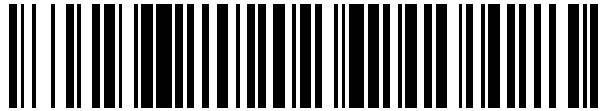


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 583**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 38/21	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2008 PCT/EP2008/064066**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09050283**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08838676 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2205720**

54 Título: **Composiciones para tratar la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

17.10.2007 EP 07301475
17.10.2007 US 873623

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

TXCELL (100.0%)
LES CARDOULINES ALLEE DE LA NERTIERE
SOFIA ANTIPOLIS
06560 VALBONNE, FR

72 Inventor/es:

FOUSSAT, ARNAUD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 618 583 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

Composiciones para tratar la esclerosis múltiple

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la esclerosis múltiple. Más particularmente, se refiere a un medicamento que comprende células Tr1 dirigidas contra el antígeno asociado a esclerosis múltiple.

10

Antecedentes

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria crónica y desmielinizante del sistema nervioso central. Los signos histopatológicos de la enfermedad incluyen la infiltración focal de ambas células T CD4+ y CD8+ junto con otras células inflamatorias en la sustancia blanca y la desmielinización con evidencia de algún daño axonal. Las proteínas de la mielina que se piensa que son el blanco de una respuesta inmune en la esclerosis múltiple incluyen la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteolípida (PLP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y la proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG).

15

En los seres humanos se dispone ahora de una variedad de enfoques terapéuticos para tratar la esclerosis múltiple. Sin embargo, no existen tratamientos curativos para la esclerosis múltiple. Mientras que una serie de compuestos, que incluyen los corticosteroides y el interferón beta modificado, pueden reducir algunos síntomas de la esclerosis múltiple, han demostrado tener efectos secundarios graves o de lo contrario, han mostrado ser menos convenientes para el uso a largo plazo.

20

Un tratamiento prometedor para la esclerosis múltiple se describe en la patente núm. WO 02/077025 que describe el uso de análogos de péptidos de la proteína básica de mielina (MBP). Las composiciones que comprenden estos análogos son al parecer, capaces de mejorar los síntomas de la MS sin efectos secundarios excesivos. Además, el uso de análogos de péptidos para las proteínas constitutivas de mielina mostró ser eficaz en el tratamiento de los síntomas de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un trastorno inmunitario específico del órgano que se usa frecuentemente en ratones como modelo para la MS. Sin embargo, varios ensayos clínicos de fase II tuvieron que detenerse debido a la pobre tolerancia del péptido MBP alterado en la dosis ensayada (Bielekova y otros, Nature Medicine, 2000, (6) 10: 1167 y otros, Nature Medicine, 2000, (6) 10: 1176).

25

Otro tratamiento prometedor para la esclerosis múltiple se describe además en EP0587735. Dicho tratamiento es en base al razonamiento de que la exposición inmunológica a un péptido muy parecido a un fragmento de TCR autorreactivo debe mejorar el cebado/reconocimiento de las células Th2 y, por tanto, ayudar a mantener el control regulador de las citocinas sobre la inflamación mediada por Th1. Los ensayos clínicos han demostrado una seguridad aceptable y la tolerabilidad de este tratamiento por parte de los pacientes; sin embargo, este tratamiento es efectivo sólo en el 50 % de los pacientes inmunizados. La patente de EE. UU. núm. US2004/0087018 describe un método para tratar la esclerosis múltiple en un paciente que lo necesita, que comprende administrar simultáneamente células productoras de IL-10 específicas del antígeno a dicho paciente junto con el antígeno soluble, preferentemente.

30

Los inventores encontraron sorprendentemente que la administración de células Tr1 dirigidas contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, sin la coadministración del antígeno soluble, inhibe drásticamente el desarrollo de la EAE en los ratones inmunizados.

35

Por lo tanto, el Solicitante pretende proporcionar un tipo de tratamiento para la esclerosis múltiple en base al uso de células Tr1 que no requiere la inyección de un antígeno y es por lo tanto más fácil de implementar.

40

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar la esclerosis múltiple, en donde dicha composición farmacéutica comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde dicha composición farmacéutica no se administra con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que están dirigidas las células Tr1, en donde dicha población de células Tr1 tiene el siguiente fenotipo en reposo: CD4+CD25-

45

FoxP3-, y en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina, proteína oligodendrocitaria de mielina, proteína proteolípida, oligoproteína de mielina de oligodendrocitos, proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos, NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22, nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa y mezclas de estos.

50

La presente invención se refiere además, a un fármaco para tratar la esclerosis múltiple, en donde dicho fármaco comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, en

55

- donde dicho fármaco no se administra con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que se dirigen las células Tr1, en donde dicha población de células Tr1 tiene el siguiente fenotipo en reposo: CD4+CD25-FoxP3-, en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina, proteína oligodendrocitaria de mielina, proteína proteolipídica, oligoproteína de mielina de oligodendrocitos, proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos, NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22, nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa y mezclas de estos.
- De acuerdo con una modalidad, dicha población de células Tr1 comprendida en la composición farmacéutica o en el fármaco de la invención es una población de clones Tr1.
- De acuerdo con una modalidad, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) y mezclas de éstos.
- En una modalidad, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende los péptidos MBP 82-98, MBP 83-99, MBP 151-170, MBP 111-129 y MBP 116-123.
- En otra modalidad, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende los péptidos MOG 35-55, MOG 21-40, MOG 41-60, MOG 71-90, MOG 81-100, MOG 111-130, MOG 63-37, MOG 97-108, MOG 181-200.
- De acuerdo con una modalidad, las células Tr1 comprendidas en la composición farmacéutica o el fármaco de la invención para administrarse a un individuo que lo necesita son autólogas a las células de dicho individuo.
- De acuerdo con una modalidad, 10^4 /kg a 10^9 /kg de las células Tr1 comprendidas en la composición farmacéutica o en el fármaco de la invención se administran a un individuo que lo necesita.
- De acuerdo con una modalidad, la administración a dicho individuo que lo necesita de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención es en combinación con uno o más agentes terapéuticos que se usan para tratar la esclerosis múltiple.
- En una modalidad, la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.
- De acuerdo con una modalidad, el individuo a ser tratado con la composición farmacéutica o el fármaco de la invención no responde satisfactoriamente a uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Perfil de secreción de citocinas de células diferenciadas. Las células CD4+ vírgenes que se sometieron a regímenes de diferenciación se activaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3 + anti-CD28 durante 48 horas. Los sobrenadantes de cultivo se probaron después mediante ELISA para detectar la presencia de IL-4, IL-10 e IFN-gamma.

