

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 279**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/26 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/PL2013/000072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13739523 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2859092**

54 Título: **Vacuna terapéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 en niños, aplicación del separador celular y método de multiplicación de células T_{reg} para producir vacuna terapéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 1**

30 Prioridad:

06.06.2012 PL 39944712

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

22.02.2021

73 Titular/es:

**GDANSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY (100.0%)
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdansk, PL**

72 Inventor/es:

**TRZONKOWSKI, PIOTR;
MYSLIWIEC, MALGORZATA y
MAREK-TRZONKOWSKA, NATALIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 807 279 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

Vacuna terapéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 en niños, aplicación del separador celular y método de multiplicación de células T_{reg} para producir vacuna terapéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva vacuna terapéutica preparada mediante un método mejorado para la utilización en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 autoinmune en niños que previene la enfermedad eficazmente.

10 Técnica anterior

La diabetes de tipo 1 (DM1A) es una enfermedad de tipo genético; sin embargo, todos los investigadores concurren en que los daños directos a las células β en el páncreas se debe a una reacción autoinmunitaria. En favor de lo anterior está tanto la presencia de anticuerpos contra antígenos de células β como la infiltración linfocítica en los islotes de Langerhans, o la denominada insulinitis, acompañada por una apoptosis incrementada de las células β.

Los linfocitos T reguladores (T_{reg}) forman una población específica del sistema inmunitario. Aunque constituyen menos de 1% de los leucocitos en la sangre periférica, regulan la respuesta inmunitaria de manera que la rápida eliminación de patógenos perjudiciales resulta posible, manteniendo protegidos nuestros propios tejidos. Lo anterior se debe a que las células T_{reg} no bloquean otras células del sistema inmunitario al resultar atacados los patógenos foráneos, aunque son fuertemente inhibitoras al empezar el sistema inmunitario a destruir los propios tejidos y órganos. Por lo tanto, por analogía, la acción inmunosupresora de las células T_{reg} en ocasiones les ha ganado el nombre de «esteroides inteligentes».

25 Un número reducido de células T_{reg} en el organismo se asocia a fallos de trasplante e incidencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes. Una de las enfermedades caracterizadas por una deficiencia numérica de células T_{reg} es la diabetes de tipo 1, en la que el ataque autoinmune destruye el páncreas del paciente.

30 Se conoce a partir de la publicación de patente internacional nº WO 2004/110373 una composición de vacuna que comprende componentes modificados de cadena B de la insulina para la utilización como agentes inmunogénicos para el tratamiento y prevención de la diabetes de tipo 1.

35 Se conoce a partir de la publicación nº WO 2012/001099, por otra parte, una vacuna que contiene por lo menos un enterovirus seleccionado del grupo que incluye: los virus Coxsackie CAV4, CAV5, CAV6 y el ecovirus E18, o componentes de los mismos. La descripción indica que los enterovirus listados están asociados a la diabetes de tipo 1, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas y diagnósticas.

40 De manera similar, la descripción del documento nº WO 2012/001100 da a conocer una vacuna que comprende, p.ej., el virus Coxsackie B CBV1 para la prevención o tratamiento de la diabetes de tipo 1. Se ha encontrado que el virus está fuertemente asociado al riesgo de contraer diabetes de tipo 1.

45 Publicaciones de E.Allison Green et al: "Pancreatic Lymph Node-Derived CD4+CD25+ Treg Cells"; Salomon B et al: "B7/CD28 costimulations is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes"; E.A..Green: "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-TGF-receptor interactions in type 1 diabetes", describe la transferencia del fenotipo CD4+CD25+ en un modelo de ratón de diabetes (fenotipo diferente, las células no se expanden sino que se transfieren directamente).

50 Publicación de Liu Weihong et al: "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells" describe un fenotipo más amplio CD127^{low} a fenotipo negativo (low⁻) y células no expandidas ex vivo y los resultados no confirman la utilización de las células en la diabetes de tipo 1 (no se observan diferencias entre el nivel de células en sujetos con diabetes de tipo 1 y controles sanos).

