

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 329**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2008 PCT/EP2008/009204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09056332**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08845159 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2205273**

54 Título: **Uso de células modificadas para el tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

**31.10.2007 EP 07075952**

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

**14.02.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**MARTIN, ROLAND;  
LUTTEROTTI, ANDREAS y  
MILLER, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 601 329 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**

Uso de células modificadas para el tratamiento de la esclerosis múltiple

5 La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria devastadora del cerebro y la medula espinal que afecta principalmente a adultos jóvenes.

10 En la mayoría de pacientes, la enfermedad empieza con un curso de enfermedad recidivante-remitente (RR-MS), que está seguido por un deterioro progresivo secundario que comienza habitualmente aproximadamente diez años después de la aparición de la enfermedad (SP-MS). Está bien aceptado que el daño en el sistema nervioso central (SNC) resulta de un ataque autoinmunitario contra (auto)antígenos dentro de la vaina de mielina. Las terapias actualmente aprobadas para MS implican diversas estrategias inmunomoduladoras o inmunosupresoras no específicas de antígeno, que son eficaces solo parcialmente. Todos los agentes terapéuticos actuales tienen que inyectarse durante periodos largos de tiempo y están asociados a efectos secundarios considerables. La terapia debe tener como objetivo deeleccionar específicamente o inhibir funcionalmente las células auto-reactivas patogénicas sin alterar el sistema inmunitario "normal". Esto es de importancia porque la inmunomodulación y/o la inmunosupresión globales se consiguen a costa de inhibir células reguladoras beneficiosas y células inmunitarias que podrían lograr funciones protectoras. Por tanto, el tratamiento ideal sería intervención prematura usando un protocolo de tolerancia específico de antígeno que aborde selectivamente células T auto-reactivas tanto activadas como vírgenes específico para múltiples epítomos encefalitogénicos potenciales que perpetúen la enfermedad.

20 Los mecanismos responsables del daño tisular en MS implican la activación de linfocitos T auto-reactivos que atacan las proteínas en la vaina de mielina. Basándose en el éxito en experimentos preclínicos en modelos animales de MS, se ha inventado una nueva estrategia terapéutica, que abordará específicamente solamente los linfocitos T CD4+ auto-reactivos. Se inducirá tolerancia por una única administración de células sanguíneas, en particular glóbulos rojos, más particularmente células mononucleares de sangre periférica acopladas químicamente con una mezcla de antígenos de mielina sintéticos contra los cuales son demostrables las respuestas de células T en pacientes de MS prematura. La terapia es exquisitamente específica de antígeno y vuelve a las células T auto-reactivas no funcionales o anérgicas.

25 La inducción de tolerancia a autoantígenos diana es un objetivo terapéutico muy importante en enfermedades autoinmunitarias (véase, Miller et al., Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. Nat Rev Immunol 7:665). Ofrece la oportunidad de atenuar específicamente la respuesta autoinmunitaria patogénica de un modo eficaz con pocos efectos secundarios. Para conseguir este objetivo se adopta una estrategia de tolerización prometedora que emplea células presentadoras de antígeno autólogas, fijadas, pulsadas con péptido como tolerógeno. Esta terapia ha demostrado excelente eficacia en modelos animales de MS y diferentes enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T, pero está bastante mejorada por la presente invención.

30 La terapia de acuerdo con la presente invención se basa en la administración sistémica de células sanguíneas humanas acopladas químicamente con un cóctel de péptidos, en el que el cóctel se selecciona de

- 45 a) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55
- b) MBP 13-32, MBP 82-98, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55
- 50 c) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20, MOG 35-55 y MBP 82-98
- d) MBP 13-32, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55.

55 Las células sanguíneas humanas pueden ser células sanguíneas autólogas o pueden ser células sanguíneas alogénicas.

Las células sanguíneas preferidas son glóbulos rojos. Son más preferidas las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La vía preferida para la administración sistémica es la administración i.v. (intravenosa).

60 En este aspecto de la invención se prefiere mucho más el uso del cóctel que consiste en los siete péptidos siguientes MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55.

La vía preferida para la administración sistémica es la administración i.v.

65 Por lo tanto, otro aspecto preferido de la invención es una terapia basada en la administración sistémica de células mononucleares de sangre periférica alogénicas acopladas químicamente con un cóctel que consiste en los siete péptidos siguientes MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55

contra los que son demostrables respuestas de células T en pacientes con RR-MS prematura.

Estudios inmunológicos extensivos, incluyendo estudios *in vitro* de seres humanos y estudios *in vitro* e *in vivo* en animales, documentan la seguridad, eficacia y mecanismos de acción *in vivo* de los regímenes descritos anteriormente.

Aspectos adicionales de la invención se indican en las reivindicaciones.

En un modelo animal de MS, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), este protocolo ha demostrado eficacia terapéutica drástica sobre los signos clínicos y patológicos de la enfermedad. No solamente silencia la respuesta inmunitaria contra el autoantígeno principal, sino que también evita la propagación de epítomos a otros péptidos de mielina dentro de la misma proteína (de forma intramolecular) y también proteínas de mielina adicionales (de forma intermolecular), que representa una ventaja importante sobre otras terapias. Se espera que el tratamiento disminuya la cantidad promedio de lesiones MRI potenciadas con contraste mensualmente en un 50 % o mayor y reduzca la cantidad de cambios del fenotipo de células T específicas de péptido de mielina de un tipo Th1/Th17 pro-inflamatorio a un tipo Th2 antiinflamatorio y/o vuelva anérgicas a las células T auto-reactivas.

Las ventajas del protocolo son: 1. La tolerancia es exquisitamente específica de antígeno y, por lo tanto, no alterará la respuesta inmunitaria normal como lo hacen los actuales regímenes inmunosupresores. 2. A partir de los estudios preclínicos se observa que en la mayoría de los casos una única infusión intravenosa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pulsadas con péptido inducirá mejora a largo plazo, que es una mejora sustancial en comparación con todas las terapias actuales. Si es necesario, los pacientes pueden tratarse más de una vez en su vida (pueden volver a tratarse según lo necesario, por ejemplo, en una base anual). 3. La tolerancia es inducible en células Th1 tanto vírgenes como activadas. Se considera más seguro y más eficaz que la tolerancia inducida por administración periférica de péptido soluble o vacunación con ADN con péptido de mielina, que están actualmente ambos en ensayo clínico en fase II y III.

MS y papel de las células T: Las evidencias actuales sugieren las células T auto-reactivas CD4+ como un factor central para la patogénesis autoinmunitaria de MS probablemente relevante no solo para la inducción un mantenimiento de la respuesta autoinmunitaria, sino también durante el daño tisular (Sospedra y Martin 2005, Annu. Rev. Immunol. 23:683). La frecuencia de células T CD4+ activadas reactivas para mantener los constituyentes de la vaina de mielina, tal como la proteína básica de mielina (Sospedra and Martin 2005, Annu. Rev. Immunol. 23:683). (MBP), la proteína proteolípida (PLP) y la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) está aumentada en pacientes con MS. Recientemente se demostró que células T específicas de mielina de alta avidéz, que derivan de la combinación de células T de memoria y expresan preferentemente un fenotipo de citoquinas Th1, son claramente más frecuentes en pacientes con MS que en controles (Bielekova et al. 2004, J. Immunol. 172:3893). Debido a su implicación patogénica, las células T CD4+ son una diana lógica para intervenciones terapéuticas.

Tolerización por APC fijadas, pulsadas con péptido en los modelos animales de MS: Muchas características patológicas de MS humana se reflejan en la situación de EAE, un modelo paradigmático de enfermedad autoinmunitaria dirigida por células Th1/Th17. Los estudios en EAE recidivante (R-EAE) en ratones SJL han demostrado claramente que la desmielinización crónica implica la activación de respuestas de células T contra múltiples antígenos endógenos, que surgen mediante propagación de epítomos (Vanderlugt y Miller 2002, Nat. Rev. Immunol. 2:85). Puede inducirse insensibilidad de células T cuando las células presentadoras de antígeno (APC) pulsadas con péptido antigénico se tratan con el agente enlazador 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI).

Un aspecto adicional más de la invención es una célula mononuclear de sangre periférica como se ha descrito anteriormente, en que el acoplamiento químico se consigue por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI).