Figura 2: Efecto de la administración de células T CD4+ anti-MOG₃₅₋₅₅ en ratones propensos a EAE.

Descripción detallada de la invención

Definición

El término "células Tr1" como se utiliza en la presente se refiere a las células que tienen el siguiente fenotipo en reposo CD4+CD25-FoxP3- y la capacidad de secretar en activación altos niveles de IL-10 y niveles moderados a bajos de TGF- β . Las células Tr1 se caracterizan, en parte, por su único perfil de citocinas: ellas producen altos niveles de IL-10, niveles significativos de TGF- β y niveles intermedios de IFN- γ , pero poco o nada de IL-4 o IL-2. La producción de citocinas 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 Interleucina-2, PMA + ionomicina. Alternativamente, la producción de citocinas se evalúa en cultivos de células después de la activación con el antígeno de células T específico presentado por las células presentadoras de antígeno. Los altos niveles de IL-10 corresponden con al menos aproximadamente 500 pg/ml, típicamente mayor que aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 000 pg/ml o más. Los altos niveles de TGF- β corresponden con al menos aproximadamente 100 pg/ml, típicamente mayor que aproximadamente 200, 300, 400, 600, 800, o 1000 pg/ml o más. Los niveles intermedios de IFN- γ se corresponden a concentraciones comprendidas entre 0 pg/ml y al menos 400 pg/ml, típicamente mayor que aproximadamente 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800,

ó 2000 pg/ml o más. Poco o ninguna IL-4 o IL-2 corresponden con menos de aproximadamente 500 pg/ml, preferentemente menos que aproximadamente 250, 100, 75, o 50 pg/ml, o menos.

El término "antígeno", como se utiliza en la presente se refiere a una proteína, o péptido que se asocia con una enfermedad particular para la cual las células de esta invención se usan para modular, o para usar en cualquiera de los métodos de esta invención. En una modalidad, el término "antígeno" puede referirse a una molécula derivada sintéticamente, o una molécula derivada naturalmente, que comparte homología de secuencia con un antígeno de interés, u homología estructural con un antígeno de interés, o una combinación de éstos. En una modalidad, el antígeno puede ser un mimétopo. 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 completo o a un fragmento de éste. Las variantes de antígenos pueden prepararse convenientemente por síntesis química directa del péptido variante, mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica.

El término "individuo", como se utiliza en la presente se refiere a un ser humano.

El término "cantidad eficaz" como se utiliza en la presente se refiere a una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado (por ejemplo, mejoría en la afección clínica).

El término "clon" o "población de clones", como se utiliza en la presente se refiere a una población de células diferenciadas que se derivan de una única célula diferenciada.

El término "tratamiento" o "tratar" como se utiliza en la presente se refiere generalmente a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se trata, y se puede realizar durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables incluyen, pero no se limitan a, aliviar los síntomas, suprimir, disminuir o inhibir cualquiera de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o atenuar el estado de enfermedad, y producir la remisión o la mejoría del pronóstico.

El término "enfermedad autoinmunitaria", como se utiliza en la presente se refiere a una respuesta inmune dirigida contra un autoantígeno.

Los pacientes con esclerosis múltiple pueden identificarse mediante criterios que establezcan un diagnóstico de esclerosis múltiple clínicamente definida. En resumen, un individuo con esclerosis múltiple clínicamente definida ha tenido dos ataques y evidencia clínica ya sea de dos lesiones o evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada. La esclerosis múltiple definida puede diagnosticarse además por evidencia de dos ataques y bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo o por combinación de un ataque, evidencia clínica de dos lesiones y banda oligoclonal de IgG en el líquido cefalorraquídeo. Los criterios de McDonald pueden usarse además para diagnosticar la esclerosis múltiple. Los criterios de McDonald incluyen el uso de evidencia de MRI del deterioro del CNS en el tiempo para usarse en el diagnóstico de esclerosis múltiple, en ausencia de múltiples ataques clínicos. El tratamiento eficaz de la esclerosis múltiple puede evaluarse de varias maneras diferentes. Los siguientes parámetros pueden usarse para calcular la efectividad del tratamiento. Dos criterios ejemplares incluyen: La EDSS (escala del estatus de discapacidad extendida), y la aparición de exacerbaciones en la MRI (imagenología por resonancia magnética). La EDSS es un medio para evaluar el deterioro clínico debido a la esclerosis múltiple. Se evalúan ocho sistemas funcionales para determinar el tipo y la gravedad del deterioro neurológico. En resumen, antes del tratamiento, los pacientes se evalúan por deterioro en los siguientes sistemas: piramidal, cerebelo, tronco cerebral, sensorial, intestinal y vesical, visual, cerebral y otros. Los seguimientos se realizan a intervalos definidos. La escala oscila de 0 (normal) a 10 (muerte por esclerosis múltiple). Una disminución de una etapa completa indica un tratamiento efectivo.

Las exacerbaciones se definen como la aparición de un nuevo síntoma que se atribuye a la esclerosis múltiple y se acompaña de una anomalía neurológica nueva apropiada. Además, la exacerbación debe durar al menos 24 horas y estar precedida de estabilidad o mejoría durante al menos 30 días. En resumen, a los pacientes se les administra un examen neurológico estándar por los facultativos. Las exacerbaciones son ya sean leves, moderadas o severas de acuerdo con los cambios en la Escala de Puntuación Neurológica. Se determina una velocidad anual de exacerbación y la proporción de pacientes sin exacerbación.