55 Publicación de Trzonkowski P. et al: «First-in-man clinical results of the treatment of patients with graf versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells" describe la administración de las células en la enfermedad del injerto contra el huésped, que no es un fenómeno autoinmunitario, y las células no se expandieron en suero humano inactivado autólogo y no en el medio indicado en la solicitud.

60 Publicación de Natalia Marek et al: "The Time is Crucial for Ex Vivo Expansion of T Regulatory cells for Therapy" describe los cultivos con medio RPMI-1640 y plasma humano.

Publicación de Federico Simonetta et al: "Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells" describe la expresión incrementada de receptor de CD127 sobre células T reguladoras, mientras que la solicitud describe células que no expresan receptor de CD127 en absoluto (células CD127⁻).

Publicación de Ethan M. Shevach "Regulatory T Cells in Autoimmunity*" es una revisión que no indica nada sobre el fenotipo y el modo de expansión propuesto en la solicitud.

5 Publicación de Amy L. Putnam et al: "Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes" describe la expansión del producto a partir del fenotipo más amplio de células CD4+CD25+CD127low/- expandidas sin suero autólogo. Tal como se indica posteriormente, dicho producto no es tan estable como el de la solicitud. Además, su utilización en la diabetes de tipo 1 no resultó tan eficaz como se indica en Sci. Transl. Med. 7(315):315Ra189, 2015 (*ver también el comentario a la revisión de la EPO*).

10 Publicación WO 2007/127787 es una invención que describe células T reguladoras específicas de insulina que se derivan mediante la estimulación con péptidos similares a insulina. Las células presentan un fenotipo diferente de las células de la solicitud. Además, dichas células no pueden expandirse hasta el número en la solicitud y su estabilidad no es conocida.

15 Publicación Marek Natalia et al: "Coating Human Pancreatic Islets with CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells as a Novel Approach for the local immunoprotection" es una descripción de la utilización de células T reguladoras en el rechazo del tejido alogénico. El tejido comprende islotes pancreáticos, aunque no es una diabetes de tipo 1 autoinmune.

20 Las publicaciones anteriormente indicadas dan a conocer enfoques destinados al tratamiento de diabetes insulino-dependiente (no necesariamente diabetes de tipo 1 autoinmune); sin embargo, son diferentes de la vacuna que es la esencia de la presente invención.

25 Con el fin de incrementar la eficacia del tratamiento de la diabetes de tipo 1 en niños, resulta necesario buscar métodos más eficaces y con éxito de tratamiento de la enfermedad.

Base de la invención y exposición general

30 Inesperadamente, se ha encontrado que la nueva vacuna terapéutica preparada mediante un método mejorado para la utilización en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 autoinmune en niños previene la enfermedad eficazmente. La administración de la vacuna según la presente invención en pacientes resulta en un incremento del marcador primario de la función pancreática, es decir, el nivel de péptido C. Además, el separador utilizado se dedicaba originariamente a terapias celulares, lo que potencia su seguridad.

35 La presente invención se refiere a un método mejorado de preparación de una vacuna que comprende células T_{reg} CD3(+)/CD4(+)/CD25(high)/CD127(-) que comprende las etapas siguientes:

- aislamiento de células T (linfocitos T) a partir de muestras de sangre periférica y marcaje de anticuerpos monoclonales de células T.
- separación de las células T (linfocitos T) según el fenotipo CD3(+)/CD4(+)/CD25[high]/CD127(-)doblete(-)/linaje(-)/dead(-) utilizando el dispositivo de separación con tubo extraíble para la administración experimental, siendo las células separadas una población de células T_{reg} de una pureza mínima de 97%,
- la propagación de las células *ex vivo* separadas de esta manera en presencia de células artificiales que presentaban antígeno en medio de cultivo CellGro o X-VIVO complementado con por lo menos 1000 U/ml de interleuquina-2 y suero inactivo autólogo aproximadamente al 10%, mientras que las células artificiales presentadoras de antígeno eran objetos de forma esférica magnéticos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en una proporción 1: 1, mientras que el tiempo de propagación *ex vivo* no excedió de 2 semanas,
- someter la muestra de células obtenidas de esta manera a ensayos para el nivel de expresión de FoxP3, ensayo de inhibición de IFN-gamma y ensayos microbiológicos, así como a la selección para la utilización como células de vacunación que expresan FoxP3 con resultado positivo superior a 90% en el ensayo de inhibición de IFN-gamma y resultado negativo en ensayos microbiológicos.