Los experimentos preclínicos han demostrado que una única inyección i.v. de esplenocitos murinos vírgenes pulsados con una mezcla de péptidos de mielina encefalitogénicos y fijados con el agente enlazador ECDI es muy eficaz en inducir tolerancia específica de péptido *in vivo*. En EAE este protocolo no solamente prevenía la enfermedad de los animales, sino que incluso reducía de forma eficaz la aparición y gravedad de todas las recidivas posteriores cuando se daba después de inducción de la enfermedad, lo que indica que la tolerancia específica puede regular negativamente una respuesta autoinmunitaria en curso (Kohm y Miller 2005, Int. Rev. Immunol. 24:361). De forma más relevante al tratamiento de MS, los estudios en EAE han demostrado que puede inducirse simultáneamente tolerancia a múltiples epítomos usando un cóctel de péptidos de mielina encefalitogénicos, proporcionando por tanto la capacidad de abordar células T auto-reactivas con múltiples especificidades. Este régimen de tolerancia periférica específica de antígeno es superior a la inducción de tolerancia por administración oral, subcutánea o intraperitoneal de antígeno y también ha demostrado ser segura y eficaz en otros modelos experimentales de diferentes enfermedades autoinmunitarias dirigidas por células T y en rechazo de aloinjertos. La tolerización de células T humanas por APC autólogas acopladas a antígeno tratadas con ECDI es eficaz *in vitro* como se muestra por el fallo de las células T tolerizadas de proliferar o producir citoquinas Th1 y una expresión disminuida de moléculas co-estimuladoras sobre estas células (Vandenbark et al. 2000, Int. Immunol. 12:57). Existen evidencias de que están implicados al menos dos mecanismos distintos en la inducción de tolerancia específica de antígeno por este régimen. 1) Tolerancia directa donde clones Th1 que se encuentran con complejos

nominales de antígeno/MHC sobre APC fijadas químicamente se anergizaban como resultado del fallo de recibir co-estimulación adecuada mediada por CD28 (Jenkins y Schwartz.1987, J. Exp. Med. 165:302) y 2) un mecanismo indirecto (tolerancia cruzada) donde se induce tolerancia volviendo a procesar y volviendo a presentar los antígenos por APC hospedadoras (Turley y Miller, 2007, J. Immunol 178:2212). El tratamiento de células con ECDI induce apoptosis en un porcentaje sustancial de células tratadas. Por tanto, es probable un mecanismo indirecto que implica APC fijadas que experimentan apoptosis, que después se procesan y se vuelven a presentar por APC hospedadoras. Esto está apoyado adicionalmente por la inducción eficaz de tolerancia en ratones deficientes en MHC y allogénicos. Las células dendríticas derivadas de médula ósea *in vitro* fagocitan y procesan de forma eficaz APC fijadas pulsadas con antígeno.

Elección de péptidos para tolerización: Basándose en el fundamento de que las células T que reconocen péptidos de mielina con alta avidéz funcional podrían ser más relevantes para el proceso autoinmunitario en MS, recientemente nos hemos centrado en células T específicas de mielina de alta avidéz y hemos empleado 16 péptidos de mielina derivados de MBP, PLP, MOG y CNPasa (Bielekova et al. 2004, J. Immunol. 172:3893). En resumen, estos estudios demostraron lo siguiente: (1) las células T específicas de mielina de alta avidéz son claramente más frecuentes en pacientes con MS que en controles; (2) la mayoría de estas células T se obtienen de la combinación de células T de memoria y (3) expresan un fenotipo de citoquinas Th1; (4) solamente los epítomos de mielina MBP 13-32, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55 contribuían a la reactividad aumentada observada en pacientes con MS y (5) cada uno de esos péptidos contra los que están principalmente dirigidas las células T de alta avidéz, se predicen como un mal agente de unión a los alelos principales HLA-DR asociados a MS, lo que indica que los péptidos de mielina que se unen mal a alelos DR asociados a MS de forma menos probable inducen selección negativa en el timo. Debe apreciarse que el péptido MBP 83-99 se incluirá porque este péptido ha demostrado ser inmunodominante en pacientes con MS en muchos estudios previos y un ensayo en fase III con MBP 82-98 i.v. está actualmente en progreso.

ETIMS es una terapia de tolerización basada en células que implica células presentadoras de antígeno autólogas pulsadas con un conjunto específico de péptidos de mielina en presencia de un agente de acoplamiento químico. Esta terapia es, en muchos aspectos, novedosa y única. Esto incluye a) el uso de un conjunto de péptidos que cubre los epítomos inmunodominantes de esas proteínas de mielina, que se abordan por la respuesta de células T autoinmunitarias de alta avidéz en MS, b) diferente a todas las demás terapias de tolerización, ETIMS demostró evitar la propagación de epítomos, es decir, la ampliación de la respuesta autoinmunitaria a otros epítomos diana, c) basándose en el ensayo extensivo en animales, se espera que ETIMS sea más segura y más eficaz que esas terapias de tolerización que están actualmente en ensayo clínico en MS, es decir, la administración de un único péptido soluble por vía intravenosa por BioMS y administración intramuscular de un plásmido que codifica un péptido de mielina junto con una citoquina Th2 por Bayhill Pharmaceuticals, d) se espera que solamente se requiera un único tratamiento, lo que representa una ventaja principal con respecto a la aceptación del paciente.

La especificidad, ausencia de efectos secundarios y administración en una única vez se consideran ventajas principales de este tratamiento.

La estrategia científica sigue dos objetivos principales: 1. Establecer la eficacia y seguridad de ETIMS como tratamiento de tolerización en MS prematura y 2. Establecer el mecanismo *in vivo* preciso de acción de ETIMS. Estos estudios mecanicistas incluirán la exploración de poblaciones celulares más selectivas para la tolerización, por ejemplo, células dendríticas inmaduras, células B, otras, para mejorar tanto la eficacia como nuestra posición de propiedad intelectual.

Idealmente, la tolerancia inmunitaria específica de péptido debe conseguirse de forma prematura en la fase inflamatoria de la enfermedad, donde el bloqueo de la respuesta inmunitaria auto-reactiva puede inhibir la diseminación y propagación de la enfermedad y puede prevenirse la discapacidad irreversible. Por lo tanto, el grupo de pacientes diana es pacientes con MS recidivante-remite de forma prematura en el curso de la enfermedad o incluso pacientes que presentan un primer evento clínico que sugiere MS, es decir, síndromes clínicamente aislados (CIS). En este punto temporal, los pacientes con MS generalmente tienen un bajo grado de discapacidad neurológica, que les permite participar en todas las actividades de la vida diaria y trabajar sin compromiso significativo.

Un aspecto adicional de la invención es un producto medicinal para uso en seres humanos (ETIMS) que contiene células sanguíneas que se han pulsado con uno de los cócteles indicados en la reivindicación 1 y se han fijado con el agente enlazador ECDI. Las células sanguíneas preferidas son glóbulos rojos, las células sanguíneas más preferidas son células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células sanguíneas pueden ser autólogas o allogénicas.

La seguridad, eficacia preliminar y mecanismos *in vivo* de acción de ETIMS en pacientes con MS recidivante-remite de forma prematura pueden demostrarse en un ensayo clínico.

**Proceso de fabricación:**

El proceso de fabricación para las células sanguíneas de acuerdo con la invención se describe a continuación a modo de ejemplo. Debe entenderse que esta descripción no es limitante de ningún modo. Un experto en la materia es capaz de adaptar el ejemplo a necesidades específicas sin ninguna necesidad de ser inventivo. La descripción a continuación es, en particular, fácilmente adaptable a otros tipos de células sanguíneas.

Los excipientes, el tampón de lisis de eritrocitos y la solución de péptidos se producirán por anticipado y se almacenarán a  $< -20$  °C.

*Solución de péptidos*

La solución de péptidos se prepara en la cámara estéril (Categoría A) en el Departamento de Medicina Transfusional. En primer lugar, se pesan 30 ( $\pm$  3) mg de cada péptido individual y se disuelven en 7,5 ml de agua para inyección (concentración final de péptido 4 mg/ml), respectivamente. Después de ello, todos los péptidos se combinan transfiriendo 5 ml de cada solución de péptido individual en un nuevo tubo y añadiendo 5 ml de agua para inyección (volumen total 40 ml) para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de cada péptido individual. Se forman alícuotas de la solución de combinación de péptidos en alícuotas de 1,5 ml (20 alícuotas) en viales NUNC Cryo Tube (NalgeNunc International) estériles y libres de endotoxinas y se almacenan a  $-20$  °C hasta su uso. Se transfieren 5 ml de la solución de combinación de péptidos en una bolsa de sangre que contiene 30 ml de agua para inyección para el ensayo de esterilidad. Se forman alícuotas de 5 ml en 1 ml y se almacenan a  $-20$  °C para posteriores controles de calidad. Las soluciones de combinación de péptidos tienen que pasar el control de esterilidad antes de que puedan usarse en el proceso de fabricación. Se verificará la identidad y presencia de cada péptido individual en la combinación. El tiempo de almacenamiento máximo es de 3 meses.

En el día de la fabricación del producto de fármaco, se transfiere 1 ml de solución de péptido a una bolsa de sangre (P1459, Fresenius; véase IMPD 2.1.P.3.5 *Filling of blood bags in clean room*). El procedimiento se hace en la cámara estéril (Categoría A). La bolsa de sangre que contiene la solución de péptidos se almacena a 4 °C hasta su uso.

