

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 305**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/06** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2009 PCT/EP2009/054242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2016 WO2009132941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09737985 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2281032**

54 Título: **Células Tr1 para el tratamiento de una condición artrítica**

30 Prioridad:

**28.04.2008 EP 08305133**

**28.04.2008 US 48309 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.02.2017**

73 Titular/es:

**TXCELL (33.3%)**

**Les Cardoulines Allée de la Nertière Sophia  
Antipolis**

**06560 Valbonne, FR;**

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y**

**CENTRE HOSPITALIER REGIONAL**

**UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**FOUSSAT, ARNAUD;**

**BRUN, VALÉRIE;**

**ASNAGLI, HÉLÈNE;**

**BELMONTE, NATHALIE y**

**JORGENSEN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 599 305 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

Células Tr1 para el tratamiento de una condición artrítica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de una condición de la artritis. La presente invención se refiere a una población de células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

Antecedentes de la invención

Aproximadamente 46 millones de estadounidenses y 100 millones de europeos se ven afectados por la artritis y se prevé que estas cifras aumenten con el correr de los años.

10 La artritis reumatoide (AR) se caracteriza como un desequilibrio en el sistema inmune que causa una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleuquina 1 (IL-1), y una falta de citoquinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-10, IL-11. La AR se caracteriza por inflamación sinovial, que progresa hasta la destrucción del cartílago, la erosión ósea y la posterior deformidad de la articulación. Los principales  
15 síntomas de la AR son inflamación de las articulaciones, hinchazón, dificultad de movimiento y dolor. Durante el proceso inflamatorio, están implicadas células polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. Los linfocitos T activados producen citotoxinas y citoquinas proinflamatorias, mientras que los macrófagos estimulan la liberación de prostaglandinas y citotoxinas. Se liberan sustancias vasoactivas (histamina, quininas, y prostaglandinas) en el sitio de la inflamación y causan edema, calor, eritema, y dolor asociado con la inflamación de las articulaciones. En la etapa tardía de la AR, enzimas producidas por las células inflamadas pueden digerir el hueso y el cartílago. Los daños a largo plazo producen  
20 dolor crónico, pérdida de la función, deformidad, discapacidad en las articulaciones e incluso una esperanza de vida más corta. La prevalencia de la AR en todo el mundo está constantemente en el 1,0% de la población total.

La artritis idiopática juvenil (AIJ), anteriormente conocida como artritis reumatoide juvenil (ARJ) es la forma más común de artritis persistente en niños. La AIJ se denomina a veces como artritis crónica juvenil (ACJ), un término que no es preciso ya que la AIJ no abarca todas las formas de artritis infantil crónica. La AIJ es una artritis que causa inflamación  
25 de las articulaciones y rigidez durante más de 6 semanas en un niño menor de 16 años de edad. Los 3 tipos principales de la AIJ son AIJ oligoarticular, AIJ poliarticular y AIJ sistémica. La AIJ oligoarticular (o pauciarticular) afecta a 5 o menos articulaciones en los primeros 6 meses de la enfermedad. La AIJ poliarticular afecta a 5 o más articulaciones en los primeros 6 meses de la enfermedad. Este subtipo puede incluir la afectación del cuello y la mandíbula, así como las articulaciones pequeñas generalmente afectadas. La AIJ sistémica (enfermedad de Still) se caracteriza por artritis, fiebre y una erupción de color rosa salmón. La AIJ sistémica puede ser difícil de diagnosticar debido a que la fiebre y las erupciones van y vienen. La AIJ sistémica puede producir afectación de órganos internos y conducir a serositis (por ejemplo, pericarditis).  
30

Espondilitis anquilosante (EA; también conocida como enfermedad de Bechterew/síndrome de Bechterew/enfermedad de Marie Strumpell/espondiloartritis) es una artritis inflamatoria degenerativa, dolorosa, crónica que afecta principalmente a las articulaciones sacroilíacas, causando la fusión eventual de la columna vertebral; es un miembro del grupo de las espondiloartropatías autoinmunes con una predisposición genética probable. La fusión completa trae como resultado una rigidez completa de la columna vertebral, una condición conocida como columna vertebral de bambú.  
35

La artritis psoriásica (también psoriasis artropática o artropatía psoriásica) es un tipo de artritis inflamatoria que afecta a alrededor del 5-7% de las personas que sufren de psoriasis que es una condición crónica de la piel. El tratamiento de la artritis psoriásica es similar a la de la artritis reumatoide. Más del 80% de los pacientes con artritis psoriásica tendrán lesiones psoriásicas de las uñas caracterizadas por las picaduras de las uñas, o en forma más extrema, la pérdida de la uña misma (onicolisis).  
40

La mayoría de los tratamientos actuales de las condiciones de artritis están dirigidos a la corrección de la aberración inmune que supuestamente impulsa la proliferación celular sinovial y la erosión del cartílago. El tratamiento actual de la artritis incluye fármacos de primera línea para el control del dolor y la inflamación clasificados como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE), por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, naproxeno, etc. Los tratamientos secundarios incluyen corticosteroides y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), por ejemplo, penicilamina, ciclofosfamida, sales de oro, azatioprina, Levamisol, metotrexato, leflunomida, ciclosporina, etanercept, y sulfasalazina, etc.  
45

50 El control del dolor es una parte vital del tratamiento de la artritis. Los analgésicos sólo pueden proporcionar un alivio temporal del dolor. Ellos no reducen la inflamación ni hacen más lento el avance de la enfermedad. El acetaminofén (Tylenol) es el analgésico más comúnmente utilizado. Los fármacos analgésicos narcóticos también pueden ser prescritos para el dolor más severo.

Los corticosteroides están estrechamente relacionados con el cortisol, una hormona producida en la corteza de las glándulas suprarrenales. El tratamiento de la artritis reumatoide con corticosteroides sigue siendo controvertido en términos de compensaciones beneficio/daño. Los corticosteroides son considerados como fármacos muy potentes debido a su capacidad para reducir la hinchazón y la inflamación rápidamente. Sin embargo, es bien sabido que los corticosteroides pueden causar potencialmente efectos secundarios graves y permanentes. Por lo tanto, sólo se pueden usar en ciertas situaciones sistémicas o locales en una articulación específica para obtener alivio, siempre con la dosis efectiva más baja posible durante el menor tiempo posible con eliminación o reducción gradual de la dosis con el tiempo.

Los FAINE se distinguen de los corticosteroides. Los FAINE en bajas dosis reducen el dolor, y en dosis más altas alivian la inflamación. La mayoría de los FAINE son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa, inhibiendo no selectivamente tanto la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como la ciclooxigenasa-2 (COX-2). La ciclooxigenasa es la enzima limitante de la velocidad en la catálisis de la formación de prostaglandinas y tromboxano a partir del ácido araquidónico. Las prostaglandinas entre otras actúan como moléculas mensajeras en el proceso de la inflamación. COX-1 es una enzima expresada constitutivamente con un papel de "mantenimiento" en la regulación de muchos procesos fisiológicos normales. Los efectos adversos de los FAINE están relacionados principalmente con su inhibición de COX-1 en los riñones y el tracto gastrointestinal, donde las prostaglandinas desempeñan un papel protector. COX-2 es una enzima con una expresión baja o no detectable en la mayoría de tejidos, pero puede ser inducida fácilmente en respuesta a la activación celular por citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales. Los efectos terapéuticos de los FAINE se deben a su inhibición de COX-2. Aunque se pensó que los inhibidores selectivos de la COX-2, Coxib (celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib y etoricoxib), tienen acción antiinflamatoria sin interrumpir las prostaglandinas gastroprotectoras, se observó un aumento del riesgo cardiovascular en aplicaciones clínicas que dieron lugar a la retirada en todo el mundo de algunos Coxib (rofecoxib y valdecoxib).