55 Vacuna preparada de acuerdo con el método anterior.

Vacuna preparada de acuerdo con el método anteriormente indicado para la utilización en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 autoinmune en niños.

Las figuras:

60 Fig.1 - presenta el nivel de células T_{reg} CD3+CD4+CD25highCD127-FoxP3+ en niños que sufren de diabetes de tipo 1, sometidos a la terapia de células T_{reg} (n=10) durante un periodo de observación de cuatro meses. El valor en el punto «-10 días» representa el día en que se extrajo sangre para el aislamiento de células T_{reg}. Las columnas grises presentan los resultados obtenidos para niños en los que no se administró la infusión de linfocitos T_{reg} (grupo

de control, n=10). Los valores proporcionados son valores de la mediana, mínimo y máximo. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) están marcados con «*».

Fig. 2 - presenta el péptido C, la dosis diaria de insulina /kg peso corporal (DDI/kg), y HbA1C en los niños sometidos a ensayo con diabetes de tipo 1 sometidos a terapia de células T_{reg} (n=10) durante el periodo de observación de cuatro meses. Los resultados para los pacientes en los que se administró la preparación celular (grupo de control, n=10) se presentan en las columnas grises. Los valores proporcionados son los valores de mediana, mínimo y máximo, y los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) están marcados con «*».

La invención se ilustra con la realización siguiente, que es ejemplar, es decir, no de naturaleza limitativa.

Realización ejemplar:

se muestrearon 250 ml de sangre periférica de cada paciente con ayuda de un anesthesiólogo. En el caso de niños con un peso corporal inferior a 50 kg, el volumen de sangre muestreada constituía 0,5% del peso corporal (PC). Lo anterior se refiere a pacientes de menos de 18 años de edad.

La sangre recogida se procesó en el Centro regional de donación de sangre y tratamiento en Gdansk para extraer las capas leucocitarias y el suero. A partir de las capas leucocitarias se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) mediante centrifugación en el gradiente de concentraciones de Ficoll/Uropolina. A continuación, se separaron los linfocitos T CD4⁺ mediante el método inmunomagnético (pureza de separación: 96-99%) utilizando el kit de enriquecimiento en células T CD4⁺ y se marcaron con los anticuerpos monoclonales (mAb) siguientes: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD25 y anti-CD127 (5 µl de mAb/10⁶ células). Entre los anticuerpos listados, los que reconocían los antígenos CD14, CD16, CD19 y CD8 se conjugaron con el mismo pigmento. El propósito del esquema de tinción era excluir las células positivas para los antígenos listados (es decir, monocitos, células NK, linfocitos B y linfocitos T citotóxicos) sin necesidad de introducir fluorocromos adicionales, reduciendo el fenómeno no deseable de solapamiento de espectros fluorescentes. A continuación, las células se separaron para aislar las T_{reg} utilizando un citómetro separador con el algoritmo de separación del fenotipo siguiente: CD3(+)/CD4(+)/CD25(high)/CD127(-)/doble(-)/linaje(-)/dead(-).

El esquema de tinción ejemplar adoptado (anticuerpo; acrónimo de nombre de pigmento, nombre completo del pigmento)

- antiCD127 FITC (isotiocianato de fluoresceína)
- antiCD25 PE (ficoeritrina)
- antiCD16 PerCP (complejo de clorofila-proteína peridina)
- antiCD19 PerCP (complejo de clorofila-proteína peridina)
- antiCD8 PerCP (complejo de clorofila-proteína peridina)
- antiCD14 PerCP (complejo de clorofila-proteína peridina)
- antiCD4 APC (alofocianina)
- antiCD3 Azul Pacífico / Azul Pacífico

o equivalentes inducidos para emitir luz fluorescente en rangos similares del espectro.