*Tampón de lisis de eritrocitos*

La preparación del tampón de lisis de eritrocitos se hace en la cámara estéril en el Departamento de Medicina Transfusional. En resumen, se disuelven 4 g de cloruro amónico EMPROVE® Ph Eur y 0,5 g hidrogenocarbonato potásico EMPROVE® Ph Eur en 50 ml de agua para inyección (Ph Eur). Usando una jeringa de 50 ml, se transfieren 25 ml del tampón de lisis disuelto a una bolsa de sangre a través de un filtro estéril (0,2  $\mu$ m, Millipore). La bolsa de sangre se llena hasta 200 ml con agua para inyección y se almacena a  $-20$  °C hasta su uso. Se llenan dos bolsas. Se transfieren 50 ml de tampón de lisis a una bolsa de sangre para ensayo de esterilidad y se conservan 50 ml a  $-20$  °C para posterior control de calidad. Las soluciones de tampón de lisis de eritrocitos tienen que pasar el control de esterilidad antes de que puedan usarse en el proceso de fabricación. El tiempo de almacenamiento máximo es de tres meses.

*CPD/solución de lavado salino*

En el día del proceso de fabricación, se llenará una bolsa CPD (CompoFlex, Fresenius) que contiene 63 ml de CPD hasta 50 ml con solución salina fisiológica estéril (NaCl al 0,9 %, Baxter). Las bolsas se conectarán por TSCD. Se usa una balanza (PC4000, Mettler) para controlar el peso (500 g). Se producen dos bolsas. Al final del proceso de fabricación, se ensaya la solución de lavado residual para la esterilidad.

*Solución EDC*

En la cámara estéril (Cat. A) se disuelven 200 mg de EDC en 2 ml de agua para inyección. Usando una jeringa estéril, se transfiere 1 ml a una bolsa de sangre (P1459, Fresenius). La bolsa de sangre con la solución EDC se almacena a 4 °C hasta su uso. Se ensaya EDC residual para la esterilidad.

*Recogida de PBMC y plasma*

En el día de la recogida de sangre, se aislarán  $2,5-5 \times 10^9$  PBMC de los pacientes con MS para estudio clasificatorio por leucoféresis convencional, realizada de acuerdo con las políticas y procedimientos del Departamento de Medicina Transfusional. Para la recogida de células, se usa un programa automático normalizado (AutoPBSC) en una máquina de aféresis Cobe Spectra (Cobe Spectra). La AutoPBSC procesa 4500 ml de sangre y enriquece las PBMC en 6 fases de recogida con aproximadamente 10 ml de volumen cada una. En paralelo a la recogida de células, se recogerán 120 ml de plasma autólogo durante el procedimiento de aféresis y se almacenará a 4 °C en una bolsa de sangre convencional. Durante el procedimiento completo de aféresis, se usa ACD-A (Baxter) como anticoagulante para evitar la coagulación de la sangre. El programa AutoPBSC usa ACD-A a 0,083 ml/ml (relación 1:12), sin embargo, la cantidad puede adaptarse dentro de intervalos definidos (0,071-0,1 ml/ml), si fuera necesario.

Al final de la aféresis, se documenta la concentración de ACD-A en el producto celular y el plasma en el registro de producción.

#### *Procesamiento celular*

5 Todas las etapas descritas aquí se hacen manteniendo un sistema cerrado. En la práctica, los excipientes se cargan en bolsas de sangre en la cámara estéril (Categoría A) y se añaden a las células conectando las bolsas usando un soldador estéril de tubos (TSCD®, Terumo). El producto de aféresis se transfiere a una bolsa de sangre convencional (Compoflex P1461 500 ml, Fresenius) soldando los tubos de las bolsas con TSCD®. Se mantiene una  
10 pequeña muestra de retención en la bolsa de sangre original que se usará para el recuento de células después de haber separado las bolsas usando un sellador portátil de tubos (Fresenius NBPI). A continuación, las células se separan del plasma por centrifugación a 300 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). El plasma se retira de la bolsa presionándola hasta una bolsa vacía conectada estéril, usando un extractor de plasma (Baxter). Las  
15 bolsas se separan por un sellador portátil de tubos. Para lisar los eritrocitos, la bolsa que contiene el tampón de lisis de eritrocitos (ACK) se conecta por el TSCD y el sedimento celular se re-suspende en 200 ml de tampón de lisis de eritrocitos y se incuban durante 15 minutos, TA, agitando (3 rpm) en un agitador de plataforma ondulada (Heidolph). Al final del periodo de incubación, las células se lavan con 200 ml de CPD al 12,6 %/solución salina y se centrifugan durante 15 minutos a 200 g a 4 °C. Se retira el sobrenadante de la bolsa presionándola hasta una bolsa vacía, usando un extractor de plasma. Las células se lavan de nuevo con 200 ml de CPD al 12,6 %/solución salina. Las  
20 células se centrifugan durante 15 minutos a 200 g a 4 °C y se retira el sobrenadante de la bolsa. Las células se transfieren a una bolsa de 150 ml (Compoflex 1459, Fresenius) y se recoge una muestra de retención para el recuento celular. Se re-suspenden 1,5-2 x 10<sup>9</sup> PBMC en 10 ml de solución salina y 1 ml de solución de combinación de péptidos que contiene 0,5 mg/ml de cada péptido fabricado GMP añadido. Los péptidos seleccionados (por ejemplo, MBP1, MBP2, MBP3, MBP4, PLP1, MOG1 y MOG2) se usarán para el acoplamiento.  
25 La reacción de acoplamiento se inicia por la adición de 1 ml de 100 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) soluble en agua recién preparado. Después de 1 hora de incubación agitando a 4 °C, las células acopladas al péptido se lavan dos veces con 100 ml de CPD/solución salina y finalmente se re-suspenden en plasma autólogo a una concentración dada por la especificación (1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup> o 1 x 10<sup>7</sup> células/ml). En este momento, se recoge una muestra para el ensayo de liberación antes de la infusión. Las células se comprobarán cuidadosamente para la ausencia de aglutinación. Se infundirán 100 ml de producto celular ETIMS final usando un  
30 kit de transfusión de sangre convencional con filtro en línea (200 µm). El control de las etapas críticas y los intermedios se describen en IMPD 2.2. P.3.4 y el diagrama de flujo (IMPD Figuras 2.1. P.3.3 1-3).

35 El proceso de fabricación completo se realiza con bolsas de sangre convencionales en un sistema funcionalmente cerrado. En la práctica, los péptidos, el tampón de lisis y las soluciones de lavado se cargan en bolsas de sangre convencionales en condiciones estériles y libres de endotoxinas en un laboratorio de cámara estéril con licencia (Categoría A, certificación ISO14644) siguiendo normas GMP estrictas del Departamento de Medicina Transfusional. En el proceso de fabricación, la adición de estos materiales/reactivos se realiza soldando los tubos de las bolsas de sangre respectivas con un soldador estéril de tubos (Terumo TSCD®).

40 El agente de acoplamiento más preferido para el proceso descrito anteriormente es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI) como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, otros agentes de acoplamiento (por ejemplo, basados en diferentes carbodiimidias) también pueden reunir las condiciones.

#### 45 **Validación del proceso de fabricación**

##### *Validación de infraestructura y equipo técnico*

50 Tienen que realizarse varias etapas de validación para asumir que la infraestructura y el equipo técnico son adecuados para el proceso de fabricación. La recogida de células se realizará en una unidad de aféresis tal como el Departamento de Medicina Transfusional, UKE (véase también validación de leucoféresis) siguiendo los SOP. Las células se procesarán en una cámara estéril. Las etapas de lavado, centrifugación e incubación se harán en una cámara estéril, Categoría D (habitación 29) manteniendo al mismo tiempo un sistema cerrado. El sistema se abrirá solamente en la cámara estéril Categoría A. Todos los procedimientos se realizarán solamente con personal capacitado.  
55

Todo el equipo técnico usado para el procesamiento de las células está certificado para su uso pretendido y está mantenido siguiendo los SOP. Se usará solamente el material que ha pasado el control de calidad.

##### 60 *Validación de leucoféresis*

65 La validación del protocolo de aféresis y la caracterización del producto celular se hicieron con aféresis de donantes sanos y pacientes con MS. Todas las aféresis se ejecutaron en una máquina de aféresis CobeSpectra en el Departamento de Medicina Transfusional, UKE. Se ha seleccionado el programa AutoPBSC por varias razones, (Tabla 1). 1) Procesando un volumen de sangre normalizado (4500 ml) se obtuvo un rendimiento suficiente de células. 2) El producto celular tiene alta pureza de células mononucleares en un volumen normalizado del producto

celular. 3) En comparación con el programa manual, el recuento de eritrocitos es más bajo.

