5	8,9
	Peor	0,5	11	19,6
		1,0	4	7,1
		1,5	2	3,6
	> 2,0	10	17,9	
Cambio de EDSS promedio	+0,61			
SP-MS ^c (m=187)	Cambio de EDSS promedio	+0,60		

^a Cambio en EDSS en cada persona desde la base hasta el año 2. ^b Grupo de control con placebo del ensayo con beta-IFN-1a [7]. ^c Grupo de control con placebo del ensayo con beta-IFN-1b [5].

5

TABLA 3

Frecuencia de exacerbación clínica

Grupo de pacientes	Tasa de reincidencia anual	# de reincidencia	# de pacientes	Percentil
Grupo de estudio RR-MS (n=28)	1,25 (preestudio) 0,75 (24 meses)	0	11	39,2
		1	4	14,2
		2	5	17,8
		3	5	17,8
		≥ 4	3	10,7
Historia natural ^a de RR-MS (n=87)	1,2 (preestudio) 0,9 (24 meses)	0	23	26
		1	26	30
		2	10	11
		3	12	14
		≥ 4	16	17

^a Grupo de control con placebo del ensayo con la beta-IFN-1^a [7].

TABLA 4

Valoración promedio de la lesión por MRI mediante análisis semicuantitativo y el porcentaje del cambio de la MRI de base

Pacientes	Base	12 meses (% cambio)	24 meses (% cambio)
34 total	14,94	14,76 (-1,2%)	15,44 (+3,3%)
19/35 (55%)	Invariable		
10/34 (29%)	Aumenta en por lo menos un punto en la valoración de la lesión por MRI en 24 meses		
5/34 (14%)	Disminuye en por lo menos un punto en la valoración de la lesión por MRI en 24 meses		

5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la preparación de una vacuna de células T autólogas para el tratamiento de la esclerosis múltiple, comprendiendo el procedimiento:
- (a) la estimulación primaria *in vitro* de células T de un paciente a tratar con la vacuna con una combinación de fragmentos de uno o más antígenos asociados con la esclerosis múltiple,
 - (b) estimular las células T obtenidas en la etapa (a) con células presentadoras de antígenos (APC) y la combinación de fragmentos, y
 - 10 (c) repetir la etapa (b) una o más veces;
- en el que el antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que consiste en proteína básica de mielina, proteína de proteolípido y glicoproteína de oligodendrocitos de mielina.
- 15 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células T derivan de células mononucleares de sangre periférica del paciente.
- 3.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se añade IL-2 a las células T en una o más de las etapas (a), (b) y (c).
- 20 4.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las APC son células mononucleares de sangre periférica irradiadas del paciente.
- 5.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que uno o más de los fragmentos es un fragmento inmunogénico de proteína básica de mielina.
- 25 6.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además como última etapa la etapa de irradiar las células T.
- 30 7.- Utilización de una vacuna de células T autólogas en la fabricación de un medicamento para tratar la esclerosis múltiple en un paciente, que comprende la preparación de una vacuna de células T autólogas según el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 35 8.- Utilización, según la reivindicación 7, en la que el medicamento contiene una dosis eficaz de dicha vacuna de células T suficiente para reducir el número de células T reactivas a mielina en la circulación del paciente.

Figura 1