La pureza de las células T_{reg} aisladas de esta manera era ~100% [mediana(min-max): 98%(97-99)]. Una importante modificación respecto del procedimiento anterior de los presentes inventores consistió en la aplicación del separador celular de flujo de entrada diseñado de acuerdo con buenas prácticas de fabricación (BPF). El separador se dotó de una línea de flujo de muestras sustituible, que eliminaba el riesgo de contaminación cruzada de las muestras de diferentes pacientes. Además, se aplicó medio CellGro que cumplía los estándares de BPF o X-VIVO. El medio se complementó con suero inactivo autólogo (al 10%) e interleuquina-2 (1000 U/ml). Se introdujeron en el cultivo las denominadas células artificiales presentadoras de antígenos [perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en proporción 1:1. Las células se cultivaron hasta alcanzar el número apropiado, aunque durante no más de 2 semanas [mediana(min-max): 10 días (7-12)].

Las modificaciones anteriormente indicadas permitieron alcanzar una estabilidad y calidad sustancialmente mejoradas de las células T_{reg} en cultivo en el producto final. La aplicación real de la preparación en terapia dependía de la satisfacción de los criterios siguientes: expresión de factor FoxP3 superior a 90% [mediana(min-max)=93%(90-97)], resultado positivo en el ensayo de inhibición de la producción de IFN γ y resultados negativos en los ensayos microbiológicos - nada de material genético de los virus VHB, VHC o VIH, y nula contaminación bacteriana en los sobrenadantes de cultivo. Antes de la infusión, las células se lavaron con PBS, se extrajeron las perlas magnéticas y se administraron en inyección intravenosa lenta en 250 ml de NaCl al 0,9% bajo la supervisión del anesthesiólogo dentro de la 1 h posterior a la liberación de producto. La dosis terapéutica era 20x10⁶/kg PC (n=6), o 10x10⁶/kg PC (n=4; en el caso de que no se alcanzase un número superior de células tras el cultivo durante 2 semanas), o 30x10⁶/kg de peso corporal. El grupo de control estaba constituido de pacientes que cumplían la totalidad de los criterios de inclusión anteriormente indicados en el ensayo, excepto por un acceso venoso apropiado, por lo que no se trató con la vacuna de T_{reg}. El ensayo no se aleatorizó ni se introdujo una muestra de blanco, y los niños del grupo de control no fueron

sometidos a ninguna intervención médica relacionada con los ensayos pendientes (muestreo de sangre, transfusión simulada, o similares). La Tabla 1 proporciona las características de los grupos sometidos a ensayo. Los puntos finales del ensayo fueron los siguientes: nivel de péptido C en ayuno, concentración de HbA1c, necesidad de insulina, especialmente la dosis diaria (DDI)=0,5 UI/kg de PC como indicador de remisión. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento autorizado por el Comité de Bioética de investigación independiente en la Medical University of Gdańsk (NKEBN/8/2010). Se obtuvo consentimiento por escrito para el procedimiento anterior de cada paciente y de los progenitores.

No se observó en ningún paciente el desarrollo de ninguna infección grave, episodios de hiper/hipoglucemia aguda o cualquier otro efecto secundario no deseable de la vacuna de T_{reg} en ningún momento durante el periodo de ensayo. En el caso de un paciente, la fecha de infusión de células T_{reg} coincidió con el diagnóstico de gripe un día después de la administración de las células T_{reg}.

A partir de la fecha de infusión y continuamente después, el nivel registrado en porcentaje de linfocitos T_{reg} en sangre periférica se incrementó significativamente (prueba de Wilcoxon, p=0,04) (fig. 1).

Dos semanas de después de la infusión de células T_{reg} se observó que todos los pacientes sometidos a la terapia mostraban una demanda sustancialmente reducida de insulina exógena y un nivel reducido de HbA1c (fig. 2).