**Tabla 1**

Aféresis I	Duración (min)	Volumen de sangre (ml) del paciente	Volumen del producto (ml)	PBMC x 10 <sup>9</sup>	% de linfocitos (dentro de MNC)	% de monocitos (dentro de MNC)
290SA	128	4500	61	5,5	77,6	17,8
IJ1804	86	4552	61	5,1	80,2	13,4
445CO	88	3908	61	5,5	67,7	15,2
978TH	99	5502	61	5,5	62,4	21,5
RM1401	102	5153	60	4,2	71,0	22,8
IJ2801	115	5747	60	2,7	82,6	10,8
1066ST	112	3479	61	5,5	72,9	16,7

#### 5 Validación de lisis de eritrocitos

Aunque el producto de aféresis contiene una cantidad muy baja de eritrocitos, en números absolutos los eritrocitos sobrepasan las células mononucleares de 10 a 40 veces. Por tanto, es necesario lisar los eritrocitos para obtener una pureza mayor del producto celular. Para la lisis de eritrocitos, se usa un tampón de lisis establecido (tampón ACK). Se ensayó la eficacia del tampón de lisis en capas leucocitarias, que contienen una cantidad mucho mayor de eritrocitos en comparación con el producto de aféresis. En capas leucocitarias se consigue lisis eficaz de los eritrocitos (hemoglobina media (Hb) antes de la lisis 10,03 g/dl, después de la lisis 0,63 g/dl; Tabla 2). En las aféresis, el contenido de eritrocitos es mucho más bajo desde el inicio y está por debajo de los valores medibles de la lisis.

**Tabla 2**

Producto	Hb antes de lisis (g/dl)	Hb después de lisis (g/dl)
BC9198169	8,4	0,4
BC9204876	12,6	1,0
BC9247719	9,8	0,5
BC9261124	9,32	0,6

#### Carga de bolsas de sangre en cámara estéril

20 Todos los reactivos se cargarán a través de un tubo estéril que tiene un dispositivo Luer-lock. El tubo se soldará a la bolsa usando un dispositivo estéril de soldadura. Después de haber cargado los reactivos en la bolsa, el tubo se separará usando un sellador portátil de tubos.

#### Cantidad de células

25 La cantidad absoluta de células en el producto en un punto crítico en el proceso de fabricación. Durante el proceso de fabricación, se pierden células (Tabla 3). Por tanto, es esencial definir las cantidades mínimas de células que son necesarias para la producción del producto ETIMS. Estas cantidades de células tienen que comprobarse a través de controles en el proceso. Los criterios de aceptación para las cantidades de células necesarias para el proceso de fabricación se han definido en varias ejecuciones de validación usando capas leucocitarias. En contenido de células de la capa leucocitaria es de aproximadamente  $1 \times 10^9$  células, por tanto, para las ejecuciones de validación, se abordará una cantidad final de células de  $5 \times 10^8$  células. Los recuentos de células se evaluaron antes de empezar el proceso de fabricación, antes de la reacción de acoplamiento y después de la última etapa de lavado. En todas las ejecuciones de validación, puedo alcanzarse el recuento diana de células, cuando la cantidad inicial de células era mayor de  $1,2 \times 10^9$ .

**Tabla 3**

Capa leucocitaria	Duración (min)	Recuento inicial de células	Recuento de células después de la lisis	Recuento de células después del acoplamiento
9261124	320	$16,5 \times 10^8$	$9,95 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$
9247719	330	$17 \times 10^8$	$11 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$
9204876	380	$15 \times 10^8$	$11,4 \times 10^8$	$10 \times 10^8$
9198169	350	$12 \times 10^8$	$8,6 \times 10^8$	$11 \times 10^8$

#### Duración del proceso de fabricación

40 El objetivo era reducir la duración del proceso de fabricación para potenciar la viabilidad y disminuir el riesgo de contaminación microbiológica. Como en varias ejecuciones de validación, no pudieron detectarse cantidades residuales de EDC en la primera solución de lavado después de la reacción de acoplamiento, se redujo una etapa

de lavado después de la lisis de los eritrocitos y una después de la reacción de acoplamiento. Esto condujo a una reducción del proceso de fabricación de aproximadamente 57 minutos. La reducción de la duración del proceso de fabricación iba emparejada a un aumento en la viabilidad celular medida como integridad de membrana por análisis FACS (Ph Eur 2.7.29). La duración media es de 292 minutos (Tabla 4).

5

Tabla 4

Producto	Duración (min)	Recuento inicial de células	Recuento de células después de la lisis	Recuento de células después del acoplamiento
RM1401	295	2 x 10 <sup>9</sup>	1,4 x 10 <sup>9</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>
IJ2801	295	2,5 x 10 <sup>9</sup>	2,2 x 10 <sup>9</sup>	1,8 x 10 <sup>9</sup>
9373085	285	1,3 x 10 <sup>9</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	0,8 x 10 <sup>9</sup>

#### pH

10 El pH medio en el producto después de la re-suspensión en plasma humano fue de pH 7,7 (intervalo 7,6-7,8; n=8). Se usó plasma autólogo en las ejecuciones de validación con producto de aféresis y una tercera parte del plasma coincidente para el grupo sanguíneo en ejecuciones de validación con placas leucocitarias. Se midió el pH en los sobrenadantes de las etapas de lavado. El pH del tampón de lisis es de pH 7,4, el pH del tampón CDP es de pH 5,8.

#### 15 Viabilidad

La viabilidad celular se evaluó midiendo la integridad de membrana por exclusión de azul Tripano y FACS (Ph.Eur. 2.7.29) en diferentes puntos temporales y condiciones de almacenamiento (véase IMPD 2.1.P.8).

#### 20 Unión de péptidos

El objetivo del estudio fue evaluar si se conseguía acoplamiento eficaz de péptidos a la superficie de PBMC en el proceso de fabricación en bolsas.

25 *In vitro* se demostró que la presencia tanto de EDC como de péptido es necesaria para la unión eficaz del péptido a la superficie celular (Figura 2.1.P.3.5-1). Para evaluar la eficacia de la reacción de acoplamiento en el proceso de fabricación en bolsas, se ha remplazado uno de los siete péptidos (PLP139-154) por un péptido biotinilado (biotinaPLP139-154). La unión del péptido a la superficie de las células se ha detectado por FACS y microscopía de fluorescencia usando estreptavidina conjugada con fluoróforo (estreptavidina-Cy3 y estreptavidina-APC respectivamente). En el estudio se demuestra en dos ejecuciones de validación diferentes que el péptido se está uniendo de forma eficaz a la superficie de PBMC durante el proceso de fabricación en bolsas. Un resultado representativo de dos ejecuciones de validación independientes se muestra, por ejemplo, en la Figura 1.

35 Como el volumen de la reacción de acoplamiento podría variar (volumen diana 10 ml) se evaluó la eficacia del procedimiento de acoplamiento en cuatro volúmenes diferentes. A una concentración que varía para PBMC: 1 x 10<sup>7</sup> - 0,33 x 10<sup>7</sup> células / ml; para EDC: 100 mg/ml - 33 mg/ml y para la combinación de péptidos a 0,05 mg/ml - 0,017 mg/ml de péptido, la unión es eficaz. Una reducción adicional de la concentración reduce la eficacia de unión por debajo de los niveles aceptados. Por tanto, es aceptable un intervalo de volumen de 10-20 ml para el procedimiento de acoplamiento.

40

#### Esterilidad

La esterilidad se mantuvo en cinco ejecuciones de validación independientes. Se ensayaron muestras para bacterias aeróbicas y anaeróbicas y hongos.

45

#### Endotoxinas

Se ensayaron soluciones finales de lavado de tres ejecuciones de validación para la presencia de endotoxinas (Pyrogene®, Lonza). No se pudieron detectar endotoxinas (<0,5 EU/ml) en el sobrenadante de la última solución de lavado antes de la resuspensión de las células en plasma autólogo. La presencia de endotoxinas no puede evaluarse en plasma humano, ya que el plasma inhibe el ensayo.

50

#### Agregados

55 Se tomaron varias medidas para asegurarse contra la presencia de agregados.

a) No se observaron agregados por inspección visual en ninguno de los productos en las ejecuciones de validación (n=14). Se simuló la infusión en la mesa de ensayo con el kit de transfusión de sangre con un filtro en línea (200 µm) que se usará para los pacientes. No se observaron agregados en el filtro después de haber

pasado las células. Para asegurarse adicionalmente contra los agregados, se contó la concentración celular antes y después de haber pasado a través del filtro y no se pudo observar ninguna diferencia (n=2).

5 b) Se evaluó la presencia de agregados por microscopía en un frotis de sangre o después de transferir células a una placa de cultivo celular. No se observó ninguna diferencia en comparación con células no tratadas.

10 c) Para detectar y cuantificar micro-agregados, se analizaron varios productos (n=5) por FACS. Evaluando el área de dispersión directa (FSC-A) y la anchura de dispersión directa (FSC-W) no pudo detectarse mayor frecuencia de micro-agregados en el producto celular en comparación con las células antes del tratamiento con EDC. La frecuencia de agregados no aumentó durante el periodo de almacenamiento de 4 horas.

15 d) La inyección de producto humano (ETIMS) en ratones (n=20) no condujo a embolia, a causa de agregados en ninguno de los ratones.

15 *Identidad*

20 Se analizó la composición celular del producto de aféresis y el producto de fármaco final, con el objetivo de evaluar diferencias en la composición celular final del producto de fármaco resultante del procesamiento de las células. Una caracterización fenotípica clara del producto final está impedida por el tratamiento de las células, muy probablemente a causa de que los tratamientos químicos alteran la estructura diana para los anticuerpos específicos. Por tanto, se fenotipará el producto celular antes del procesamiento de las células para evaluar si la relación entre diferentes poblaciones (células T, células B, monocitos) tiene influencia sobre el resultado del tratamiento. El objetivo es establecer los criterios de aceptación para el desarrollo adicional del producto de fármaco.