Aunque el FAINE reduce la inflamación del día a día, los medicamentos más fuertes, los FARME, suelen ser necesarios para los pacientes con inflamación persistente en varias articulaciones debido a la artritis inflamatoria durante más de seis semanas. Los FARME ralentizan los procesos biológicos que son la fuerza impulsora detrás de la inflamación persistente. Los FARME son fármacos antirreumáticos de acción lenta. El FARME de acción más rápida es el metotrexato, que por lo general tarda de cuatro a seis semanas antes de poder observar los beneficios. El resto de los FARME puede tomar de tres a seis meses o incluso más tiempo para ser eficaces. Como los FARME suprimen el sistema inmune, pueden presentarse serios efectos adversos con el uso a largo plazo. El metotrexato ha emergido como un tratamiento eficaz para la AR, ya sea como agente único o en combinación con otros FARME. El perfil de toxicidad del metotrexato está bien establecido e incluye enfermedad grave y a veces fatal del hígado, neumonitis y citopenias.

El avance más excitante en los últimos años en el tratamiento de la AR es el desarrollo de FARME biológicos. La elucidación de la función clave de TNF- $\alpha$  en la patogénesis de la AR ha conducido al desarrollo de terapias dirigidas que bloquean la actividad de esta citoquina. Además de la terapia anti-TNF, se han desarrollado una cantidad de otros FARME biológicos específicamente contra las moléculas (IL-1) o células (células B y células T) que participan en el proceso de las enfermedades relacionadas con inmunidad. Las ventajas potenciales de los FARME biológicos sobre los FARME tradicionales, incluyen el bloqueo altamente específico de las moléculas objetivo involucradas en forma crítica en la patogénesis, el inicio rápido de la acción clínica, la reducción al mínimo de la toxicidad no específica, intervalos de dosificación largos (cada semana por vía subcutánea o cada mes por vía intravenosa), posibles efectos inmunomoduladores a largo plazo, y una mejor calidad de vida. Los FARME biológicos utilizados para la artritis incluyen aquellos que bloquean las citoquinas inflamatorias, específicamente la reducción de las células B y la inhibición selectiva de la activación de las células T.

Aunque se encuentran disponibles una amplia gama de medicamentos, un tratamiento exitoso para la artritis inflamatoria es todavía una importante necesidad médica no satisfecha. Aunque los FARME biológicos están ofreciendo la ruta más prometedora para retardar o incluso detener esta enfermedad, únicamente son efectivos para una proporción de los pacientes: incluso para la terapia anti-TNF más eficaz, al menos un tercio de los pacientes con AR no responden. Roncarolo y Battaglia (Nature Reviews, Immunology, agosto de 2007, Vol. 7, páginas 585-598) y Morgan y colaboradores. (Arthritis & Rheumatism, 2005, Vol. 52, No. 7, páginas 2212-2221) divulgan células Treg para su uso en el tratamiento de la artritis inducida por colágeno en ratones.

En la presente invención, el solicitante tiene como objetivo proporcionar un tratamiento alternativo para la artritis basado en el uso de células Tr1 dirigidas contra un antígeno asociado a las articulaciones, en donde dicho antígeno asociado a las articulaciones es el colágeno tipo II.

#### Resumen de la invención

La invención se refiere a una composición que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

En una realización, dicha población de células Tr1 humanas es una población de clones Tr1 humanos. La presente invención se refiere además a un medicamento que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

5 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

En una realización, dicha población de células Tr1 humanas es una población de clones Tr1 humanos. En una realización, dicha condición artrítica es artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil o artritis psoriásica.

10 En una realización, la composición, medicamento o composición farmacéutica que se va a administrar a un sujeto que requiere del mismo comprende células Tr1 humanas autólogas a las células de dicho sujeto.

En una realización, se administran  $10^4$ /kg a  $10^9$ /kg de células Tr1 al sujeto que requieren de las mismas.

15 En una realización, la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de la composición, medicamento o la composición farmacéutica está en combinación con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de una condición artrítica.

20 En una realización, dicho sujeto no responde adecuadamente, o es poco probable que responda adecuadamente, a uno o más agentes terapéuticos en el grupo de los corticoides, anti-TNF, anti-interleuquinas, anti-linfocitos B, anti-moléculas estimuladoras, agentes tolerogénicos, anti-proteínas del complemento, inhibidores de las moléculas de señalización de células T, inhibidores de la migración celular, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: producción de IL-10 de clones Tr1 después de la activación específica con colágeno de tipo II. La Figura 1 describe el aumento específico de la producción de IL-10 por los clones de células T en presencia del colágeno de tipo II específico de antígeno. Se activaron los clones con o sin colágeno de tipo II en presencia de células presentadoras de antígeno autólogas irradiadas. Después de 48 horas, la producción de IL-10 se midió mediante ELISA.

Figura 2: Perfil de secreción de citoquinas de los clones Tr1 de colágeno de tipo II.

Se midió la secreción de IL-10, IL-4 e IFN $\gamma$  de clones de células Tr1 específicas de colágeno de tipo II en sobrenadante de 48 horas de células activadas de anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28.

Figura 3: Actividad supresora in vitro de clones Tr1 de colágeno de tipo II.

30 Se evaluó la actividad supresora de los clones Tr1 de colágeno de tipo II en experimentos de cocultivo con linfocitos T CD4+ autólogos. Las poblaciones de células fueron cocultivadas durante 3 días utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28. Luego se evaluó la proliferación celular de las células T CD4+ autólogas en ausencia o presencia de cantidades medidas de células Tr1. Los resultados muestran que la adición de las células Tr1 a los linfocitos T CD4+ inhibe masivamente la proliferación de células T.

35 Figura 4: Perfil de la secreción de citoquinas de clones Tr1 de colágeno de tipo II aisladas de pacientes con artritis reumatoide.

Figura 5: Actividad supresora in vitro de clones Tr1 de colágeno de tipo II aislados de pacientes con artritis reumatoide.

Figura 6: Células Tr1 específicas de colágeno tipo II que inhiben el desarrollo de una artritis severa en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno.

40 Descripción detallada de la invención

Definición

45 El término "células Tr1" como se usa en el presente documento se refiere a células que tienen la siguiente fenotipo en reposo CD4+CD25-FoxP3- y capaces de secretar altos niveles de IL-10 y niveles significativos de TGF- $\beta$  tras la activación. Las células Tr1 se caracterizan, en parte, por su perfil único de citoquinas: producen altos niveles de IL-10, niveles significativos de TGF- $\beta$  y niveles intermedios de IFN- $\gamma$ , pero poco o nada de IL-4 o IL-2. La producción de

5 citoquinas se evalúa típicamente en cultivos de células después de la activación con activadores policlonales de linfocitos T tales como anticuerpos anti-CD3+ anti-CD28 o interleuquina-2, PMA + ionomicina. Alternativamente, la producción de citoquinas se evalúa en cultivos de células después de la activación con el antígeno específico de células T presentado por células presentadoras de antígeno. Los altos niveles de IL-10 corresponden a al menos aproximadamente 500 pg/ml, típicamente superior a aproximadamente 1.000, 2.000, 4.000, 6.000, 8.000, 10.000, 12.000, 14.000, 16.000, 18.000, o 20.000 pg/ml o más. Los niveles significativos de TGF- $\beta$  corresponden a al menos aproximadamente 100 pg/ml, típicamente mayor a aproximadamente 200, 300, 400, 600, 800, o 1000 pg/ml o más. Los niveles intermedios de IFN- $\gamma$  corresponden a concentraciones comprendidas entre 0 pg/ml y por lo menos 400 pg/ml, típicamente mayor a aproximadamente 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, o 2000 pg/ml o más. Poco o nada de IL-4 o IL-2 corresponde a al menos de aproximadamente 500 pg/ml, preferiblemente menos de aproximadamente 250, 100, 75, o 50 pg/ml, o menos.