Las primeras diferencias significativas entre el grupo de ensayo y los pacientes del grupo de control se observaron seis meses después de la formulación del diagnóstico de diabetes (5-6 meses después de la infusión de células T_{reg}). Los pacientes tratados continuaron en la etapa de remisión [DDI mediana(min-max)=0,24 UI/kg PC (0-0,55)], mientras que el grupo de control experimentó el final de la remisión [DDI mediana(min-max)=0,55 UI/kg BW (0,43-0,69)] (prueba de U de Mann-Whitney, p=0,03). Además, los niños tratados con células T_{reg} demostraron un nivel significativamente más alto de péptido C [mediana(min-max): 0,65 ng/ml (0,46-2,11) vs. 0,40 ng/ml (0,15-0,54)] (prueba de U de Mann-Whitney, p=0,04) (fig. 3). No se observaron diferencias con respecto a la eficacia de la terapia en pacientes en los que se habían administrado células T_{reg} a una dosis de 20x10⁶/kg PC o 10x10⁶/kg PC. Por lo tanto, todos los resultados del grupo de ensayo se presentan en bloque.

Literatura:

1. Marek N, Krzystyniak A, Ergenc I, Cochet O, Misawa R, Wang LJ, Golqb K, Wang X, Kilimnik G, Hara M, Kizilel S, Trzonkowski P, Millis JM, Witkowski P. Coating human pancreatic islets with CD4(+)CD25(high)CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection. *Ann Surg.* 2011;254(3):512-8; discussion 518-9.
2. Marek N, Bieniaszewska M, Krzystyniak A, Juscinska J, Mysliwska J, Witkowski P, Hellmann A, Trzonkowski P. The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy. *Cell Transplant.* 2011 (20):1747-1758;
3. Trzonkowski P. All roads lead to T regulatory cells. *Transplantation.* 2011;91(2):150-1.
4. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol.* 2009;133(1):22-6.
5. Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A. Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A.* 2009;75(3):175-88.
6. Ryba M, Marek N, Hak, Rybarczyk-Kapturska K, Myśliwiec M, Trzonkowski P, Myśliwska J. Anti-TNF rescue CD4+Foxp3+ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF. *Cytokine.* 2011;55(3):353-61.
7. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol.* 2006;119(3):307-16.
8. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszuk A, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.* 2004;112(3):258-67.
9. Trzonkowski P, Zaucha JM, Mysliwska J, Balon J, Szmit E, Halaburda K, Bieniaszewska M, Mlotkowska M, Hellmann A, Mysliwski A. Differences in kinetics of donor lymphoid cells in response to G-CSF administration may affect the incidence and severity of acute GvHD in respective HLA-identical sibling recipients. *Med Oncol.* 2004;21(1):81-94.
10. Golqb K, Krzystyniak A, Marek-Trzonkowska N, Misawa R, Wang LJ, Wang X, Cochet O, Tibudan M, Langa P, Millis JM, Trzonkowski P., Witkowski P. Impact of culture medium on CD4+ CD25highCD127lo/neg Treg expansion for the purpose of clinical application. *Int Immunopharmacol.* 2013. doi:pii: S1567-5769(13)00058-1. 10.1016/j.intimp.2013.02.016

REIVINDICACIONES

1. Vacuna terapéutica para la utilización en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 en niños, caracterizada porque contiene:

5

- células T_{reg} CD3(+)CD4(+) CD25(high) CD127(-).

Nivel de linfocitos T reguladores

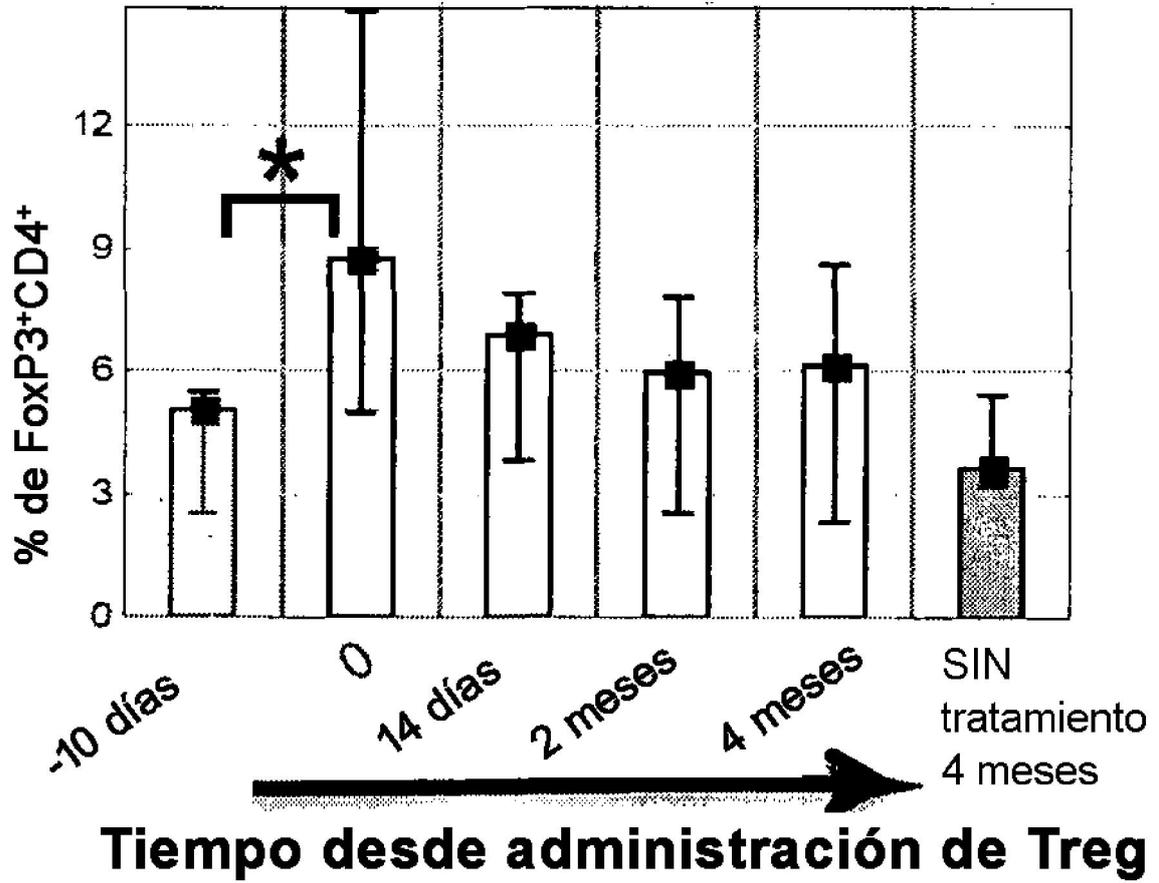


Fig. 1

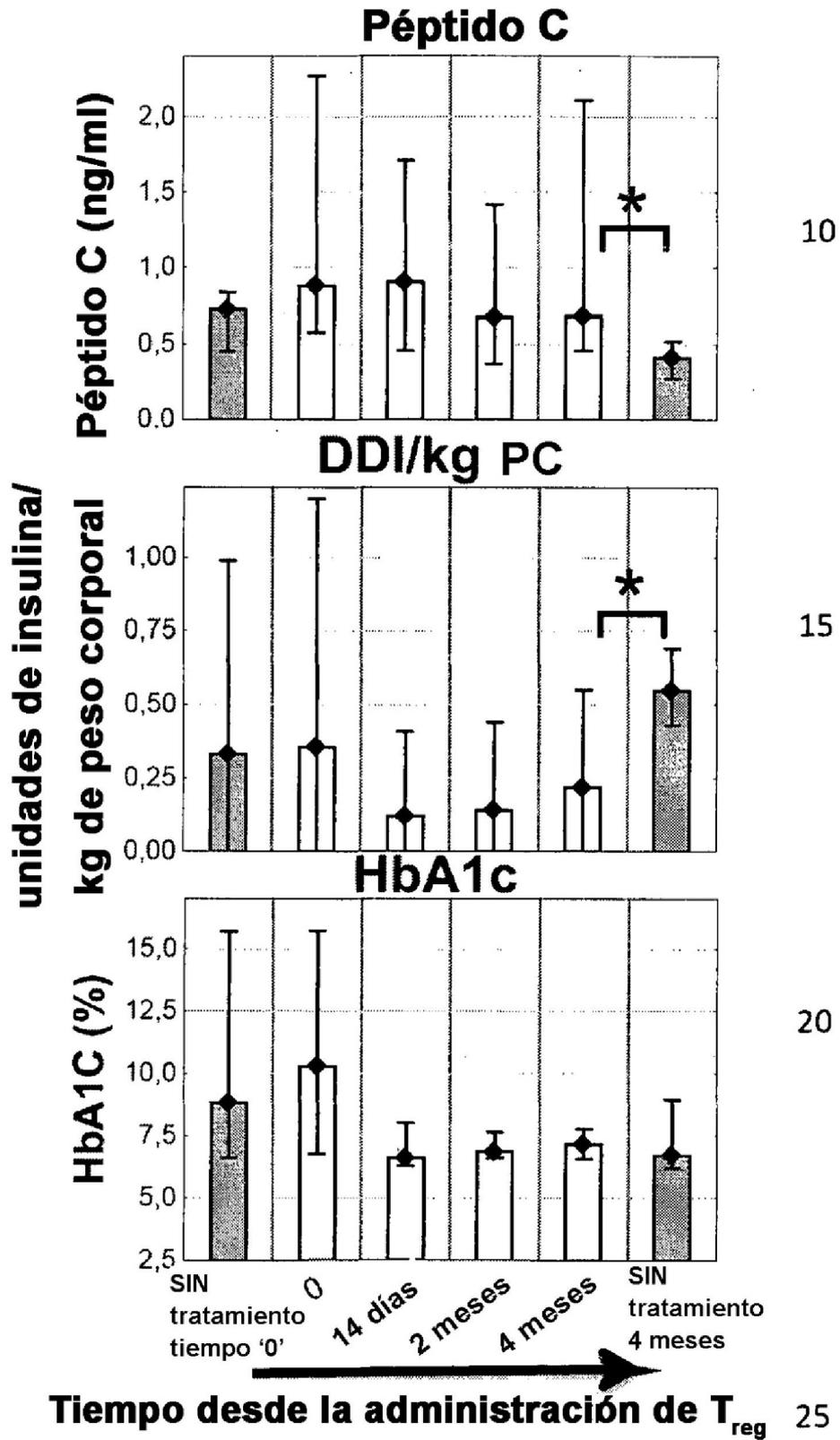


Fig. 2

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

	Tratados con T _{reg} (n=10)	Grupo de control no tratado (n=10)
Edad (años) [mediana; min-max]	12,2; 8-16	11,8; 7-16
IMC [mediana; min-max]	16,9; 14,2-21,5	16,9; 14,2-20,7
Glucemia en estómago vacío en el momento del diagnóstico (% mg) mediana; min-max	354; 151-588	354; 151-598
Polidipsia en el momento del diagnóstico (número de pacientes)	5	8
Poliuria en el momento del diagnóstico (número de pacientes)	5	8
Pérdida de peso corporal en el momento del diagnóstico (número de pacientes)	4	3
pH de sangre capilar en el momento del diagnóstico [mediana; min-max]	7,39; 7,36-7,46	7,39; 7,34-7,53
pO ₂ de sangre capilar en el momento del diagnóstico (mmHg) [mediana; min-max]	69,3; 63,4-88,0	69,0; 56,9-86,2
pCO ₂ de sangre capilar en el momento del diagnóstico (mmHg) [mediana; min-max]	39,1; 28,0-41,8	38,0; 24,0-41,0
HCO ₃ en el momento del diagnóstico (sangre capilar -mmHg) [mediana; min-max]	23,85; 18,8-25,0	23,3; 21,3-25,2
Equilibrio ácido-base (BE -mEq/l) [mediana; min-max]	-0,55; -7,8-1,0	-0,6; -7,0-0,9
SatO ₂ de sangre capilar en el momento del diagnóstico (%) [mediana; min-max]	94,1; 90,2-97,3	95,5; 92,4-98,0
Ig anti-GAD65 (número de pacientes)	10	10
Ig anti-ICA (número de pacientes)	5	5
Ig anti-IAA (número de pacientes)	9	8