25 *Seguridad preclínica*

30 Estudios en animales: Se usaron dos configuraciones experimentales diferentes para la evaluación de toxicidad. 1) El ensayo toxicológico del producto humano puede evaluarse solamente a corto plazo a causa de la inmunotoxicidad cuando se ensaya en diferentes especies. Por tanto, se evaluó la toxicidad a corto plazo del producto humano en ratones inmunocomprometidos (inmunodeficiencia combinada severa; SCID). 2) Se evaluó la toxicidad a plazo medio de esplenocitos singénicos acoplados con los siete péptidos de mielina usados en el ensayo, en el modelo SJL.

35 Ambos estudios toxicológicos se realizaron por el LPT Laboratory of Pharmacology and Toxicology GmbH & Co. KG, Redderweg, Hamburgo, un laboratorio certificado por GLP.

**Estudio de toxicidad aguda de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) acopladas a péptido humano y plasma humano por única administración intravenosa a ratones SCID (LPT 22043).**

Artículo de ensayo	1 x 10 <sup>9</sup> PBMC humanas acopladas químicamente a siete péptidos de mielina (MBP13-32 (MBP1), MBP83-99 (MBP2), MBP111-129 (MBP3), MBP146-170 (MBP4), MOG1-20 (MOG1), MOG35-55 (MOG2), PLP139-154 PLP1) resuspendidas en 100 ml de plasma humano. El plasma humano sirvió como control
Cantidad de experimentos	Dos diferentes, a dos puntos temporales independientes, PBMC acopladas a péptido humano fabricado (Producto A y Producto B)
Cantidad de animales por experimento	5 machos y 5 hembras recibieron células acopladas a péptido, 1 macho y 1 hembra recibieron plasma humano como control
Inyección intravenosa	Dosis/aprox. 15 segundos
Volumen de administración	200 ml i.v.
Dosis	2 x 10 <sup>6</sup> PBMC humanas acopladas a péptido
Peso corporal (al inicio del tratamiento)	
Machos:	17-22 g
Hembras:	15 - 17 g
Edad (al inicio del tratamiento)	
Machos:	41 - 48 días
Hembras:	41 - 48 días
Identificación del animal	Por marcas coloreadas y etiqueta de la jaula
Duración del experimento	Al menos 5 días de adaptación 1 día de ensayo 24 horas de periodo de recuperación
Evaluación	Se realizaron observaciones para todos los animales y se registraron sistemáticamente (con registros individuales mantenidos para cada animal) antes e inmediatamente, 5, 15, 30 y 60 min., así como 3, 6 y 24 horas después de la administración.

Observación	Se observaron cambios de piel y pelos, ojos y membranas mucosas, función respiratoria y circulatoria, sistema nervioso autónomo y central y actividad somatomotora, así como el patrón de comportamiento. Se puso atención a posibles temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño y coma. Se hicieron observaciones sobre la mortalidad emprendiendo acciones apropiadas para minimizar la pérdida de animales durante el estudio.
Mediciones	Se registraron los pesos corporales individuales antes de la administración del artículo de ensayo y después de 24 horas. Se calcularon y registraron los cambios en el peso.
	Al final de los experimentos todos los animales se sacrificaron en anestesia con éter cortando la aorta abdominalis, se exanguinaron, se pesaron, se diseccionaron e inspeccionaron macroscópicamente bajo la dirección de un patólogo.

**Resultados resumidos**

- 5 En las presentes condiciones de ensayo, inyecciones intravenosas únicas de 200 µl de PBMC periférica acoplada a péptido humano (Producto A), PBMC acopladas a péptido humano (Producto B) o plasma humano a ratones no condujeron a ningún signo de toxicidad. No apareció mortalidad.

Síntomas/Criterio	Producto A		Producto B		Plasma humano	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
Signos clínicos	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
Mortalidad en 6 h	0	0	0	0	0	0
en 24 h	0	0	0	0	0	0
Peso corporal medio al inicio	18,6	15,6	20,4	16,2	20,5	17,0
después de 24 h	19,0	15,8	20,6	16,4	20,5	17,5
Inhibición de ganancia de peso corporal	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
Hallazgos en la necropsia *	ninguno	2 de 5	4 de 5	4 de 5	2 de 2	2 de 2

\* Se observó un tamaño de bazo reducido en 0 de 5 animales machos y en 2 de 5 animales hembra tratados con Producto A, en 4 de 5 animales macho y en 4 de 5 animales hembra tratados con Producto B y en 2 de 2 animales macho y en 2 de 2 animales hembra tratados con plasma humano.

**Estudio de toxicidad aguda de esplenocitos acoplados a péptidos por administración intravenosa única a ratones SJL (LPT 21988)**

Artículo de ensayo	Esplenocitos singénicos acoplados químicamente a siete péptidos de mielina (MBP13-32 (MBP1), MBP83-99 (MBP2), MBP111-129 (MBP3), MBP146-170 (MBP4), MOG1-20 (MOG1), MOG35-55 (MOG2), PLP139-154 (PLP1)) resuspendidos en PBS.
Cantidad de experimentos	1
Cantidad de animales por experimento	5 machos y 5 hembras recibieron esplenocitos acoplados a péptidos
Inyección intravenosa	Dosis/aprox. 15 segundos
Volumen de administración	200 µl i.v.
Dosis	5 x 10 <sup>7</sup> esplenocitos acoplados a péptidos
Peso corporal (al inicio del tratamiento)	
Machos:	17-19 g
Hembras:	17-18 g
Edad (al inicio del tratamiento)	
Machos:	43 días
Hembras:	43 días
Identificación del animal	Por marcas coloreadas y etiqueta de la jaula
Duración del experimento	Al menos 5 días de adaptación 1 día de ensayo
	2 semanas de periodo de recuperación
Evaluación	Se realizaron observaciones para todos los animales y se registraron sistemáticamente (con registros individuales mantenidos para cada animal) antes e inmediatamente, 5, 15, 30 y 60 min., así como 3, 6 y 24 horas después de la administración.

Observación	Se observaron cambios de piel y pelos, ojos y membranas mucosas, función respiratoria y circulatoria, sistema nervioso autónomo y central y actividad somatomotora, así como el patrón de comportamiento. Se puso atención a posibles temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño y coma. Se hicieron observaciones sobre la mortalidad emprendiendo acciones apropiadas para minimizar la pérdida de animales durante el estudio.
Mediciones	Se registraron los pesos corporales individuales antes de la administración del artículo de ensayo y después de 24 horas. Se calcularon y registraron los cambios en el peso. Al final de los experimentos todos los animales se sacrificaron en anestesia con éter cortando la aorta abdominalis, se exanguinaron, se pesaron, se diseccionaron e inspeccionaron macroscópicamente bajo la dirección de un patólogo.

**Resultados resumidos**

5 En las presentes condiciones de ensayo, una única inyección intravenosa de  $5 \times 10^7$  esplenocitos acoplados a péptidos ha ratones no condujo a ningún signo de toxicidad. No apareció mortalidad. Todos los animales ganaron el peso corporal esperado en todo el periodo completo del estudio.

Síntomas/Criterio	5 x 10 <sup>7</sup> células/animal i.v. n=5	
	machos	hembras
Signos clínicos	ninguno	ninguno
Mortalidad en 6 h	0	0
en 24 h	0	0
en 7 d	0	0
en 14 d	0	0
Peso corporal medio al inicio	18,2	17,6
después de 7 d	19,8 (+8,8)	18,4 (+29,2)
después de 14 d	22,4 (+23,1)	20,6 (+37,8)
Inhibición de ganancia de peso corporal	ninguno	ninguno
Hallazgos en la necropsia	ninguno	ninguno
D = días H = horas En paréntesis: ganancia de peso corporal en %, en comparación con el valor al inicio i.v.= intravenoso		

10 *Análisis in vitro con células humanas:* El tratamiento se administra solamente una vez a los pacientes y se está administrando por la vía i.v. tolerogénica con células que experimentan apoptosis. Por tanto, existe poca preocupación de que se induzca una respuesta citotóxica/anafiláctica después de la administración de las células. Se ensaya una posible reacción entre las células tratadas y las células T del paciente receptor *in vitro* por una reacción de linfocitos mixta antes del estudio en donantes sanos y pacientes con MS. Estos ensayos documentan la proliferación, así como la liberación de citoquinas.

15 Ensayos de proliferación contra el antígeno usado en el ensayo generarán TCL a corto plazo. Estas células T específicas de antígeno se co-cultivan con APC acopladas a antígeno fijado con ECDI autólogas en una placa de cultivo de 24 pocillos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % a una relación de 1:1 a 1:2 (T:APC) con un total de 2-4 x 10<sup>6</sup> células mezcladas totales. Después de 24 h las mezclas celulares cultivadas se recogen y aplican a un gradiente de Ficoll para aislar las células viables. Después de lavar en medio de cultivo (RPMI 1640) las células vivas se vuelven a mezclar con antígeno en presencia de APC y se evalúan para la proliferación, estado de activación por FACS, secreción de citoquinas (IL-2, IL-4, IFN-g, IL-17) y expresión de ARNm de citoquinas. Dependiendo de la cronología de la re-estimulación, podría esperarse inducción por anergia y/o inducción de muerte celular inducida por activación (AICD). Dichos casos deben documentarse apropiadamente.