15 El término "antígeno" tal como se utiliza aquí, se refiere a una proteína, o péptido, para el que se utilizan las células de esta invención para modulación, o para uso en cualquiera de los métodos de esta invención. En una realización, el término "antígeno" puede referirse a una molécula producida sintéticamente, o una molécula de origen natural, que comparte homología de secuencia con un antígeno de interés, o de homología estructural con un antígeno de interés, o una combinación de los mismos. En una realización, el antígeno puede ser un mimótopo. Un "fragmento" del antígeno se refiere a cualquier subconjunto del antígeno, como un péptido más corto. Una "variante" del antígeno se refiere a una molécula sustancialmente similar ya sea al antígeno entero o a un fragmento del mismo. Se pueden preparar convenientemente antígenos variantes por síntesis química directa del péptido variante, usando métodos bien conocidos en la técnica.

20 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un ser humano.

El término "cantidad eficaz" como se usa aquí se refiere a una cantidad suficiente para causar un resultado clínico beneficioso o deseado (por ejemplo, mejora en la condición clínica).

25 El término "clon" o "población de clones" tal como se utiliza aquí se refiere a una población de células diferenciadas que se deriva de una célula diferenciada única.

30 El término "tratamiento" o "tratar" como se usa en este documento generalmente se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que está siendo tratado, y puede llevarse a cabo durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, supresión, disminución o inhibición las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, reducción de la tasa de avance de la enfermedad, mejoría o mitigación del estado de la enfermedad, y causar la remisión o la mejoría del pronóstico. En el contexto de la invención, se refiere a cualquier mejora en los síntomas clínicos de la artritis inflamatoria, así como cualquier mejora en el bienestar de los pacientes, en particular, una mejoría que se manifiesta por al menos uno de los siguientes: disminución de la hinchazón y sensibilidad de las articulaciones, disminución del dolor en las articulaciones, movilidad mejorada, desaceleración del deterioro de las articulaciones y el tejido circundante, aumento en el período de remisión entre los ataques agudos de la enfermedad; disminución de la duración del ataque agudo; prevención de la aparición de la enfermedad grave, etc.

35 El término "artritis" como se usa aquí, se refiere a la inflamación crónica, (independientemente de la causa, pero normalmente debido a un proceso autoinmune que afecta a las articulaciones), en el tejido alrededor de las articulaciones, tal como los tendones, los ligamentos y músculos, así como otros órganos en el cuerpo. Preferiblemente, la artritis inflamatoria que está siendo tratada es artritis reumatoide (AR), artritis idiopática juvenil (AIJ), espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, policondritis, artritis séptica. Un objetivo preferido de la terapia es la artritis reumatoide.

40 La presente invención

45 La presente invención se refiere a composiciones, medicamentos y composiciones farmacéuticas para uso en un método para el tratamiento de una condición de la artritis en un sujeto que requiera del mismo, que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende células Tr1 humanas dirigidas contra un antígeno asociado a la articulación, en donde dicho antígeno asociado a la articulación es el colágeno tipo II.

De acuerdo con la invención, la "población de células Tr1 humanas" corresponde a células Tr1 como se describió aquí anteriormente en las definiciones y no incluye las células T reguladoras CD4+CD25+ o células T reguladoras FoxP3+ (Treg naturales o convencionales), células Th3 que secretan TGF- $\beta$ , o células NKT reguladoras.

50 De acuerdo con la invención, el término "antígeno asociado a la articulación" se refiere a un péptido inmunogénico, que está presente en la articulación.

En una realización de la invención, dicho péptido inmunogénico puede estar presente en la articulación en reposo.

De acuerdo con la invención, dicha composición comprende células Tr1 humanas dirigidos contra el colágeno de tipo II. Las células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II pueden ser dirigidas contra epítomos presentes en el fragmento 245-273 de colágeno tipo II (IAGAPGFPGPRGPPGPQGATGPLGPKGQT, SEQ ID NO 1) y asociadas ya sea con sujetos HLA-DR1 o HLA-DR4.

- 5 Sin desear estar ligado a una teoría, el solicitante asume que la población de células Tr1 inyectadas dirigidas a un antígeno asociado a la articulación se activaría in vivo por el antígeno presente en la articulación y a continuación, sería capaz de controlar una condición artrítica. Por tanto, no hay necesidad de inyectar el antígeno al que se dirigen las células Tr1 para estimular estas células.
- 10 La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra el colágeno de tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.
- En una realización de la invención, las células Tr1 humanas se pueden obtener por:
- a) aislamiento de una población de células progenitoras de un sujeto,
- b) obtención de una población de células dendríticas por cultivo de dicha población de células progenitoras en presencia de IL-10,
- 15 c) poner en contacto células de la etapa b) con una población de linfocitos T CD4+ aislada de dicho sujeto en presencia de un antígeno asociado a las articulaciones para permitir la diferenciación de las células T CD4+ dirigidas a dicho antígeno en la población de células Tr1, y
- d) recuperar la población de células Tr1 de la etapa c).
- 20 En la etapa b), IL-10 está presente de 50 a 250 U/ml, preferiblemente 100 U/ml en el medio de cultivo. Dicho método para la obtención de células Tr1 se describe en Wakkach y colaboradores (Immunity 2003 Mayo; 18 (5): 605-17).
- Dicho método también puede llevarse a cabo utilizando dexametasona y vitamina D3, o tolerogénico o CD inmaduras en vez de las CD de la etapa b).
- En otra realización de la presente invención, las células Tr1 humanas se pueden obtener mediante:
- 25 a) cultivo de una población de células T CD4+ dirigida a un antígeno asociado con una articulación aislado de un sujeto en un medio con una cantidad apropiada de IFN- $\alpha$ , y
- b) recuperación de la población de células Tr1.
- IFN- $\alpha$  está presente preferiblemente en el medio a razón de 5 ng/ml. En la etapa a), el medio puede comprender además una cantidad apropiada de IL-10, preferiblemente a razón de 100 U/ml.
- 30 En la etapa b), la población de células Tr1 se cultiva en un medio que comprende IL-15 para permitir la proliferación, siendo preferiblemente la concentración de IL-15 de 5 ng/ml en el medio. Dicho método para la obtención de células Tr1 se describe en la patente estadounidense No. 6.746.670.
- En otra realización más de la invención, las células Tr1 humanas se pueden obtener por:
- a) activación in vitro de una población de células T CD4+ en presencia de un antígeno asociado a la articulación, presentado por células presentadoras de antígeno artificial, y
- 35 b) recuperación de las células T CD4+ activadas que comprende al menos 10% de células Tr1.
- Preferiblemente, las células presentadoras de antígeno artificial expresan una molécula del sistema HLA II y una molécula LFA-3 humana y no expresan las moléculas de coestimuladoras B7-1, B7 -2, B7-H1, CD40, CD23 e ICAM-1.
- Dicho procedimiento, para la obtención de células Tr1 se describe en la solicitud de patente WO 02/092793.
- En aún otra realización de la invención, las células Tr1 humanas se pueden obtener por:
- 40 a) activación in vitro de una población de células T CD4+ en presencia de un antígeno asociado a la articulación y una cantidad apropiada de IL-10; y

b) recuperación de la población de células Tr1.

Preferiblemente, IL-10 está presente en el medio en una concentración de 100 U/ml. Dicho método se describe en Groux y colaboradores (Nature 1997, 389 (6652): 737-42).

En otra realización más de la invención, las células Tr1 humanas se pueden obtener por:

- 5 a) estimulación de una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con un antígeno asociado a la articulación,
- b) recuperación de la población de células Tr1 específicas de antígenos de la población estimulada,
- c) expandir opcionalmente dicha población de células Tr1 específicas de antígenos.

10 Los leucocitos abarcan varios tipos de células, que se caracterizan por su importancia, su distribución, su número, su tiempo de vida y su potencialidad. Estos tipos son los siguientes: los leucocitos polinucleares o granulares, entre los que se encuentran los leucocitos eosinófilos, neutrófilos y basófilos, y las células mononucleares, o células mononucleares de sangre periférica (CMSP), que son glóbulos blancos grandes y consisten de los tipos principales de células del sistema inmune (linfocitos y monocitos). Los leucocitos o de las CMSP se pueden separar de la sangre periférica mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Ventajosamente, para la separación de las CMSP, se puede utilizar centrifugación, preferiblemente centrifugación en gradiente de densidad, preferiblemente centrifugación discontinua en gradiente de densidad. Una alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. En ciertas realizaciones, se aíslan típicamente las CMSP del producto de la sangre entera por medio de Ficoll-Hypaque, usando procedimientos estándar. En otras realizaciones, las CMSP se recuperan por medio de leucoféresis.

Dicho método se describe en la solicitud de patente WO 2007/010406.

20 En aún otra realización, las células Tr1 humanas se pueden obtener por:

- a) cultivo de una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con las células madre mesenquimales en presencia de un antígeno asociado a la articulación,
- b) recuperación de la población de células Tr1.

25 Dicho método también se puede llevar a cabo con células T de memoria o no modificadas en lugar de CMSP o leucocitos.

La población de células Tr1 así obtenida puede además ser expandida mediante cultivo en presencia de citoquinas tales como interleuquina 2 e interleucina 4. Alternativamente, también se podrían utilizar la interleucina 15 y la interleucina 13 en cultivos de expansión de células Tr1.

30 En los métodos descritos anteriormente, las células Tr1 humanas se pueden caracterizar por el método de identificación descrito en el documento WO 2005/000344. Dicho método de identificación de las células Tr1 se basa en la detección de la presencia simultánea de productos de expresión de los genes que codifican la molécula CD4 y las moléculas del grupo que comprende CD18 y/o CD11a, y CD49b. Las células Tr1 se pueden identificar y/o purificar por ELISA, citometría de flujo, o métodos de inmunoafinidad con anticuerpos dirigidos contra dichos marcadores.

35 Las células Tr1 también pueden ser enriquecidas por selección positiva o selección negativa mediante citometría de flujo o perlas magnéticas. También se describen tales métodos en el documento WO 2005/000344.

En otra realización de la presente invención, las células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a las articulaciones puede expandirse por el método in vitro descrito en el documento WO 2006/108882. Dicho método comprende:

- 40 a) cultivar a una temperatura T1 inferior a 35°C, en un medio de cultivo Mf, células alimentadoras tales como células alimentadoras de insectos, permitiendo dicha temperatura T1 la proliferación de células alimentadoras y dichas células alimentadoras que expresan factores que interactúan con las siguientes proteínas de la superficie de la célula:
- el complejo CD3/TCR,
  - la proteína CD28,
  - el receptor de IL-2,

- la proteína CD2,
- el receptor de IL-4,

5 b) poner en contacto las células alimentadoras obtenidas en la etapa a) liberadas o no de su medio de cultivo Mf, con la población de células Tr1 contenida en el medio de cultivo Mp, en donde dicho medio de cultivo Mp no contiene inicialmente los factores citados en la etapa a), con el fin de obtener una mezcla que contiene la población de células Tr1, las células alimentadoras y el medio de cultivo Mp,

c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa b) a una temperatura T2 que es al menos de 35°C, siendo dicha temperatura escogida de tal manera que la población de células Tr1 prolifera y las células alimentadoras no proliferan,

d) recuperar la población de células Tr1 así expandidas.

10 Los ejemplos de factores que interactúan con las proteínas de la superficie de las células mencionadas anteriormente incluyen:

- un anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde el dominio intracitoplasmático anti-CD3 de la cadena pesada de CD3 se reemplaza con un dominio transmembrana,

- la proteína CD80 o CD86,

15 - la IL-2 secretada por las células alimentadoras,

- la proteína CD58,

- una interleuquina seleccionada del grupo que comprende IL-4 e IL-13.

En una realización preferida de la presente invención, dichas células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a la articulación pueden ser clonadas mediante el uso de métodos convencionales para clonación de células T.

20 En una realización preferida de la presente invención, dicha composición que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigida contra un antígeno asociado con la articulación o al menos un clon de células Tr1 humanas dirigidas contra un antígeno asociado a la articulación, puede ser congelada para ser almacenada.

De acuerdo con la presente invención, dicho antígeno asociado a la articulación se selecciona del grupo que comprende péptidos de colágeno tipo II, fragmentos, variantes y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el antígeno asociado a la articulación es un antígeno recombinante o sintetizado.

El término "variante" del antígeno asociado a la articulación se refiere aquí a un antígeno que es casi idéntico al antígeno natural y que comparte la misma actividad biológica. La diferencia mínima entre el antígeno natural y sus variantes puede estar por ejemplo en una sustitución, supresión y/o adición de aminoácidos. Tales variantes pueden contener, por ejemplo, sustituciones conservadas de aminoácidos en las que se reemplazan los residuos de aminoácidos con los residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medicamento que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra colágeno de tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

40 La presente invención también tiene la intención de proporcionar una composición farmacéutica que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra colágeno tipo II en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.

De acuerdo con una realización preferida, dicha población de células Tr1 humanas es una población del clon de Tr1 humano.

De acuerdo con una realización preferida, dicho antígeno asociado a la articulación se selecciona entre péptidos de colágeno tipo II, y fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.

5 Preferiblemente, dicha composición comprende células Tr1 humanas dirigidas contra colágeno tipo II. Las células Tr1 humanas dirigidas contra colágeno tipo II pueden ser dirigidas contra epítomos presentes en el fragmento 245-273 del colágeno tipo II (IAGAPGFPGPRGPPGPQGATGPLGPKGQT, SEQ ID NO 1) y asociadas ya sea con sujetos HLA-DR1 o HLA-DR4.

10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en esta invención son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences decimosexta edición Osol, A. Ed. (1980) describe composiciones y formulaciones adecuadas para administración farmacéutica de la composición de la presente invención. En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales usualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, aceite de ajonjolí, glicerol, etanol, combinaciones de los mismos, o similares, como vehículo. El portador y la composición pueden ser estériles, y la formulación se adapta a la forma de administración. Además de los vehículos biológicos neutros, las composiciones farmacéuticas que se administran pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes reguladores de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán. La composición puede ser una solución, suspensión, emulsión líquida.

20 La presente divulgación se refiere al uso de una composición que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra un antígeno asociado a la articulación, en donde dicho antígeno asociado a la articulación es colágeno tipo II, para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición artrítica.

25 Dicha condición artrítica incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, policondritis, artritis séptica, espondiloartropatías o espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil (AIJ), artritis psoriásica y enfermedades asociadas con artritis, tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, dermatomiositis, polimiositis, polimialgia reumática, fibromialgia, sarcoidosis, vasculitis.

De acuerdo con una realización preferida, dicha población de células Tr1 humanas es una población del clon de Tr1 humano.

30 De acuerdo con una realización preferida, dicha población o clon de células Tr1 humanas está dirigido contra un antígeno asociado a la articulación seleccionado entre los péptidos de colágeno tipo II, y fragmentos, variantes y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, las células o clones Tr1 humanos están dirigidos contra colágeno tipo II. Las células o clones Tr1 humanos dirigidos contra colágeno tipo II pueden ser dirigidos contra epítomos presentes en el fragmento 245-273 del colágeno tipo II (IAGAPGFPGPRGPPGPQGATGPLGPKGQT, SEQ ID NO 1) y asociados ya sea con sujetos HLA-DR1 o HLA-DR4.

35 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición como se describió aquí anteriormente para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de artritis reumatoide.

40 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición como se describió aquí anteriormente para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de artritis psoriásica.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición como se describió aquí anteriormente para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de espondilitis anquilosante.

45 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición como se describió aquí anteriormente para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de artritis idiopática juvenil.

50 Un objetivo de la presente divulgación es también un método para el tratamiento de una condición artrítica, preferiblemente artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante en un sujeto que requiera del mismo, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un medicamento como se describió aquí anteriormente, o una composición farmacéutica como se describió aquí anteriormente.

La composición puede formularse para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, inyección intradérmica, intraarticular, intratecal. En una realización de la invención, el medicamento o la composición farmacéutica de la invención puede ser inyectada dentro de la articulación que va a ser tratada.

5 Preferiblemente, el medicamento o la composición farmacéutica se puede administrar mediante inyección intraarticular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en los ganglios linfáticos del paciente, preferiblemente mediante inyección intravenosa.

10 La cantidad de células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a la articulación, efectiva en el tratamiento de una condición artrítica dependerá de la naturaleza de la inflamación, y puede ser determinada mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe ser decidida de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada individuo.

Las dosis efectivas se pueden extrapolar de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

15 En una realización de la presente invención, se administran al sujeto  $10^4$  células/kg a  $10^9$  células/kg. Preferiblemente se administran al sujeto  $10^5$  células/kg a  $10^7$  células/kg y más preferiblemente se administran al sujeto aproximadamente  $10^6$  células/kg.

20 En una realización de la invención, se le administra al sujeto el medicamento en el momento cuando se demuestra la aparición mediante una disminución en el estado clínico del sujeto o en el momento cuando se pueden visualizar lesiones inflamatorias por ejemplo mediante radiografía o formación de imágenes de resonancia magnética.

En una realización, se le administra al sujeto una vez el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención.

En una segunda realización, se le administra al sujeto una vez al mes el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención.

25 En una tercera realización, se le administra al sujeto trimestralmente el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención.

En una cuarta realización, se le administra al sujeto una o dos veces al año el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención.

30 En otra realización, el medicamento o la composición farmacéutica que se le administra al sujeto que requiere del mismo comprende células Tr1 humanas autólogas a las células de dicho sujeto.

Esto significa que las células Tr1 serán administradas al sujeto del cual provienen o que los precursores utilizados para la producción de células Tr1 provienen del sujeto al cual se le administraran las células Tr1.

La presente divulgación se refiere también a un proceso para el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto que requiera del mismo, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- 35
- recolectar una muestra de sangre de dicho sujeto,
  - obtener células Tr1 dirigidas a un antígeno seleccionado asociado a la articulación, en donde dicho antígeno asociado a la articulación es colágeno tipo II,
  - clonación de dichas células Tr1 dirigidas a un antígeno seleccionado asociado a la articulación,
  - expandir adicionalmente los clones Tr1 obtenidos en la etapa anterior,

40

  - inyectar los clones Tr1 así obtenidos en dicho sujeto, preferiblemente por vía intravenosa.

Preferiblemente, se lleva a cabo la clonación y expansión de clones Tr1 dirigidos a un antígeno seleccionado asociado a la articulación en donde dicho antígeno asociado a la articulación es colágeno tipo II, con el siguiente método:

a) cultivar a una temperatura T1 inferior a 35°C, en un medio de cultivo Mf, células alimentadoras tales como células alimentadoras de insectos, permitiendo dicha temperatura T1 la proliferación de células alimentadoras y dichas células alimentadoras que expresan factores que interactúan con las siguientes proteínas de la superficie de la célula:

- el complejo CD3/TCR,
- la proteína CD28,
- el receptor de IL-2,
- la proteína CD2,
- el receptor de IL-4,

5

b) poner en contacto las células alimentadoras obtenidas en la etapa a) liberadas o no de su medio de cultivo Mf, con la población de células Tr1 contenida en el medio de cultivo Mp, en donde dicho medio de cultivo Mp no contiene inicialmente los factores citados en la etapa a), con el fin de obtener una mezcla que contiene la población de células Tr1, las células alimentadoras y el medio de cultivo Mp,

10

c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa b) a una temperatura T2 que es al menos de 35°C, siendo dicha temperatura escogida de tal manera que la población de células Tr1 prolifera y las células alimentadoras no proliferan,

15

d) recuperar la población de células Tr1 así expandidas.

Los ejemplos de factores que interactúan con las proteínas de la superficie de las células mencionadas anteriormente incluyen:

- un anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde el dominio intracitoplasmático anti-CD3 de la cadena pesada de CD3 se reemplaza con un dominio transmembrana,
- la proteína CD80 o CD86,
- la IL-2 secretada por las células alimentadoras,
- la proteína CD58,
- una interleuquina seleccionada del grupo que comprende IL-4 e IL-13.

20

25

En otra realización, el método para el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto que requiere del mismo comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva del medicamento o la composición farmacéutica de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de una condición artrítica.

30

La presente divulgación se refiere al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención, en donde la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva del medicamento o la composición farmacéutica está en combinación con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de una condición artrítica.

Los ejemplos de agentes terapéuticos comúnmente utilizados para el tratamiento de una condición artrítica son los siguientes:

- corticoides (prednisona),
- anti-TNF tal como el Infliximab, Adalimumab, Etanercept;
- antiinterleuquinas tales como Anakinra, AMG108, Igruratimod, Actemra
- anti-linfocitos B, tales como Rituximab, Epratuzumab;
- anti-moléculas coestimuladoras, tales como Abatacept, Belimumab;

35

- agentes tolerogénicos (moléculas sintéticas dirigidas a receptores de ADN de la superficie de linfocitos B) tales como LJP 394 o TV-4710;
  - anti-proteína del complemento tal como Eculizumab;
  - Inhibidores de moléculas de señalización de células T tales como CP690550
- 5
- Inhibidores de la migración celular tales como antagonistas de los receptores de quimoquinas (Maraviroc, INCB3284)
  - leflunomida,
  - sulfasalazina,
  - hidroxicloroquina,
- 10
- azatioprina,
  - metotrexato,
  - ciclosporina,
  - minociclina,
  - D-penicilamina,
- 15
- terapia de combinación de los mismos, tales como metotrexato + sulfasalazina, metotrexato + hidroxicloroquina, metotrexato + azatioprina, metotrexato + infliximab, metotrexato + leflunomida, metotrexato + etanercept, ciclosporina + hidroxicloroquina, ciclosporina + metotrexato, metotrexato + sulfasalazina + hidroxicloroquina.

20 En una realización preferida, el método para el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto en necesidad del mismo comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz del medicamento o la composición farmacéutica de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos seleccionados en el grupo de los corticoides, anti-TNF, anti-interleucinas, linfocitos anti-B, moléculas anti-estimuladoras, agentes tolerogénicos, proteínas anti-complemento, inhibidores de células T moléculas de señalización, los inhibidores de la migración celular, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.

25 La presente divulgación se refiere al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto que requiera del mismo, en donde la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva del medicamento o la composición farmacéutica de la invención está en combinación con uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo de corticoides, anti-TNF, anti-interleuquinas, anti-linfocitos B, anti-moléculas coestimuladoras, agentes tolerogénicos, anti-proteínas del complemento, inhibidores de las moléculas de señalización de células T, inhibidores de la migración de células, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.

30 También se divulga un método de tratamiento de una condición artrítica en el que el medicamento o la composición farmacéutica de la invención es para ser administrado a un sujeto que requiera del mismo, en donde el sujeto no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos en el grupo de corticoides, anti-TNF, anti-interleuquinas, anti-linfocitos B, anti-moléculas coestimuladoras, agentes tolerogénicos, anti-proteínas del complemento, inhibidores de las moléculas de señalización de células T, inhibidores de la migración de células, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.

35 La presente divulgación se refiere al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención, en donde dicho sujeto no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos en el grupo de corticoides, anti-TNF, anti-interleuquinas, anti-linfocitos B, anti-moléculas coestimuladoras, agentes tolerogénicos, anti-proteínas del complemento, inhibidores de las moléculas de señalización de células T, inhibidores de la migración de células, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.

"Respuesta inadecuada", "no responde adecuadamente a", o "poco probable que responda de manera adecuada" se refieren a una respuesta real o probable por parte de un sujeto lo que indica que la terapia ha sido, o es probable que sea, ineficaz, tóxica o mal tolerada en lo que respecta al sujeto.

#### Ejemplos

- 5 En la siguiente descripción, todos los experimentos para los que no se presenta protocolo detallado se llevan a cabo según el protocolo estándar.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención.

#### Procedimientos experimentales

##### Aislamiento de células Tr1

- 10 Se recolectaron muestras de sangre de pacientes sanos o de pacientes con artritis reumatoide severa y se separaron los glóbulos blancos mediante centrifugación con densidad de gradiente. Se cultivaron luego las células en presencia de colágeno tipo II con el fin de inducir la proliferación específica de células Tr1 dirigidas contra este antígeno. Después de 13 días de cultivo, se clonaron las poblaciones de células mediante limitación del método de dilución. Se evaluaron luego los clones por su especificidad al colágeno tipo II y por el perfil característico de producción de citoquina de Tr1.

- 15 Ensayos de citoquina

- 20 Para la determinación de la especificidad del antígeno, se llevaron a cabo ELISA tipo sándwich sobre los sobrenadantes a las 48 horas de clones de células T estimulados en presencia de células presentadoras de antígeno ( $4 \times 10^5$ ) y en presencia o ausencia del antígeno específico (colágeno tipo II). Para la determinación del perfil de producción de citoquinas, se estimularon clones de células Tr1 de colágeno tipo II con anticuerpos monoclonales anti-CD3+ anti-CD28 y se recogieron los sobrenadantes después de 48 horas. Se realizó ELISA usando anti-IL-4 (11B11), anti-IL-10 (2A5), anti-IFN- $\gamma$  (XGM1.2), biotina anti-IL-4 (24G2), anti-IL-10 (SXC1), anti-IFN- $\gamma$  (R4-6A2) (Pharmingen Becton Dickinson).

##### Estudios de supresión

- 25 Para los estudios de supresión, se cultivaron cantidades medidas de clones Tr1 específicos de colágeno tipo II junto con linfocitos T autólogos CD4 positivos. Los co-cultivos fueron estimulados con anticuerpos monoclonales anti-CD28 + anti-CD3. Alternativamente, se añadieron sobrenadantes de clones específicos de colágeno tipo II a linfocitos T CD4 positivos estimulados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28. Después de 3 días, se evaluó la proliferación celular total usando el kit de proliferación WST-1 de Roche.

#### Resultados

- 30 La Figura 1 muestra la producción de IL-10 de dos poblaciones distintas de células Tr1 específicas para colágeno tipo II en presencia o ausencia del antígeno. Los resultados muestran que la estimulación con colágeno tipo II induce un aumento en la producción de IL-10. Estos resultados demuestran la especificidad de las poblaciones de células hacia el colágeno de tipo II.

- 35 Para determinar adicionalmente el perfil de secreción de citoquinas de estas poblaciones de células Tr1 específicas para colágeno tipo II, se estimularon las células en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28. Se realizaron ELISA en sobrenadantes de 48h para medir la producción de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ . La Figura 2 muestra que el perfil de secreción de citoquinas observado para las últimas poblaciones específicas de colágeno tipo II corresponde a un perfil de secreción de citoquina de Tr1, es decir, alta producción de IL-10, baja producción de IFN- $\gamma$  y no producción de IL-4.

- 40 Se evaluó luego la actividad supresora de estas poblaciones de Tr1 de colágeno tipo II. Se cultivaron conjuntamente células Tr1 con células T CD4+ autólogas en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28. Después de 3 días de estimulación, se midió la proliferación celular. La Figura 3 muestra los resultados para las dos poblaciones de Tr1 y confirma la actividad supresora de estas células.

La Figura 4 muestra el perfil de producción de citoquinas de un clon específico para colágeno tipo II estimulado in vitro con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28.

- 45 Este clon fue producido a partir de la sangre periférica de un paciente con artritis reumatoide reacio a los tratamientos convencionales de artritis reumatoide que incluyen anticuerpos anti-TNF-alfa.

La alta producción de IL-10 y la producción de IFN- $\gamma$  en ausencia de IL-4 caracteriza su identidad de célula Tr1.

El sobrenadante de este clon activado es capaz de suprimir la proliferación de linfocitos T CD4+ in vitro (Figura 5). El bloqueo concomitante tanto de IL-10 y TGF $\beta$  permite el restablecimiento de la proliferación en estos experimentos que muestran que la actividad supresora del clon de Tr1 es mediada por estas dos citoquinas.

5 Por tanto, este experimento confirma que las células Tr1 específicas de colágeno tipo II pueden ser aisladas de pacientes que son reacios a los tratamientos convencionales de la artritis reumatoide y que estas células Tr1 son capaces de suprimir la proliferación de células T CD4 + a través de IL-10 y TGF-beta.

Se evaluó luego el efecto de las células Tr1 específicas de colágeno tipo II, in vivo en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno.

10 Se activaron esplenocitos de ratón de ratones TBC transgénicos (que expresan un receptor de células T específico para colágeno tipo II) con colágeno tipo II de bovino (5 $\mu$ g/mL) durante 7 días en presencia de IL-10 (50 ng/mL) y anti-IL- 4 (10 $\mu$ g/mL).

15 Se indujo artritis en ratones DBA-1 ratones mediante administración subcutánea de colágeno tipo II (100 $\mu$ g) en adyuvante completo de Freund el día 0 seguido por una segunda inmunización con colágeno tipo II (100 $\mu$ g) inyectado también por vía subcutánea en adyuvante incompleto de Freund el día 21.

Se evaluó la gravedad de la enfermedad mediante la medición de la inflamación de las articulaciones y los dedos inflamados. Se inyectaron en forma intravenosa células Tr1 singénicas específicas para colágeno tipo II (1,5 millones) el día 19.

20 La Figura 6 muestra que la administración intravenosa de células Tr1 específicas para colágeno tipo II inhibe el desarrollo de una artritis severa en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno.

Listado de secuencias

<110> TXCELL FOUSSAT, A

<120> Composición para el tratamiento de una condición artrítica

<130> BEX090124

25 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> fragmento 245-273 de colágeno tipo II

<400> 1

Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro  
1 5 10 15

Gln Gly Ala Thr Gly Pro Leu Gly Pro Lys Gly Gln Thr  
20 25

35 <210> 2

ES 2 599 305 T3

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> epítopo HCgp39

<400> 2

Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu  
1 5 10

<210> 3

<211> 13

10 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> epítopo HCgp39

<400> 3

15 Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly  
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> epítopo HCgp39

<400> 4

Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val  
1 5 10

<210> 5

25 <211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> epítopo HCgp39

ES 2 599 305 T3

<400> 5

Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg  
1 5 10

<210> 6

<211> 9

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> epítopo HCgp39

<400> 6

10 Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> epítopo HCgp39

<400> 7

Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly  
1 5

<210> 8

20 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> epítopo HCgp39

25 <400> 8

Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

ES 2 599 305 T3

<213> artificial

<220>

<223> epítopo HCgp39

<400> 9

Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln  
1 5

5

Reivindicaciones

1. Composición que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigida contra colágeno tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.
- 5 2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha población de células Tr1 humanas es una población de clones de Tr1 humano.
3. Medicamento que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigida contra colágeno tipo II para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.
- 10 4. Composición farmacéutica que comprende al menos una población de células Tr1 humanas dirigidas contra colágeno tipo II en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de una condición artrítica en un sujeto.
- 5 6. Composición, medicamento o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha condición artrítica es artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil o artritis psoriásica.
7. Composición, medicamento o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición, medicamento o composición farmacéutica que va a ser administrada a un sujeto que requiera del mismo comprende células Tr1 humanas autólogas a las células de dicho sujeto.
- 20 8. Composición, medicamento o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se administran  $10^4$  células Tr1/kg a  $10^9$  células Tr1/kg al sujeto que requiera de las mismas.
9. Composición, medicamento o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de la composición, medicamento o la composición farmacéutica es en combinación con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de una condición artrítica.
- 25 10. Composición, medicamento o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho sujeto no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos en el grupo de corticoides, anti-TNF, anti-interleuquinas, anti-linfocitos B, anti-moléculas coestimuladoras, agentes tolerogénicos, anti-proteínas del complemento, inhibidores de las moléculas de señalización de células T, inhibidores de la migración de células, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, azatioprina, ciclosporina, minociclina, D-penicilamina.
- 30

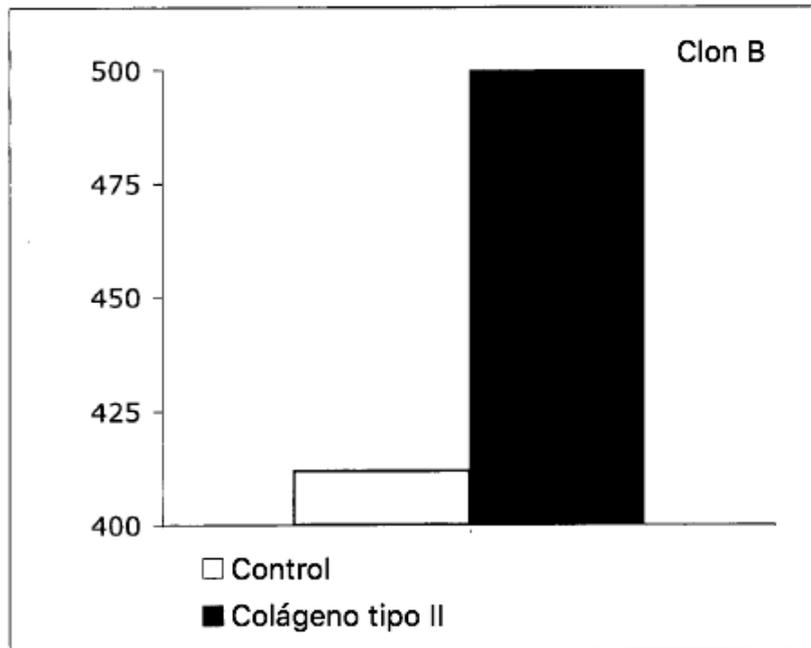
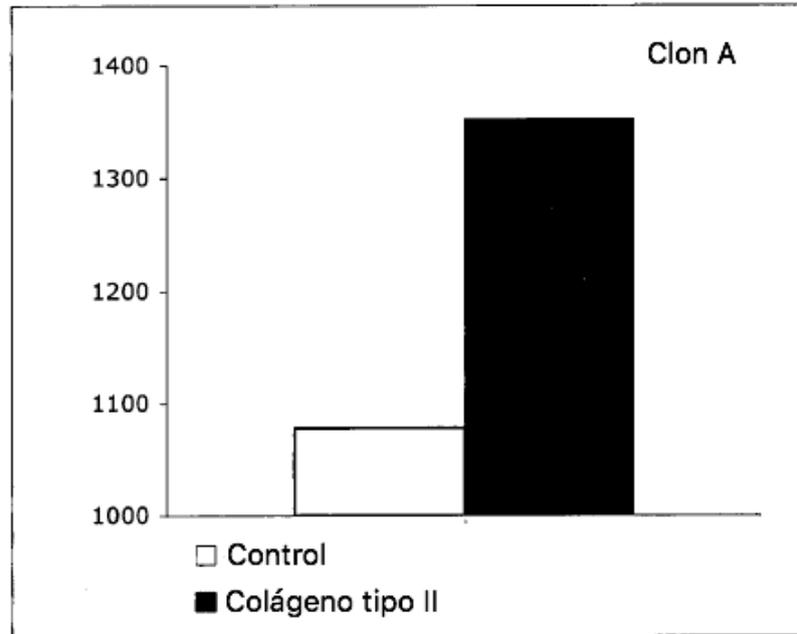


Figura 1

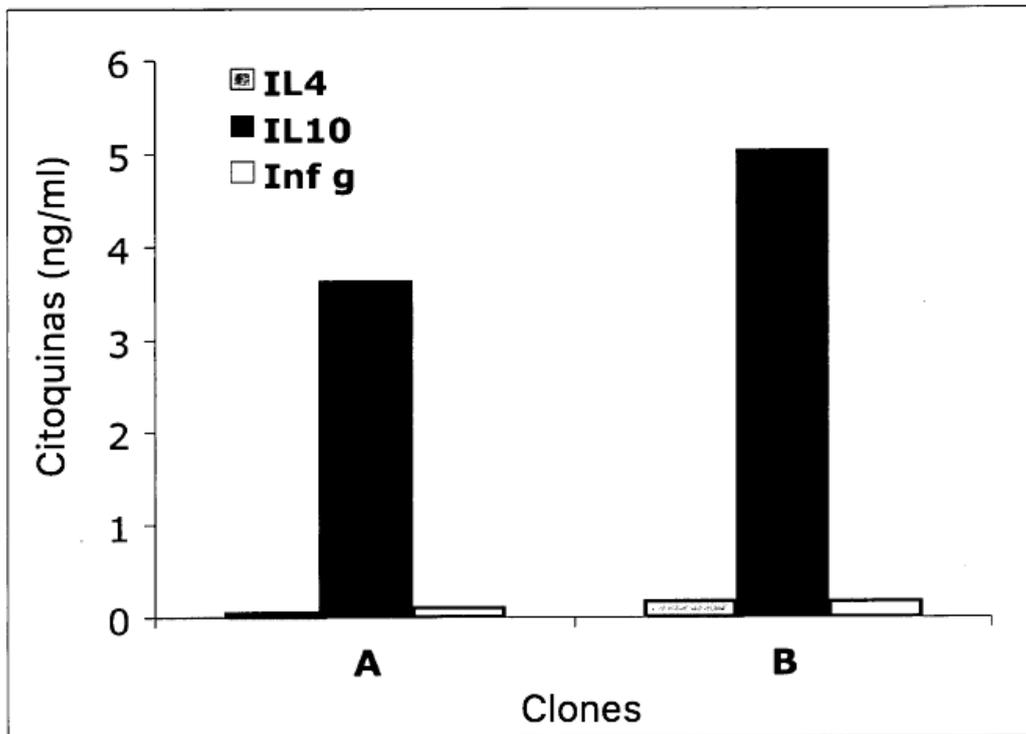


Figura 2

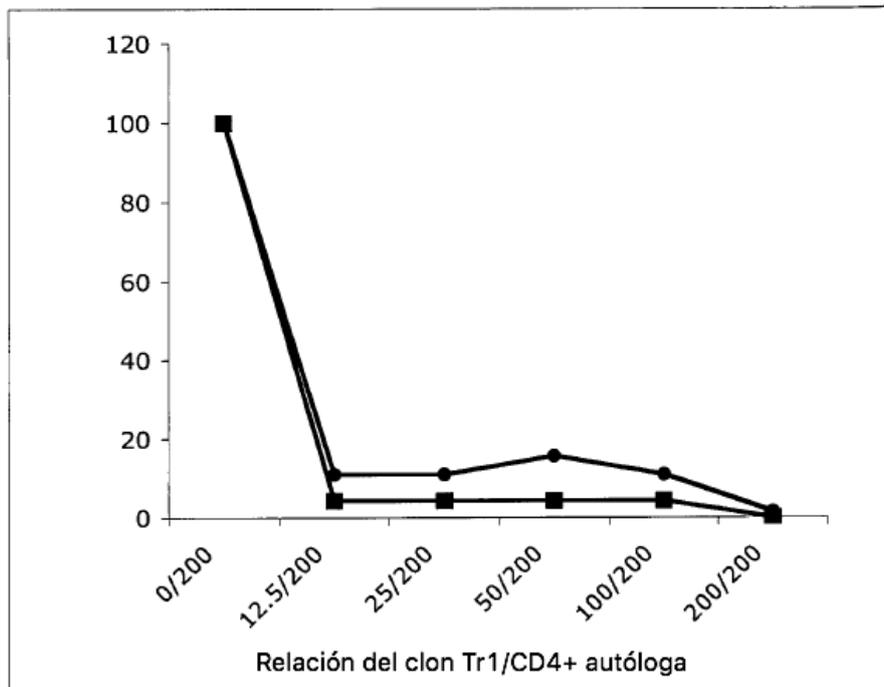


Figura 3

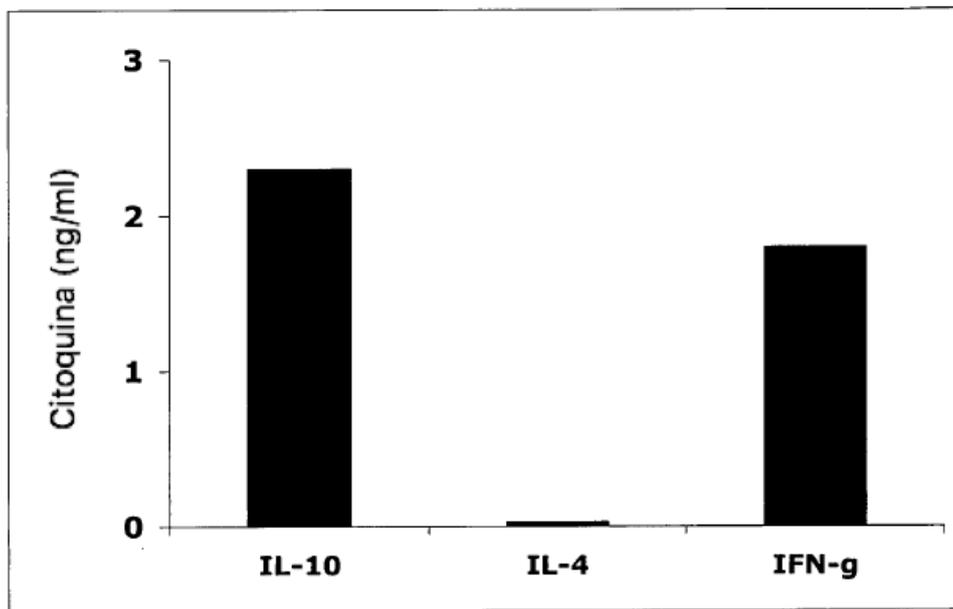


Figura 4

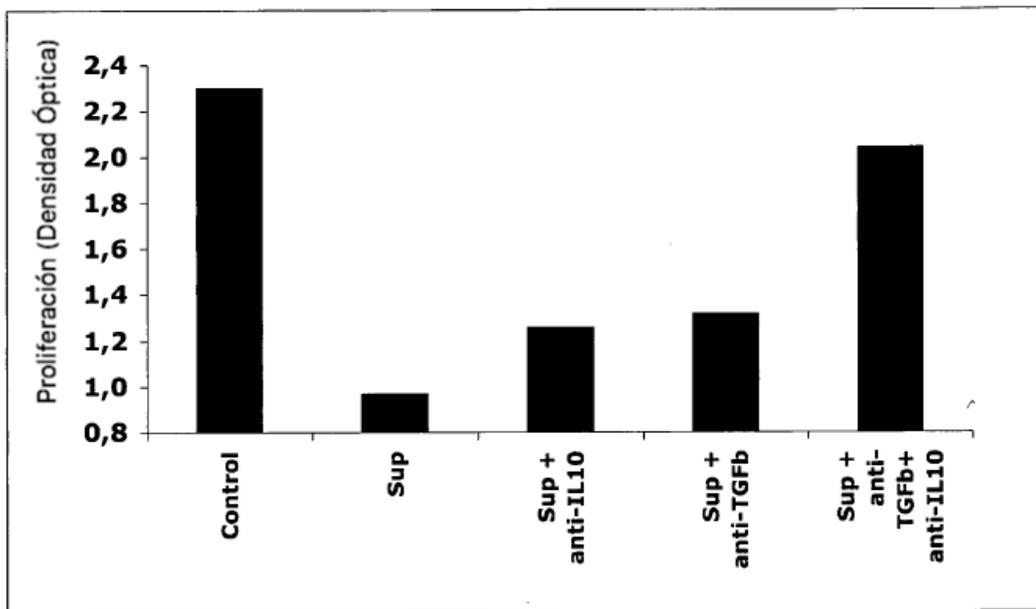


Figura 5

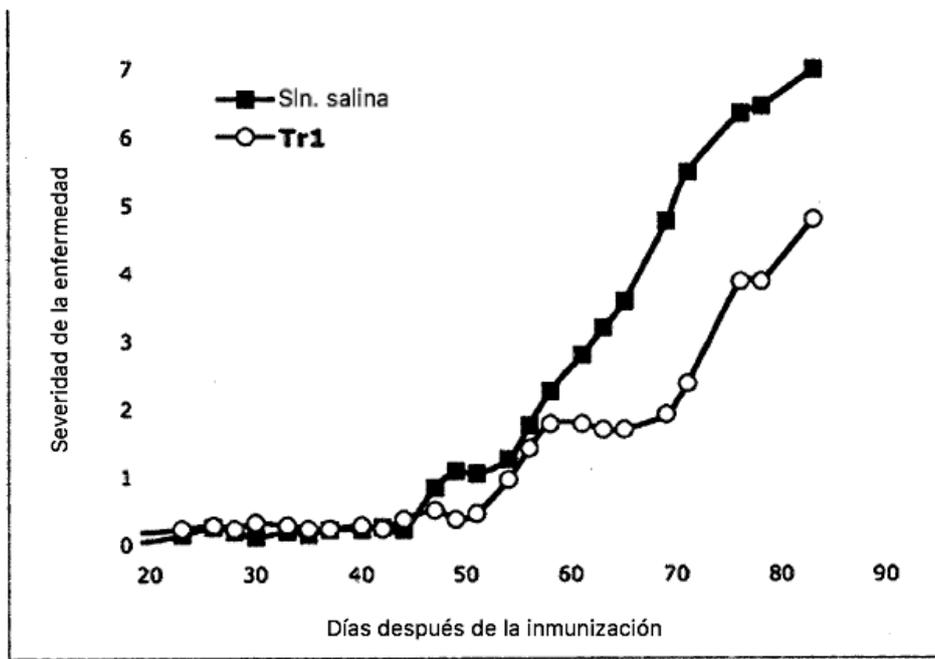


Figura 6