La terapia puede considerarse que es efectiva si hay una diferencia estadísticamente significativa en la velocidad o la proporción de pacientes sin exacerbación o sin recaída entre el grupo tratado y el grupo placebo para cualquiera de estas mediciones. Además, el tiempo hasta la primera exacerbación y la duración y gravedad de la exacerbación pueden medirse. Una medida de efectividad como terapia al respecto es una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la primera exacerbación o la duración y gravedad en el grupo tratado en comparación con el grupo control. Un período sin exacerbación o sin recaída mayor que un año, 18 meses o 20 meses es particularmente notable.

Las mediciones clínicas incluyen la velocidad de recaída en intervalos de uno a dos años, y un cambio en la EDSS, que incluye el tiempo de progresión desde valores iniciales de 1.0 unidades en la EDSS que persisten durante seis meses. En una curva de Kaplan-Meier, un retraso en la progresión sostenida de la discapacidad muestra eficacia. Otros criterios incluyen un cambio en el área y el volumen de las imágenes T2 en la MRI, y el número y el volumen de lesiones que se determinan mediante imágenes mejoradas con gadolinio. La MRI puede usarse para medir las lesiones activas mediante el uso de imágenes mejoradas con DTPA gadolinio o la localización y extensión de las lesiones mediante el

uso de técnicas ponderadas de T2. En resumen se obtienen los valores iniciales de MRI. El mismo plano de imagen y la posición del paciente se usan para cada estudio posterior. Las secuencias de posicionamiento y de imágenes pueden seleccionarse para maximizar la detección de la lesión y facilitar el seguimiento de las lesiones. Las mismas secuencias de posicionamiento y de imágenes pueden usarse en estudios posteriores. La presencia, localización y extensión de las lesiones de esclerosis múltiple pueden ser determinadas por los radiólogos. Las áreas de lesiones pueden delimitarse y sumarse sector por sector para el área total de la lesión. Tres análisis pueden realizarse: evidencia de nuevas lesiones, velocidad de aparición de lesiones activas, cambio del porcentaje en el área de la lesión. La mejoría debido a la terapia puede establecerse mediante una mejora estadísticamente significativa en un paciente individual en comparación con los valores iniciales o en un grupo tratado frente a un grupo placebo.

Cada caso de esclerosis múltiple muestra uno de los varios patrones de presentación y curso posterior. Más comúnmente, es que la esclerosis múltiple se manifieste primero como una serie de ataques seguidos de remisiones completas o parciales a medida que los síntomas disminuyen misteriosamente, sólo para volver más tarde después de un período de estabilidad. Esto se denomina esclerosis múltiple recaída remisión (RR).

La esclerosis múltiple progresiva primaria (PP) se caracteriza por un declive clínico gradual sin remisiones distintas, aunque puede haber mesetas temporales o alivio menor de los síntomas.

La esclerosis múltiple progresiva secundaria (SP) comienza con un curso de recaída remisión seguido por un curso progresivo primario posterior. Raramente, los pacientes pueden tener un curso progresivo-recaída (PR) en el cual la enfermedad toma una trayectoria progresiva interrumpida por ataques agudos.

La PP, SP, y PR a veces se agrupan y se denominan esclerosis múltiple progresiva crónica. Algunos pacientes experimentan esclerosis múltiple maligna, que se define como una rápida e implacable decadencia que resulta en una incapacidad significativa o incluso en la muerte poco después de la aparición de la enfermedad.

La presente invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar la esclerosis múltiple, en donde dicha composición farmacéutica comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde dicha composición farmacéutica no se administra con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que están dirigidas las células Tr1, en donde dicha población de células Tr1 tiene el siguiente fenotipo en reposo: CD4+CD25-FoxP3-,

y en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina (MBP), glicoproteína asociada a la mielina (MAG), proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP), oligoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMGP), proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina (MOBP), proteína específica de oligodendrocitos (OSP/Claudin11), proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos (OSP), NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22 (PMP22), nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) y sus mezclas.

En una modalidad de la invención, las células Tr1 se pueden obtener mediante

- a) el aislamiento de una población de células progenitoras a partir de un individuo,
- b) la obtención de una población de células dendríticas mediante el cultivo de dicha población de células progenitoras en presencia de IL-10,
- c) el contacto células de la etapa b) con una población de linfocitos T CD4+ aislados a partir de dicho individuo en la presencia de un antígeno asociado a la esclerosis múltiple para permitir la diferenciación de las células T CD4+ dirigidas a dicho antígeno en la población de células Tr1, y
- d) el recobrado de la población de células Tr1 de la etapa c).

En la etapa b), la IL-10 está presente en el medio de cultivo de 50 a 250 U/ml, preferentemente 100 U/ml. Dicho método para obtener las células Tr1 se describe en Wakkach y otros (Immunity Mayo de 2003; 18(5):605-17).

Dicho método puede llevarse a cabo además mediante el uso de dexametasona y Vitamina D3, o DC inmaduras o tolerogénicas en lugar de las DC de la etapa b).

En otra modalidad de la presente invención, las células Tr1 pueden obtenerse mediante:

- a) el cultivo de una población de células T CD4+ dirigida a un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, que se aísla de un individuo en un medio con una cantidad apropiada de IFN- α , y
- b) el recobrado de la población de células Tr1.

El IFN- α , está presente preferentemente en los medios a 5 ng/ml. En la etapa a), los medios pueden comprender además una cantidad apropiada de IL-10, preferentemente a 100 U/ml.

En la etapa b), la población de células Tr1 se cultiva en un medio que comprende IL-15 para permitir la proliferación, estando la IL-15 preferentemente a 5 ng/ml en el medio. Dicho método para obtener las células Tr1 se describe en la patente de EE. UU. núm. US6746670.

5 Aún en otra modalidad de la invención, las células Tr1 pueden obtenerse mediante:

- a) la activación in vitro de una población de células T CD4+ en presencia de un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, que se presenta por las células presentadoras de antígeno artificial, y
- 10 b) el recobrado de la población de células T CD4+ activadas que comprenden al menos 10 % de las células Tr1. Preferentemente, las células presentadoras de antígeno artificial expresan una molécula del sistema de HLA II y una molécula LFA-3 humana y no expresan las moléculas de coestimulación B7-1, B7-2, B7-H1, CD40, CD23 e ICAM-1.

Dicho proceso, para obtener células Tr1 se describe en la solicitud de la patente núm. WO02/092793.

15 Aún en otra modalidad de la invención, las células Tr1 pueden obtenerse mediante:

- a) la activación in vitro de una población de células T CD4+ en presencia de un antígeno asociado a la esclerosis múltiple y una cantidad apropiada de IL-10; y
- 20 b) el recobrado de la población de células Tr1.

Preferentemente, la IL-10 está presente en el medio a 100 U/ml. Dicho método se describe en Groux y otros (Nature 1997, 389(6652):737-42).

25 Aún en otra modalidad de la presente invención, las células Tr1 específicas de antígeno pueden obtenerse mediante:

- a) la estimulación de una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno asociado a la esclerosis múltiple,
- b) el recobrado la población de células Tr1 específicas de antígeno a partir de la población estimulada,
- 30 c) opcionalmente la expansión de dicha población de células Tr1 específicas de antígeno.

Los leucocitos incluyen varios tipos de células, que se caracterizan por su importancia, su distribución, su número, su duración y su potencialidad. Estos tipos son los siguientes: los leucocitos polinucleares o granulados, entre los que se encuentran los leucocitos eosinófilos, los neutrófilos y los basófilos, y las células mononucleares o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), que son células blancas grandes de la sangre y consisten en los tipos de células del sistema inmune (linfocitos y monocitos). Los leucocitos o las PBMC pueden separarse de la sangre periférica mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Favorablemente, para la separación de las PBMC, puede usarse la centrifugación, preferentemente la centrifugación en gradiente de densidad, preferentemente la centrifugación en gradiente de densidad discontinuo. Una alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. En determinadas modalidades las PBMC típicamente se aíslan a partir de la sangre entera por medio del Ficoll-Hypaque, mediante el uso de procedimientos estándares. En otras modalidades las PBMC se recobran por medio de leucoféresis.

Dicho método se describe en la solicitud de la patente núm. WO2007/010406.

45 Aún en otra modalidad, las células Tr1 pueden obtenerse mediante:

- a) el cultivo de una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con células madre mesenquimales en presencia de un antígeno asociado a la esclerosis múltiple,
- 50 b) el recobrado de la población de células Tr1.

Dicho método puede llevarse a cabo además con células T vírgenes o de memoria en lugar de PBMC o leucocitos.

La población de células Tr1 obtenidas de este modo puede además expandirse por cultivo en presencia de citocinas tales como la Interleucina-2 e Interleucina-4. Alternativamente, la Interleucina-15 e Interleucina-13 pudieran usarse además en los cultivos de expansión de células Tr1.

En los métodos descritos anteriormente, las células Tr1 pueden caracterizarse por el método de identificación descrito en la patente núm. WO2005/000344. Dicho método de identificación de células Tr1 es en base a la detección de la presencia simultánea de los productos de expresión de genes que codifican la molécula CD4 y las moléculas del grupo que comprende CD18 y/o CD11a, y CD49b. Las células Tr1 pueden identificarse y/o purificarse por Elisa, citometría de flujo, o métodos de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra dichos marcadores.

Las células Tr1 pueden enriquecerse además por la selección positiva o selección negativa mediante el uso de citometría de flujo o perlas magnéticas. Dichos métodos se describen además en la patente núm. WO2005/000344.

En otra modalidad de la presente invención, las células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a la esclerosis múltiple puede expandirse por el método in vitro descrito en la patente núm. WO2006/108882. Dicho método comprende:

- 5 a) cultivar a una temperatura T1 inferior a 35 °C, en un medio de cultivo Mf, las células de alimentación tales como células de alimentación de insectos, dicha temperatura T1 permite la proliferación de las células de alimentación y dichas células de alimentación expresan los factores que interactúan con las siguientes proteínas de superficie celular:
 - el complejo CD3/TCR,
 - 10 – la proteína CD28,
 - el receptor de IL-2,
 - la proteína CD2,
 - el receptor de IL-4,
- 15 b) contactar las células de alimentación obtenidas en la etapa a) despejar 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), para obtener una mezcla que contiene la población de células Tr1, las células de alimentación y el medio de cultivo Mp,
- c) cultivar la mezcla obtenida en la etapa b) a una temperatura T2 que es al menos 35 °C, dicha temperatura que se elige tal que la población de células Tr1 prolifera y las células de alimentación no proliferan,
- 20 d) el recobrado de la población de células Tr1 tales expandidas.

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

- un anticuerpo anti-CD3 modificado, en donde el dominio intracitoplásmico de anti-CD3 de la cadena pesada de CD3 se sustituye con un dominio transmembrana,
- 25 – la proteína CD80 o CD86,
- la IL-2 secretada por las células de alimentación,
- la proteína CD58,
- una interleucina que se selecciona del grupo que comprende IL-4 e IL-13.

En una modalidad preferida de la presente invención, dichas células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a la esclerosis múltiple pueden clonarse mediante el uso de los métodos convencionales para clonar células T.

En una modalidad preferida de la presente invención, dicha composición comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple o al menos un clon de células Tr1 dirigido contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple pueden congelarse para almacenarse.

Preferentemente, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) y proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) péptidos y fragmentos, variantes y mezclas de éstos.

Con mayor preferencia, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende MBP 82-98, MBP 83-99, MBP 151-170 para individuos positivos a HLA-DR2. Con mayor preferencia, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende MOG 35-55, MOG 21-40, MOG 41-60, MOG 71-90, MOG 81-100, MOG 111-130, MOG 63-37 para individuos positivos a HLA-DR2.

Con mayor preferencia, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende MBP 111-129, MBP 116-123 para individuos positivos a HLA-DR4.

50 Con mayor preferencia, dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende MOG 21-40, MOG 97-108, MOG 71-90, MOG 181-200 para individuos positivos a HLA-DR4.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un fármaco que comprende una composición como se describe en la presente anteriormente.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en la presente descripción son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980) describe la composición y las formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de la composición de la presente invención. En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo de administración que se emplea. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen como vehículo fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como el agua, salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, aceite de sésamo, glicerol, etanol, combinaciones de éstos, o similares. El vehículo y la composición pueden ser estériles, y la formulación se adecua al modo de administración. Además de los vehículos neutrales biológicos, las composiciones farmacéuticas que se administran pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o

emulsificantes, conservantes, y agentes amortiguadores del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión.

5 En una modalidad de la invención, dicho fármaco o composición farmacéutica como se describe en la presente invención anteriormente consiste esencialmente en al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple.

En otra modalidad de la invención, dicho fármaco o composición farmacéutica como se describe en la presente invención anteriormente consiste esencialmente en al menos un clon de una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple.

10

Como se utiliza en la presente descripción, "consiste esencialmente de" se refiere a un fármaco o a una composición farmacéutica, en donde al menos el 70 %, preferentemente el 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de las células presentes en el fármaco o la composición farmacéutica son células Tr1 dirigidas contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple.

15

En otra modalidad de la invención, dicho fármaco o composición farmacéutica como se describe en la presente invención anteriormente consiste de al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple o al menos un clon de una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple.

20

La presente invención se refiere al uso de una composición como se describe en la presente invención anteriormente para preparar un fármaco o una composición farmacéutica para tratar la esclerosis múltiple.

25

Un objetivo de la presente invención es además un método para tratar la esclerosis múltiple en un individuo que lo necesita, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del fármaco o la composición farmacéutica como se describe en la presente invención anteriormente.

De acuerdo con la invención, la composición farmacéutica o el fármaco como se describe en la presente invención anteriormente es para tratar la esclerosis múltiple.

30

De acuerdo con la invención, la composición farmacéutica o el fármaco como se describe en la presente invención anteriormente es para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

De acuerdo con la invención, dicha composición farmacéutica o fármaco no se usa en combinación con el antígeno asociado a esclerosis múltiple soluble.

35

De acuerdo con la invención, dicha composición farmacéutica o fármaco no se administra al individuo junto con o en combinación con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble.

40

De acuerdo con la invención, no hay necesidad de un cotratamiento con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que están dirigidas las células Tr1.

La composición puede formularse para uso parenteral, intramuscular, intravenoso, intraperitoneal, inyección, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, intradérmica, intraarticular, intratecal o para la vía del tracto alimentario.

45

Preferentemente, el fármaco o la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por inyección intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o por inyección directa en los nodos linfáticos del paciente, preferentemente por inyección intravenosa.

50

La cantidad de células Tr1 dirigidas a un antígeno asociado a la esclerosis múltiple eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple dependerá de la naturaleza de la esclerosis múltiple y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa a ser empleada en la formulación dependerá además de la vía de administración, y la seriedad de la enfermedad o trastorno, y debe ser decidida de acuerdo al criterio del médico y de las circunstancias de cada individuo. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis respuesta que se derivan de los sistemas de prueba in vitro o en los modelos animales.

55

En una modalidad de la presente invención, se administran al individuo 10^4 /kg a 10^9 /kg de células. Preferentemente se administran al individuo 10^5 /kg a 10^7 /kg células y con mayor preferencia aproximadamente 10^6 /kg de células.

60

En una modalidad de la invención, el individuo se administra con el fármaco en el momento cuando se demuestra el recrudescimiento por una disminución en el estado clínico del individuo o en el momento cuando las lesiones inflamatorias pueden visualizarse por ejemplo por MRI del sistema nervioso central.

En una modalidad de la invención, el individuo se administra una vez con el fármaco o la composición farmacéutica de la presente invención.

En una segunda modalidad de la invención, el individuo se administra una vez al mes con el fármaco o la composición farmacéutica de la presente invención.

5 En una tercera modalidad de la invención, el individuo se administra un cuarto con el fármaco o la composición farmacéutica de la presente invención.

En una cuarta modalidad de la invención, el individuo se administra una o dos veces al año con el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención.

10 En otra modalidad de la presente invención, el fármaco o la composición farmacéutica a administrar a un individuo que lo necesita comprende células Tr1 autólogas de las células de dicho individuo.

Esto significa que las células Tr1 se administrarán al individuo del que provienen o que los precursores usados para la producción de células Tr1 provienen del individuo que se le administrarán las células Tr1.

15 En otra modalidad de la presente invención, el método para tratar la esclerosis múltiple en un individuo que lo necesita comprende la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención en una combinación con uno o más agentes terapéuticos que se usan para tratar la esclerosis múltiple.

20 La presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica o el fármaco de la invención para tratar la esclerosis múltiple, en donde la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención es en combinación con uno o más agentes terapéuticos que se usan para tratar la esclerosis múltiple.

25 Los ejemplos de los agentes terapéuticos que se usan comúnmente para tratar la esclerosis múltiple son los siguientes:

- interferones, por ejemplo, interferón beta-la humano (por ejemplo, AVONEX(R) o Rebif(R)) e interferón beta-1b (BETASERON(TM); interferón beta humano sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron);
- acetato de glatiramer (además llamado Copolímero 1, Cop-1; COPAXONE(TM); Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); y derivados,
- fumaratos, por ejemplo, dimetil fumarato (por ejemplo, Fumaderm(R));
- Rituxan(R) (rituximab) u otro anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, uno que compite con o se une a un epítipo superpuesto con rituximab;
- mitoxantrona (NOVANTRONE(R), Lederle);
- 35 - un quimioterapéutico, por ejemplo, clabribina (LEUSTATIN(R)), azatioprina (IMURAN(R)), ciclofosfamida (CYTOXAN(R)), ciclosporina-A, metotrexato, 4-aminopiridina, y tizanidina;
- un corticosteroide, por ejemplo, metilprednisolona (MEDRONE(R), Pfizer), prednisona;
- una inmunoglobulina, por ejemplo, Rituxan(R) (rituximab); CTLA4 Ig; alemtuzumab (MabCAMPATH(R)) o daclizumab (un anticuerpo que se une a CD25);
- 40 - estatinas;
- inmunoglobulina G intravenosa (IgGIV),
- Nataluzimab (Tysabri) anticuerpo alfa-4 anti-integrina,
- el antagonista BX471 (ZK811752) del receptor 1 de quimocina CC oral,
- FTY720 (fingolimod),
- 45 - anticuerpos o antagonistas de citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL- 1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 12, IL- 15, IL- 16, IL-17, IL- 18, IL-23, EMAP-I1, GM-CSF, FGF y PDGF.
- anticuerpos contra las moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos.
- FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), por
- 50 - ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina,
- agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias como se describe en la presente invención, inhibidores de la enzima convertidora de IL- I[beta] (por ejemplo, Vx740), anti-P7s, PSGL, inhibidores TACE, inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina,
- 55 - azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina,
- amantadina, baclofeno, papaverina, meclizina, hidroxizina, sulfametaxazol, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenamina, clonazepam, isoniazida, vardenafil, nitrofurantoína, muciloide hidrofílico de psyllium, alprostadil, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propantelina, modafinil, fluoxetina, fenazopiridina,
- 60 - metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropión, y sertralina.

Los ejemplo de terapias de combinación que se usan actualmente son:

- acetato de glatiramer y albuterol,
- 65 - acetato de glatiramer y minociclina,

- interferón-beta 1a y mofetil micofenolato,
- BHT-3009 y atorvastatina,

5 En una modalidad preferida de la presente invención, el método para tratar la esclerosis múltiple en un individuo que lo necesita comprende la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

10 La presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica o del fármaco de la invención para tratar la esclerosis múltiple, en donde la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención es en combinación con uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

15 En otra modalidad, la presente invención se refiere además a un método de tratamiento de la esclerosis múltiple en el que el fármaco o la composición farmacéutica de la invención ha de administrarse a un individuo que lo necesite, en donde el individuo no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos en el grupo de interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

20 La presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica o el fármaco de la invención para tratar la esclerosis múltiple, en donde dicho individuo no responde adecuadamente a, o es poco probable que responda adecuadamente a, uno o más agentes terapéuticos en el grupo de interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

25 "Respuesta inadecuada", "no responde adecuadamente a" o "es poco probable que responda adecuadamente" se refiere a una respuesta real o probable de un individuo que indica que la terapia ha sido o es probable que sea ineficaz, tóxica o mal tolerada en la medida que se refiere al individuo.

30 Los individuos que no responden adecuadamente o es poco probable que respondan adecuadamente al tratamiento convencional de la esclerosis múltiple como el tratamiento con uno o más agentes terapéuticos en el grupo de interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab pueden identificarse mediante el uso de la puntuación de EDSS (Escala de Estatus de Discapacidad Extendida) como se conoce convencionalmente por el experto en la técnica.

35 Ejemplos

En la siguiente descripción, todos los experimentos para los que no se presenta el protocolo detallado se realizan de acuerdo con el protocolo estándar.

40 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la técnica que los procedimientos descritos en los ejemplos a continuación representan procedimientos descubiertos por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y de este modo pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden hacerse muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y aún obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Procedimientos experimentales

Ratones

50 Los ratones C57B1/6 se obtuvieron de Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia). Ratones transgénicos TCR específicos MOG₃₅₋₅₅ sobre un fondo de C57B1/6 se alojaron en el laboratorio de Pr. Liblau (Inserm U563, Hôpital Purpan, Toulouse). Todos los ratones eran hembras de 7 a 8 semanas de edad.

55 Anticuerpos y reactivos

Los siguientes anticuerpos se usaron para la purificación y caracterización de células de ratón: anti-CD4 (H129-19) anti-CD62L (Mel-14), (BD-Pharmingen, Le Pont de Claix, Francia). El péptido MOG₃₅₋₅₅ procede de Bachem (Voisin-le-Bretonneux, Francia). La IL-2 se obtuvo mediante la Chiron Corporation (Emmeryville, CA, USA). IL-4, IL-12 y anti-IL12 se adquirieron de sistemas R&D (Minneapolis, USA).

Purificación y cultivo de células T

65 El medio que se usó para los cultivos de células T fue el medio Iscove (Invitrogen) suplementado con FCS, medio Yssel y β2-Mercaptoetanol (Sigma). Los esplenocitos del ratón transgénico TCR específico para MOG₃₅₋₅₅ se marcaron primero con conjugado FITC anti-CD62L y conjugado PE anti-CD4. Después, se clasificaron las células CD4⁺CD62L⁺ T

en un FACStar SE (Becton Dickinson, Francia). Todas las poblaciones fueron > 98 % puras en el reanálisis. Las células Th1, Th2 y Tr1 de ratón dirigidas contra MOG₃₅₋₅₅ se obtuvieron después de la diferenciación *in vitro* como a continuación: Se cultivaron 2.5x10⁵equilibrado CD4⁺CD62L⁺ células T en la presencia de 4.10⁶de esplenocitos singénicos irradiados en placas de 24 pocillos con el péptido MOG₃₅₋₅₅(10 µg/ml). Para la diferenciación de las células T en Th1, Th2 y las células Tr1, se añadió IL-12 (20ng/ml), IL-4 (40ng/ml) más anti-IL-12 (5µg/ml) o IL-10 (50ng/ml), respectivamente. Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y se dividieron cuando se requirió en medio suplementado con IL-2 (100 UI/ml) para Th1 e IL-2 más IL-4 (20ng/ml) para Th2 y células Tr1. Alternativamente, las células Tr1 se dividieron además en medio suplementado con IL-10 (5 ng/ml). La población de células T se estimularon una vez a la semana durante dos o tres semanas.

Ensayos de citocina

Se realizaron ELISA sándwich a los sobrenadantes de 48 horas de poblaciones de células T estimuladas anti-CD3 (10 µg/ml) + anti-CD28 (1 µg/ml). En resumen, se activaron 5.10⁵ células con anticuerpos monoclonales anti-CD3 revestidos y anticuerpos monoclonales anti-CD28 solubles en placas de fondo plano de 96 pocillos y se cultivaron 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Los ELISA se realizaron mediante el uso de anti-IL-4 (11B11), anti-IL-10 (2A5), anti-IFN-γ (XGM1.2), anti-IL-4 (24G2) biotina, anti-IL-10 (SXC1), anti-IFN-γ (R4-6A2) (Pharmingen Becton Dickinson).

Encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.

La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cua y otros (J. Exp. Med, 1999). En resumen, los ratones C57BL/6 se inyectaron por vía intradérmica con 2,5 mg de homogeneizados de médula espinal de Ratón preparados en Adyuvante de Freund Completo. Después de 2 días, se inyectaron ratones con 200 ng de toxina Pertussis por administración intraperitoneal. El mismo régimen de inmunización se repitió a J8 y J9 para la médula espinal y la toxina Pertussis, respectivamente. Las puntuaciones clínicas se evaluaron diariamente a partir del Día 10 y son: 0= Sin enfermedad; 1= Parálisis de la cola; 2= Debilidad de la extremidad posterior; 3=Parálisis de la extremidad posterior; 4= Extremidad posterior más parálisis del antebrazo; 5= Moribundo. Se inyectaron las poblaciones de células T (3.10⁵células/ratón) una vez por vía intravenosa en el día 9.

Resultados

Diferenciación de los linfocitos T anti-mog₃₅₋₅₅.

Se diferenciaron primero las poblaciones de linfocitos CD4⁺ T anti-MOG₃₅₋₅₅ de linfocitos vírgenes T CD4⁺ de ratones transgénicos TCR anti-MOG₃₅₋₅₅. Todos los linfocitos de estos ratones contienen un TCR específico que reconoce específicamente el péptido MOG₃₅₋₅₅ presentado en el contexto de moléculas de H-2^b. Las células vírgenes (CD4⁺CD62L⁺) se seleccionaron y se activaron *in vitro* con esplenocitos singénicos irradiados y el péptido MOG₃₅₋₅₅. Se añadió IL-12 para diferenciar las células Th1, se añadieron anticuerpos monoclonales IL-4 y anti-IL12 para diferenciar las células Th2 y se añadió IL-10 para diferenciar las células Tr1. Después de 2 o 3 estimulaciones semanales, las células se cosecharon y se probaron para determinar su producción de citocinas bajo la estimulación anti-CD3 + anti-CD28. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Se observó que las células sometidas a la diferenciación en presencia de IL-10 adquirieron el patrón típico de la producción de citocinas de células Tr1 con alta producción de IL-10 y baja de IL-4. La estimulación de IL-4 de células diferenciadoras dio lugar a células Th2 mostrando una producción igual de IL-4 e IL-10 y ninguna producción de IFN-γ. A pesar de una producción significativa de IL-10, la estimulación de IL-12 de células diferenciadoras dio lugar a células que muestran el perfil de producción de citocinas Th1 con alta producción de IFN-γ y ninguna producción de IL-4.

Función supresora *in vivo* de las células tr1 anti-mog₃₅₋₅₅

A continuación se evaluó el efecto de las poblaciones de células T anti-MOG diferenciadas en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental en ratones. Para este propósito, se inmunizaron ratones C57B1/6 con homogeneizados de médula espinal de ratón (msch) en adyuvante de Freund completo, a continuación un día después, con una administración intraperitoneal de toxina Pertussis. El mismo régimen se repitió al día 8 y 9 para el msch y la toxina pertussis, respectivamente. Las poblaciones de células Th1, Th2 y Tr1 anti-MOG se inyectaron por vía intravenosa a ratones inmunizados al día 9 y se evaluó la puntuación clínica una vez al día. La Figura 2 muestra el impacto de las células T positivas anti-MOG CD4 sobre la evolución de la encefalomiелitis experimental. Se observó que las células Th1 y Th2 dirigidas contra el péptido MOG₃₅₋₅₅no tuvieron efectos significativos sobre la EAE inducida por inmunización con el msch. A diferencia, la administración de células Tr1 anti-MOG₃₅₋₅₅ inhibe drásticamente el desarrollo de EAE en ratones inmunizados. De hecho, los ratones tratados con células Tr1 dirigidas contra el antígeno de mielina desarrollaron una parálisis leve de la cola mientras que los ratones de control desarrollaron una pérdida de la función motora de las extremidades posteriores. Es importante destacar, que la administración de Tr1 no sólo inhibe el desarrollo de la enfermedad, sino que además evita la recaída que se produce en animales no tratados con células T. Un estudio previo (Barrat y otros, J Exp Med, 2002) mostró que las células Tr1 anti-ovoalbúmina son capaces de prevenir la EAE en los ratones. Estos efectos supresores sólo se lograron después de la instilación intracraneal de ovoalbúmina, lo que muestra que la activación específica del antígeno de las células Tr1 en el cerebro es un requisito previo para su función efectora. De este modo, se deseó evaluar si un autoantígeno, como un componente intrínseco

5 del sistema nervioso central podría desempeñar un papel de activador de células supresoras. Los experimentos responden positivamente a esa pregunta que muestran que las células Tr1 dirigidas contra un antígeno de mielina pueden inhibir la encefalomiелitis *in vivo*. La proteína MOG es uno de los blancos de las células proinflamatorias en este modelo de ratón de inflamación cerebral. El hecho de que las células Tr1 dirigidas contra el mismo antígeno supriman la inflamación sugiere que el tratamiento con Tr1 de enfermedades inflamatorias podría dirigirse directamente al antígeno para el cual se rompió la tolerancia.

10

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple, en donde dicha composición farmacéutica comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde dicha composición farmacéutica no se administra con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que están dirigidas las células Tr1, en donde dicha población de células Tr1 tiene el siguiente fenotipo en reposo: CD4+CD25-FoxP3-, y en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina, proteína oligodendrocitaria de mielina, proteína proteolipídica, oligoproteína de mielina de oligodendrocitos, proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos, NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22, nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa y mezclas de éstos.
2. Un fármaco para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple, en donde dicho fármaco comprende al menos una población de células Tr1 dirigida contra un antígeno asociado a la esclerosis múltiple, en donde dicho fármaco no se administra con el antígeno asociado a la esclerosis múltiple soluble al que se dirigen las células Tr1, en donde dicha población de células Tr1 tiene el siguiente fenotipo en reposo: CD4+CD25-FoxP3-, en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina, proteína oligodendrocitaria de mielina, proteína proteolipídica, oligoproteína de mielina de oligodendrocitos, proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina, proteína específica de oligodendrocitos, proteínas de choque térmico, proteínas específicas de oligodendrocitos, NOGO A, glicoproteína Po, proteína de mielina periférica 22, nucleótido 2'3'-cíclico 3'-fosfodiesterasa y mezclas de éstos.
3. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o el fármaco para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha población de células Tr1 es una población de clones Tr1.
4. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 3, en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la proteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) y mezclas de éstos.
5. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende los péptidos MBP 82-98, MBP 83-99, MBP 151-170, MBP 111-129, y MBP 116-123.
6. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho antígeno asociado a la esclerosis múltiple se selecciona del grupo que comprende los péptidos MOG 35-55, MOG 21-40, MOG 41-60, MOG 71-90, MOG 81-100, MOG 111-130, MOG 63-37, MOG 97-108, MOG 181-200.
7. El medicamento o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el fármaco o la composición farmacéutica que se administra a un individuo que lo necesita comprende células Tr1 autólogas a las células de dicho individuo.
8. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se administran 10^4 /kg a 10^9 /kg de células Tr1 al individuo que lo necesita.
9. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención es una combinación con uno o más agentes terapéuticos que se usan para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
10. La composición farmacéutica o del fármaco para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz del fármaco o de la composición farmacéutica de la invención es en combinación con uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón-beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.
11. La composición farmacéutica o el fármaco para usar de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el individuo que se trata no responde satisfactoriamente a uno o más agentes terapéuticos en el grupo del interferón beta, acetato de glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida, metotrexato, aziatropina o natalizumab.

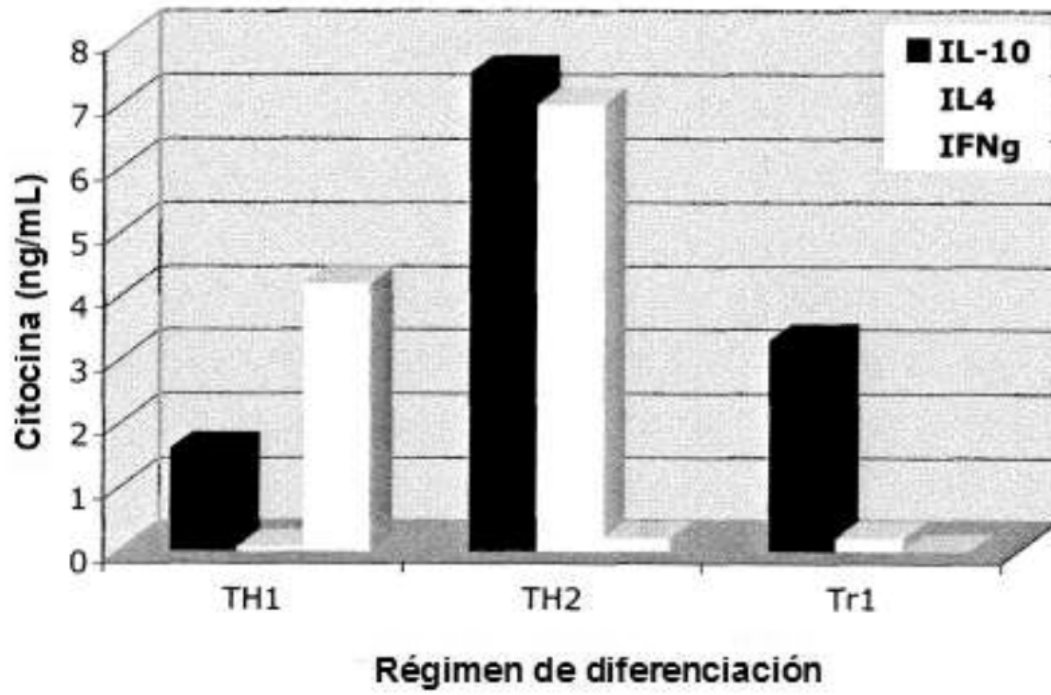


Figura 1

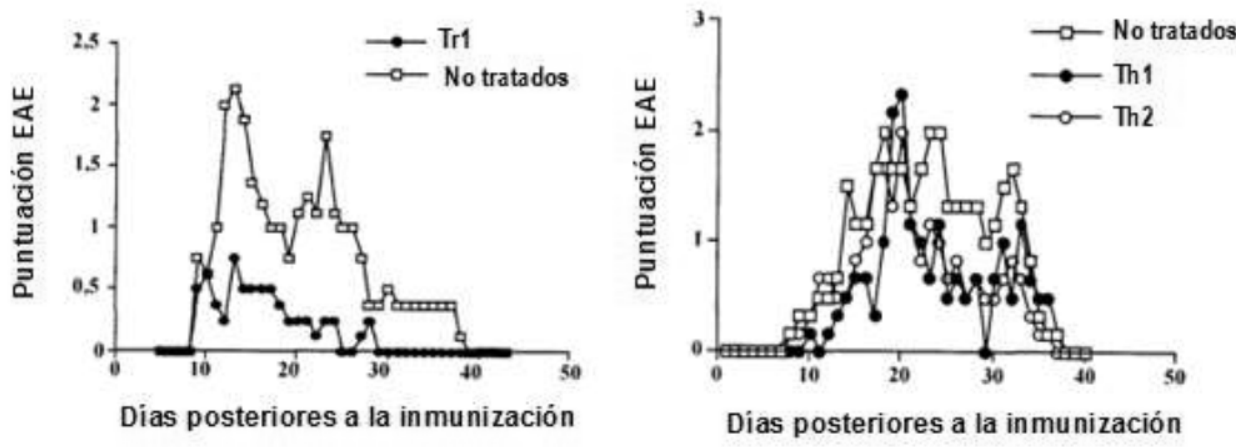


Figura 2