25 El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de PBMC acopladas a péptidos sobre la activación inmunitaria de PBMC *in vitro*. Las PBMC de pacientes con MS (n=2) y un control sano se cultivaron en presencia de PBMC acopladas a péptido y se analizaron para la respuesta de proliferación por incorporación de timidina y secreción de citoquinas (IL12, IFN-γ, IL10, IL1β, TNF-α) usando una serie basada en FACS (FlowCytomix, Bendermedsystems).

30 Para evaluar la proliferación celular en respuesta a células acopladas a péptidos, se sembraron PBMC en dos placas de 96 pocillos a 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en IMDM completo que contenía 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina, L-glutamina 2 mM, suero humano descomplementado por calor al 5 %. A los pocillos

respectivos, se les añadieron  $5 \times 10^4$  PBMC tratadas con EDC en presencia de los 7 péptidos usados en el ensayo (=PBMC acopladas a péptidos, tAPC<sub>pep</sub>),  $5 \times 10^4$  PBMC tratadas con EDC pero sin péptido (tAPC), 2,5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) o sin estímulo adicional (APC).

- 5 La presencia de células acopladas a péptidos no indujo proliferación en PBMC en comparación con PBMC no estimuladas o PBMC estimuladas con PHA (Figura 3).

10 También se analizó la presencia de citoquinas inflamatorias después de 3 horas y 24 horas. En resumen, se cultivaron PBMC durante una noche en IMDM completo que contenía 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina, L-glutamina 2 mM, suero humano descomplementado por calor al 5 %, en presencia de 2,5 µg/ml de PHA o sin estímulo. Después de 24 horas, las células se lavaron en IMDM completo y se sembraron en una placa de 24 pocillos ( $4 \times 10^6$ /ml) en presencia de PBMC tratadas con EDC y los 7 péptidos usados en el ensayo (=PBMC acopladas a péptidos, tAPC<sub>pep</sub>),  $1 \times 10^6$  PBMC tratadas con EDC, pero sin péptido (tAPC), 2,5 µg/ml de PHA (PHA) o sin estímulo adicional (APC).

15 Como se representa en la Figura 4 y en la Figura 5, no existe inducción significativa de citoquinas inflamatorias en presencia de PBMC acopladas a péptidos en comparación con el control negativo (APC).

20 En la Figura 5 se representan las concentraciones de citoquinas sin control de PHA.

Para analizar si la respuesta a células acopladas a péptidos difiere dependiendo del estado de activación de las células, se pre-activaron las PBMC con PHA durante 24 horas y se añadieron a las PBMC acopladas a péptidos. No se observó ninguna inducción de proliferación (Figura 6) o de citoquinas (Figura 7) en respuesta a células acopladas a péptidos.

25 En resumen, no se observó ninguna activación de células inmunitarias inducidas por la presencia de células acopladas a péptidos *in vitro*. Este resultado se correlaciona bien con la experiencia que nosotros y otros (34) hemos hechos con tolerización de clones de células T humanas *in vitro* y la inducción de tolerancia con células acopladas a péptidos *in vivo* en diferentes modelos animales.

30 *Potencia de células acopladas a péptidos humanos in vitro*

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de células acopladas a péptidos sobre la respuesta específica de antígeno de células T humanas. Se usó un clon de células T (TCC) obtenido de fluido cefalorraquídeo (CSF) de un paciente con MS durante recidiva. En resumen, se cultivaron TCC ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) en IMDM completo (que contenía 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina, L-glutamina 2 mM, suero humano descomplementado por calor al 5 %) y pulsado con el péptido (MSI118) en presencia de PBMC irradiadas ( $1 \times 10^5$  células/pocillo). Se añadieron PBMC acopladas a péptidos (MSI118, 10 µg/ml) a los pocillos a diferentes concentraciones celulares. La respuesta proliferativa de las TCC se midió por incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina después de 72 horas (Figura 8).

La incubación de TCC con el péptido específico en presencia de células acopladas a antígeno reduce la respuesta específica de antígeno medida por incorporación de timidina de un modo dependiente de la dosis.

45 Para excluir una inhibición tóxica de las células acopladas a péptidos sobre los TCC se añadió IL-2 o anticuerpo monoclonal anti-CD28 a los pocillos respectivos. Como se representa en la Figura 9, la proliferación de los TCC puede recuperarse por la adición de IL-2 o el anticuerpo anti-CD28 en presencia de células acopladas a péptidos.

50 Se ha sugerido que fijando células presentadoras de antígeno pulsadas con péptido, no puede formarse una sinapsis inmunológica y se induce anergia en células T auto-reactivas a través de la presentación del péptido a través del MHC sin co-estimulación. La sinapsis inmunológica se refiere al motivo espacialmente organizado de proteínas de membrana y moléculas citosólicas que se forma en la unión entre la célula T y una célula presentadora de antígeno.

55 Para explorar adicionalmente la invención, se analiza la formación de la sinapsis inmunológica por microscopia de fluorescencia y analizando los parámetros biofísicos (por ejemplo, flujo entrante de calcio) que caracteriza la interacción TCR MHC.

60 Hasta ahora no está claro a partir de la bibliografía, ni de ningún modelo animal, ni de estudios humanos, el subconjunto de células presentadoras de antígeno que es más importante en el proceso de tolerización. Se examina esta cuestión analizando la potencia del régimen descrito anteriormente, después de aislar células específicas de la población de PBMC. El aislamiento de las células se realiza usando columnas con perlas marcadas o con un clasificador celular.

65

**Definición de péptidos de mielina**

Los péptidos de mielina descritos específicamente en esta solicitud se caracterizan por las siguientes secuencias:

- 5                    **MBP 13-32**        (Seq ID 01): KYLATASTMDHARHGFLPRH
- MBP 83-99**        (Seq ID 02): ENPVVHFFKNIVTPRTP
- MBP 111-129**    (Seq ID 03): LSRFSWGAEGQRPGFGYGG
- MBP 111-129**    (Seq ID 04): AQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR
- 10                   **PLP 139-154**    (Seq ID 05): HCLGKWLGHDPKFGVI
- MOG 1-20**        (Seq ID 06): GQFRVIGPRHPIRALVGDEV
- MOG 35-55**       (Seq ID 07): MEVGWYRPPFSRVVHLYRNGK
- MBP 82-98**       (Seq ID 08): DENPVVHFFKNIVTPRT

15 Las secuencias definidas anteriormente incluyen diferentes modificaciones finales de los péptidos, por ejemplo, acetilación, amidación, carboxilación.

**Ejemplo:**

20 Se aíslan  $1,5-2 \times 10^9$  células mononucleares de sangre periférica de un paciente con MS. Las células aisladas se acoplan de acuerdo con el proceso de fabricación descrito anteriormente con un cóctel de los siguientes péptidos MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55. La suspensión resultante de aproximadamente  $10^9$  células suspendidas en 100 ml de agua tamponada hasta pH 7,2-7,8 se infunde por vía intravenosa al paciente. Los exámenes MRI realizados antes y después de la aplicación (por ejemplo, 1 día, 25 1 semana, 1 mes, 6 meses, 1 año después de la aplicación) demuestran de forma convincente la eficacia del procedimiento en términos de reducción de la inflamación del SNC. Los hallazgos de MRI están en línea con otros síntomas clínicos.

30 Los expertos en la materia apreciarán que la descripción relacionada con el proceso de fabricación (incluyendo todos los ensayos y etapas de validación) se proporciona como ejemplo y sin intención de limitar de ningún modo la invención. De hecho, el experto en la materia podrá llevar a cabo la invención descrita anteriormente aunque también modificarla en diversos aspectos en función de su conocimiento general, sin ninguna necesidad de ser inventivo.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Yeda Research And Development Co. Ltd. ELINAV, Eran SEGAL, Eran
- 40 <120> RESPUESTA DEL MICROBIOMA CONTRA AGENTES
- <130> 62208
- <150> US 62/048.065
- 45 <151> 09-09-2014
- <150> US 62/050.939
- <151> 16-09-2014
- 50 <150> US 61/984.944
- <151> 28-04-2014
- <160> 4
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 28
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- 65 <220>
- <221> misc\_feature

# ES 2 601 329 T3

<222> (1)..(8)

<223> El cebador n con código de barras representa una base con código de barras

<400> 1

5 nnnnnnnnag agtttgatcc tggctcag 28

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15 <400> 2

tgctgcctcc cgtaggagt 19

<210> 3

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

25 <400> 3

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 4

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 4

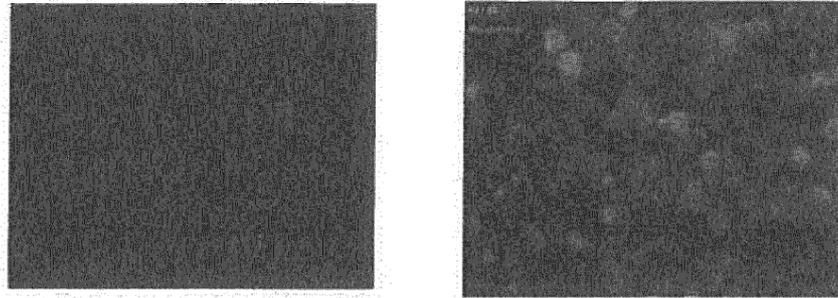
tgctgcctcc cgtaggagt 19

40

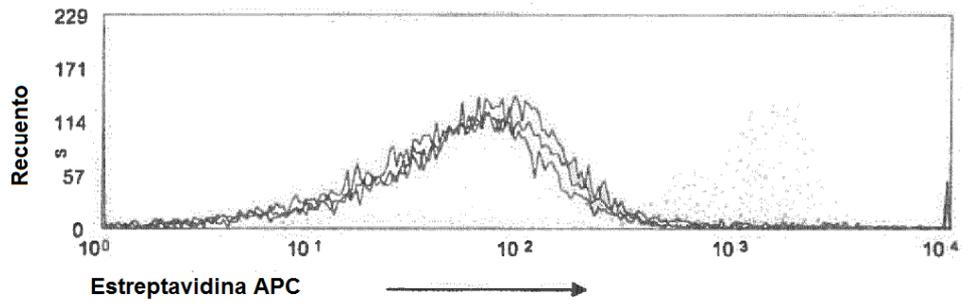
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula sanguínea que se selecciona de una célula mononuclear de sangre periférica humana o de un glóbulo rojo humano que están químicamente acoplados a un cóctel de péptidos en donde el cóctel se selecciona de
- 10 a) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55  
b) MBP 13-32, MBP 82-98, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55  
c) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20, MOG 35-55 y MBP 82-98  
d) MBP 13-32, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55.
- 15 2. Una célula sanguínea de acuerdo con la reivindicación 1, que es un glóbulo rojo humano.
3. Una célula sanguínea de acuerdo con la reivindicación 1, que es una célula mononuclear de sangre periférica humana.
- 20 4. Una célula sanguínea de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3, en la que el acoplamiento químico se consigue mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI).
5. Un proceso para la fabricación de una célula sanguínea de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3, que contiene las etapas de aislar células mononucleares de sangre periférica o glóbulos rojos de un ser humano, añadiendo uno de los cócteles seleccionados de
- 25 a) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55  
b) MBP 13-32, MBP 82-98, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55  
c) MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20, MOG 35-55 y MBP 82-98  
d) MBP 13-32, MBP 111-129, MBP 146-170, PLP 139-154, MOG 1-20 y MOG 35-55.
- 30 y  
añadir posteriormente el agente de acoplamiento.
- 35 6. Una composición farmacéutica que contiene células sanguíneas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3 para administración sistémica, especialmente para administración i.v.
7. Un producto médico que contiene al menos una célula sanguínea de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3.
- 40 8. El uso de células sanguíneas de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple.
9. El uso de células sanguíneas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** las células son células alogénicas.
- 45 10. El uso de células sanguíneas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** las células son células autólogas.

Fig. 1/9:



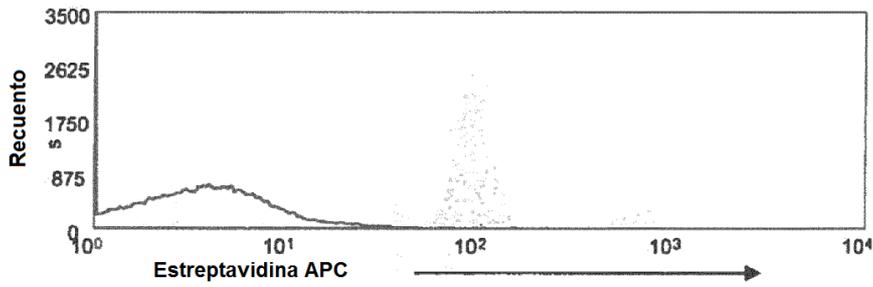
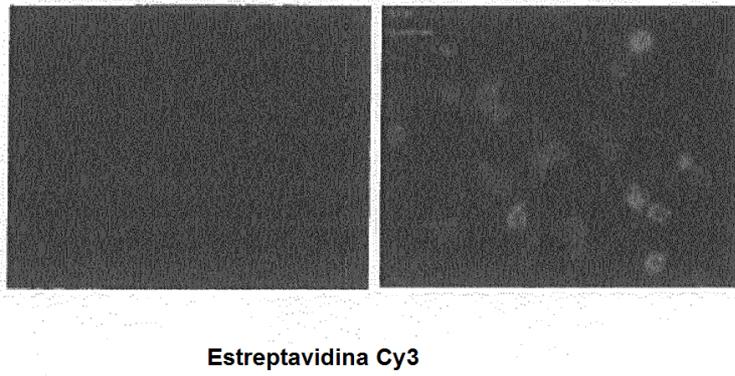
Estreptavidina Cy3



	biotina PLP130-154	EDC
1 Histograma abierto	-	-
2 Histograma abierto	-	+
3 Histograma abierto	+	-
4 Histograma relleno	+	+

Las células se pulsaron *in vitro* en presencia o ausencia de biotinaPLP, EDC o ambos. Solamente en presencia de EDC y también biotinaPLP se detectó el péptido sobre la superficie de las células.

Fig.: 2/9



Histograma abierto      PBMC después de lisis, antes de reacción de acoplamiento

Histograma relleno      Producto (PBMC después de reacción de acoplamiento)

El péptido de biotina se une de forma eficaz a las células durante el proceso de fabricación en bolsas.

Fig. 3/9:

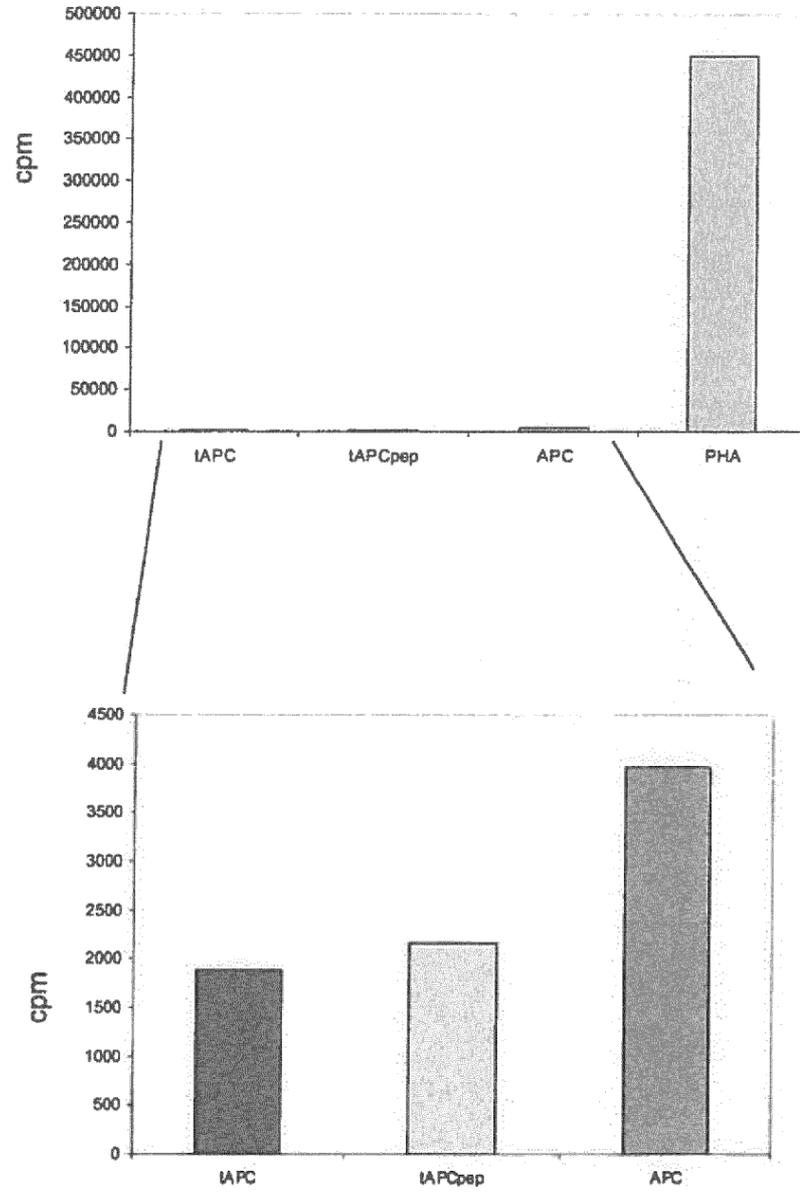


Fig. 4/9:

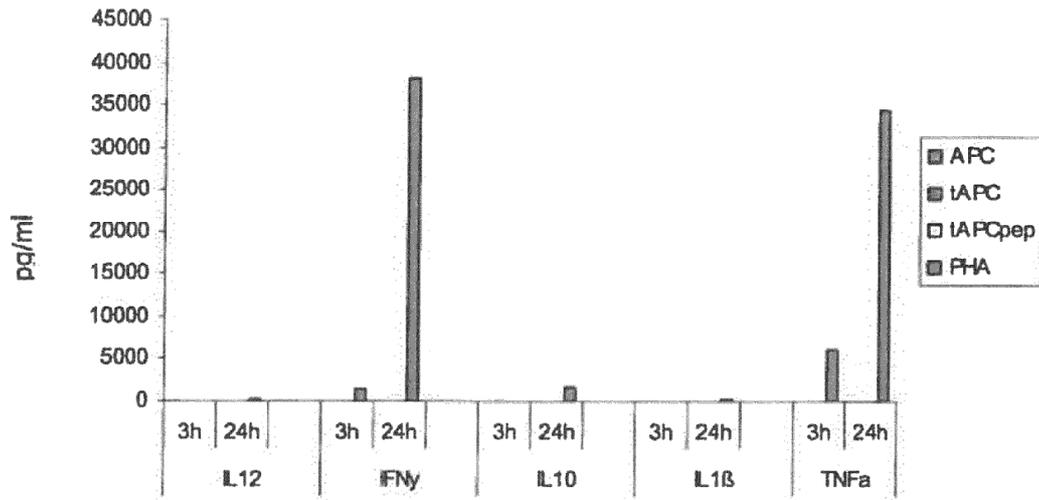
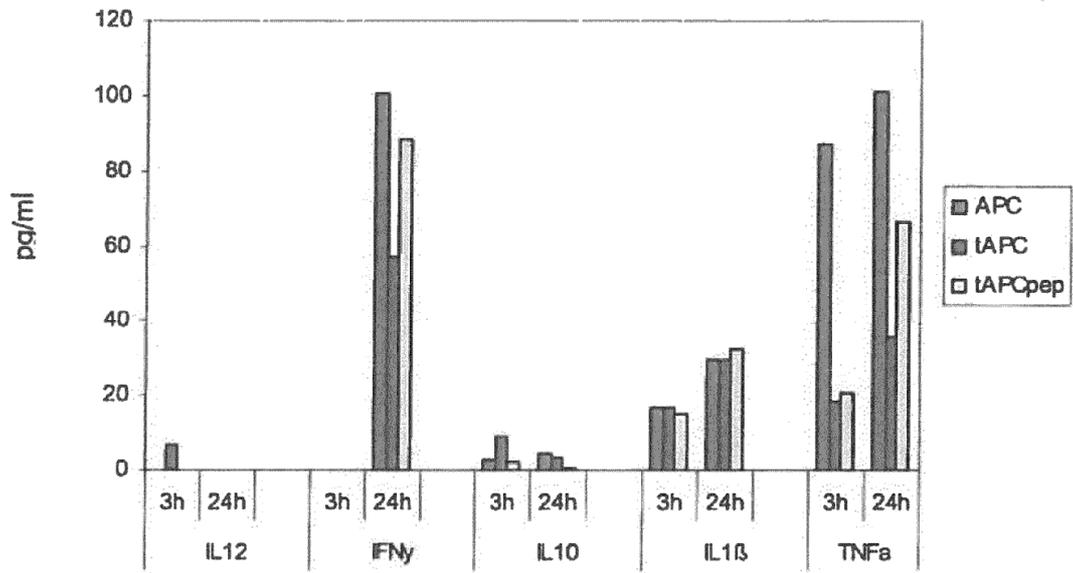
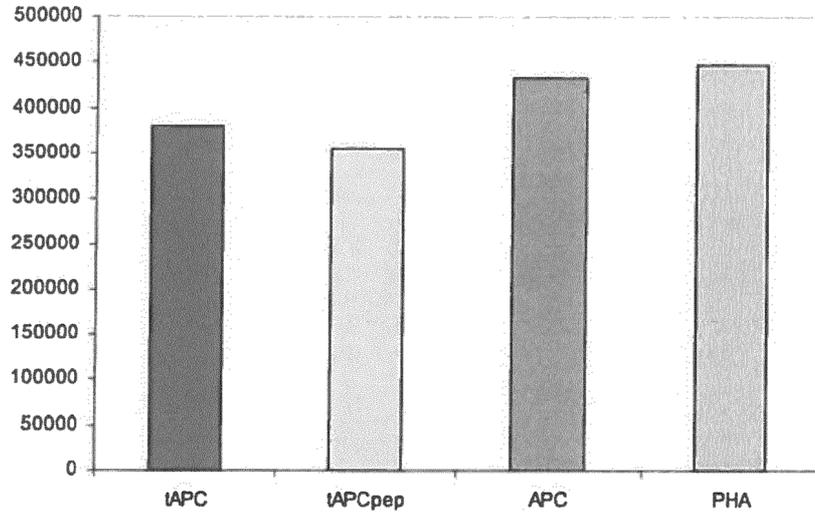


Fig. 5/9:



**Fig. 6/9:**



Respuesta de citoquinas en PBMC pre-activadas con PHA y cultivadas en presencia de APC, tAPC o tAPCpep.

Fig. 7/9:

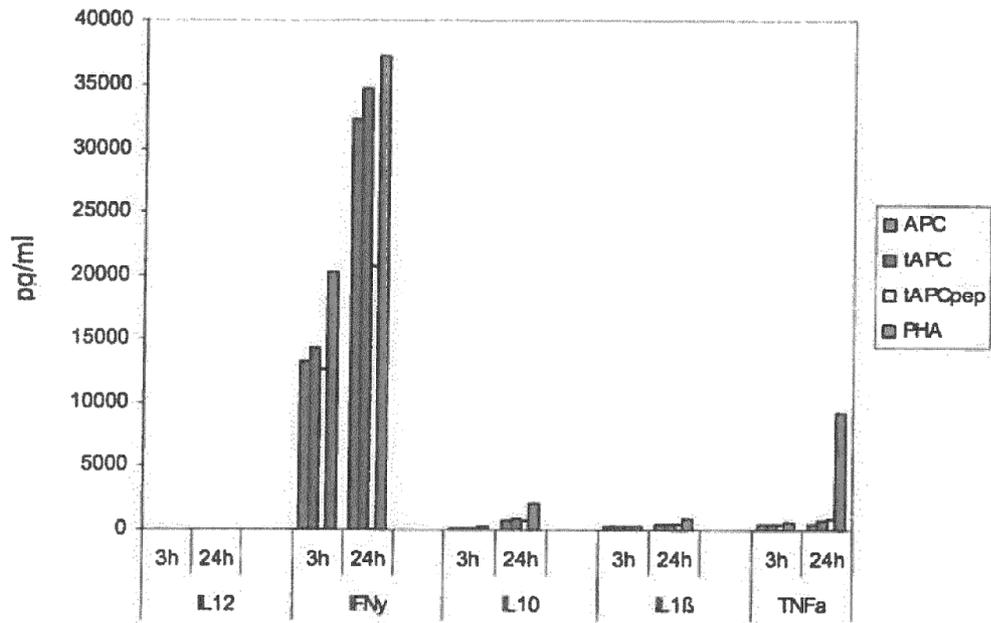


Fig. 8/9:

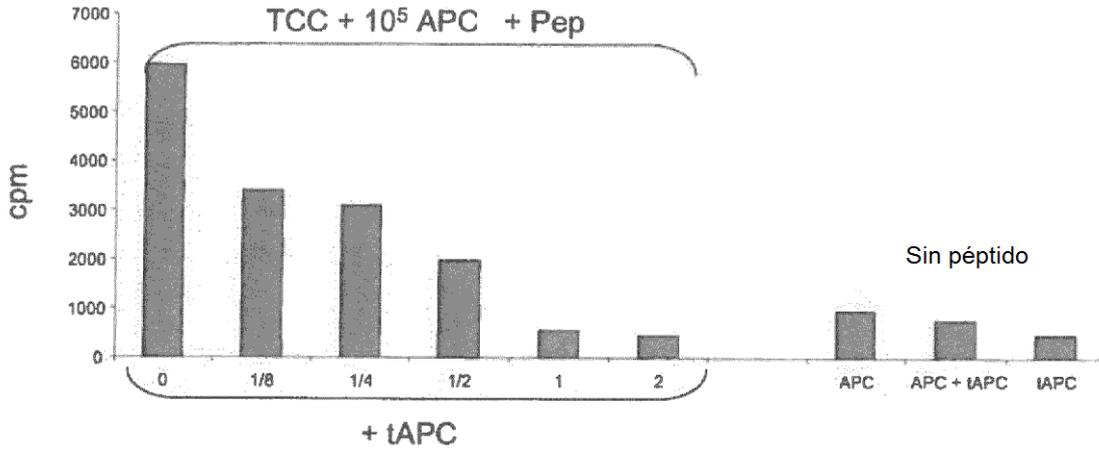


Fig. 9/9:

