



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 321237

(13) B1

(51) Int Cl.

*A61K 39/00 (2006.01)*

*A61K 35/14 (2006.01)*

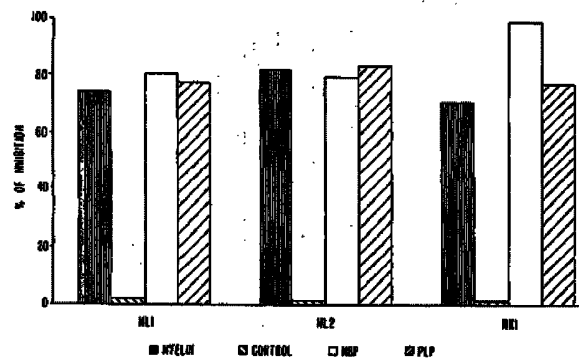
*C12N 5/08 (2006.01)*

### Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20001421	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.09.18 PCT/US98/19572
(22)	Inng.dag	2000.03.17	(85)	Videreføringsdag	2000.03.17
(24)	Løpedag	1998.09.18	(30)	Prioritet	1997.09.19, US, 59534 1998.09.17, US, 156509
(41)	Alm.tilgj	2000.05.19			
(45)	Meddelt	2006.04.10			
(73)	Innehaver	University of Southern California , 3716 South Hope Street, University Park, Suite 313, Los Angeles, CA 90007-4344, US			
(72)	Oppfinner	Leslie P. Weiner, Los Angeles, CA, US Jorge D. Correale,, Buenos Aires, AR			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	<b>Vaksiner, samt anvendelse av svekkede T-celler til fremstilling av et medikament for formidling av immunrespons i en pasient.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	Journal of neuroscience research, vol. 45, nr. 4, 1996, s. 500-511.			

(57) Sammendrag

Fremgangsmåter og preparater som er anvendelige for behandling av autoimmunsykdommer. Fremgangsmåte for fremstilling av vaksiner mot autoreaktive T-celler er også beskrevet. De således produserte vaksiner er i stand til å gjenopprette en grad av immunologisk selvtoleranse som er tilstrekkelig for å forsinke eller stanse progresjonen av autoimmunforstyrrelser. En foretrukket utførelsesform beskriver en vaksine som er avledet fra svekkede, autologe, autoreaktive T-celler som gjenkjenner mange forskjellige myelinavledete proteiner. Slike vaksinepreparater er anvendelige for immunologisk terapi for behandling av multipel sklerose (MS).



## Oppfinnelsens bakgrunn

### 5 Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår vaksiner samt anvendelse av svekkede T-celler til fremstilling av et medikament for formidling av immunrespons i en pasient.

### Beskrivelse av beslektet teknikk

10 Autoimmunsykdommer påvirker 5 – 7 % av den voksne populasjon i Europa og Nord-Amerika (Sinha AA, MT Lopez, et al. (1990) Science 248:1380-1387). Denne gruppe av sykdommer har en viktig sosioøkonomisk virkning, ikke kun fordi de har lang varighet, men også fordi de rammer individer i deres mest produktive år. Pasientene som får multippel sklerose (MS) er for eksempel hovedsakelig kvinner  
15 mellom 18 og 40 år.

Autoimmunsykdommer antas å resultere fra en ukontrollert immunrespons rettet mot selvantigener. I motsetning til dette antas individer som ikke danner en autoimmunrespons mot selvantigener å ha kontroll over disse responser, og antas å være "tolerante" for selvantigener. Selv om etiologien for MS forblir ukjent, støtter  
20 flere bevislinjer den hypotese at autoimmunitet spiller en betydelig rolle ved utvikling av sykdommen (Martin R, HF McFarland, et al. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10:153-187). For MS foreligger det bevis for at den ukontrollerte immunrespons er mot den hvite substans i sentralnervesystemet, og nærmere bestemt mot myelinproteiner som er lokalisert i den hvite substans. Til sist ødelegges  
25 myelinkappen som omgir aksjonene. Dette kan resultere i paralyse, sensorisk svikt og visuelle problemer. MS er kjennetegnet ved et T-celle- og makrofaginfiltrat i hjernen. I dag inkluderer myelinproteinene, som antas å være målet for en immunrespons ved MS, myelin-basisk protein (MBP), proteolipidprotein (PLP), myelinassosiert glykoprotein (MAG) og myelinoligodendrocyt-glykoprotein (MOG). Det foreligger  
30 også en økende mengde bevis for at T-cellereseptoren har ekstraordinær fleksibilitet som tillater den å reagere mot mange forskjellige proteiner (Brock R. KH Wiesmuller, et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93:13108-13113; Loftus DJ, Y Chen, et al. (1997) J. Immunol. 158:3651-3658.

Ytterligere understøttelse for dette konsept er basert på studier av  
35 eksperimentell, allergisk encefalomyelitt (EAE), en dyremodell med kliniske og patologiske likheter med MS. (Alvord, et al. Experimental allergic encephalomyelitis. A useful model for multiple sclerosis. New York: Alan R. Liss, 1984). Ved både EAE og MS antas myelin-basisk protein (MBP), proteolipidprotein (PLP) og MOG å være de viktigste målantigener for autoreaktive T-celler. (Brostoff

SW og DW Mason (1984) *J. Immunol* 133:1938 – 1942; Tabira og Kira, 1992). Myelinassosiert glykoprotein (MAG) kan være viktig ved MS, men produserer ikke EAE i eksperimentmodeller.

Den autoimmune karakter hos MS må forklares i forhold til epidemiologien som understøtter en rolle for et miljømiddel. Dette er antageligvis ett virus eller flere virus eller andre mikrober. Naturhistorien for sykdommen antyder også at infeksjon kan utløse akutte forverringer for visse pasienter. Debatten om en rolle for vedvarende infeksjon versus tilbakevendende infeksjon som igangsetteren av autoimmunsykdom forblir uoppgjort. Mekanismen for virusinteraksjon kan være molekylær etterligning av vertsprotein av invaderende mikroorganismer.

Immunologisk selvtoleranse synes primært å oppnås ved klonal delering av autoreaktive T-celler i tymus under negativ seleksjon, og i perifere lymfoidvev etter modning. Selv hos friske individer er imidlertid ikke alle autoreaktive T-celler delert i tymus. Autoreaktive T-celler representerer en del av det normale T-celle-repertoar og kan isoleres fra normale individer uten autoimmunsykdommer (Correale J. M McMillan, et al. (1995) *Neurology* 45:1370-1378). Autoreaktive T-celler kan således eksistere i periferien uten å forårsake sykdom. Dette antyder at post-tymiske mekanismer kontrollerer autoreaktive T-celler for å gi beskyttelse mot immunologiske angrep på seg selv. Et antall mekanismer er operative *in vivo* for å regulere autoreaktive T-celler. Slike mekanismer kan involvere antigenrettet T-celleklonal anergi eller regulatoriske cellulære nettverk som påvirker autoreaktive T-celler ved å reagere med deres idiotyper eller strukturer av deres stadium for aktiveringsergotype (Lohse AW, F Mor, et al. (1989) *Science* 244:820-822; Ben-Nun A, Wekerle, og IR Cohen (1981) *Nature* 292:60-61; Holoshitz J, Y Naparstek, et al. (1983) *Science* 219:56-58; og Maron R, R Zerubavel, et al. (1983) *J. Immunol.* 131:2316-2322). Mekanismene angående signaleringsmolekylene på mål-T-celler som utløser de idiotypiske interaksjoner er fremdeles ikke forstått, men antas å involvere både CDR2- og CDR3-hypervariable områder av T-cellereseptor V $\beta$ -kjeden. (Saruhan-Direskendi G, F Weber, et al. (1993) *Eur. J- Immunol.* 23:530-536). I pasienter med MS kan resistens av T-celler mot forskjellige regulatoriske kontroller forklare inntreden av autoimmunsykdommer i en kronisk progressiv fase (Correale J, W Gilmore, et al. (1996) *Nature Medicine* 2:1354 – 1360). Flere faktorer gjør behandling av MS spesielt vanskelig. Pasientens avvikende immunrespons mot nye myelinantigener ekspanderer for eksempel under den periode som pasienten synes å være under bedring (Correale J, M McMillan, et al: (1995) *Neurology* 45:1370 – 1378). Ved kronisk MS, i motsetning til akutt sykdom, er dessuten T-lymfocytene i stand til å presentere antigen mot seg selv uten en ekte antigenpresenterende celle, hvilket således ytterligere forsterker den unormale respons mot myelinproteiner (Correale J, W Gilmore, et al. (1995) *J. Immunol.* 154:2959-2968).

Forløpet av MS er svært variabelt. Mest typisk er sykdommen kjennetegnet ved et tilbakefallende mønster av akutte forverringer, etterfulgt av perioder med stabilitet (remisjoner). I mange tilfeller utvikles imidlertid dette mønster etter noen år til et sekundært progressivt forløp der den kliniske tilstand langsomt forverres. Hos 5 noen pasienter er dessuten sykdommen ubarmhjertig progressiv fra starten (primær progressiv MS).

Målet for immunologisk terapi er å gjenopprette toleranse uten å undertrykke hele immunsystemet og forårsake komplikasjoner som opportunistisk infeksjon, blødning og cancer. Forskjellige terapeutiske metoder er nå tilgjengelige for 10 mennesker. Disse inkluderer generelle cytotoksiske midler (cytoksan) som mangler selektivitet. Andre eksempler inkluderer cyklosporin og FK 506 som virker på cytokin IL-2 og dets reseptor; stråling som inkluderer apoptose og celledød; kortikosteroider; blokkering av MHC som forhindrer antigenbinding; blokkering av det invariante TCR-CD3-kompleks; blokkering av proinflammatoriske cytokiner og 15 deres reseptorer, slik som IL-2 og gamma-interferon, og anti-inflammatoriske cytokiner som beta-interferon; anti-adhesjonsmolekyler som CD2 eller LFA; og anti-T-celleaktivering med antistoff mot CD4; og anvendelse av anti-inflammatoriske cytokiner, slik som IL-10, TGF- $\beta$  og IL-4. Alle disse behandlinger er antigenuspesifikke og kan derfor ikke differensiere fysiologiske fra patologiske responser.

20 Undertrykkelse av immunsystemet på en mer spesifikk måte er mer ønskelig for kontroll av responsen mot selvantigener uten å nedregulere hele immunsystemet. Flere spesifikke immunterapier er blitt påtenkt og testet i senere år, og mange av disse er upraktiske eller virker ikke på mennesker. Det kan for eksempel syntetiseres høyaffinitetspeptider som reagerer med MHC klasse II-molekyler og forhindrer 25 bindingen av encefalitogene peptider og forhindrer derved aktiveringen av patogene T-celler. (A Franco et al. (1994) *The Immunologist* 2:97 – 102). Denne metode er ufordelaktig ved at det er vanskelig å oppnå effektive konsentrasjoner av inhibitorpeptider *in vivo* (Ishioka GY, L Adorini, et al. (1994) *J. Immunol.* 152:4310 – 4319). I en alternativ strategi er peptider som er analoger av encefalitogene 30 sekvenser (endrede peptidligander) vist å antagonisere T-cellereseptorene av antigenspesifikke T-celler og gjøre dem ureaktive, selv om den nøyaktige mekanisme fremdeles er ukjent (Jameson SC, FR Carbone, et al. 1993) *J Exp. Med.* 177:1541 – 1550; Karin N, DJ Mitchell, et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180 : 2227 – 2237; og Kuchroo VK, JM Greer, et al. (1994) *J. Immunol.* 153:3326 – 3336). Oral 35 administrering av myelin er blitt testet og funnet i EAE for å indusere en tilstand av immunologisk ureaktivitet antatt å bli formidlet ved induksjonen av en supressor-T-celle eller av anergi. (Weiner HL, A Friedman, et al. (1994) *Annu. Rev Immunol.* 12:809 – 837; Whitacre CC, IE Gienapp, et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2155 – 2163; og Khoury SJ, WW Hancock, et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176 : 1355

– 1364). Denne behandling er blitt funnet å være effektiv for noen, men ikke alle individer (Weiner HL, GA Mackin, et al. (1993) Science 259:1321 –1324). Et mest nylig fase II/III-forsøk i stor skala har ikke vist effektivitet med hensyn til remisjon/tilbakefall av MS (upubliserte resultater).

5 Noen undersøkelser har fokusert på antigenet eller T-cellen som produserer skaden. Studier har for eksempel vist at patogene T-celler som er i stand til å indusere autoimmunsykdommer i dyremodeller kan gjøres "avirulente" ved svekkelse og kan administreres som vaksiner for å forhindre etterfølgende indikasjon på sykdommen (Cohen IR (1989) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 54:879 –  
10 884). I disse studier induserte T-cellevaksinasjon effektive anti-idiotypiske og anti-ergotypiske T-responser. Nylige undersøkelser har vist at T-cellevaksinasjon med de avirulente celler i primater og mennesker rammet av reumatoid artirit og MS, er teknisk gjennomførbar og ikke-toksisk. Det er også blitt vist at det mulig å målrette og redusere en populasjon av autoreaktive T-celler involvert i autoimmunprosessen,  
15 ved anvendelse av T-cellevaksinasjon. Resultatene var imidlertid ikke definitive (Hafler DA, Cohen IR, et al. (1992) Clin. Immunol. and Immunopathol 62:307 – 313, Lohse AW, NPM Bukker, et al. (1993) J. Autoimmunity 6:121 – 130; van Laar JM, AMM Miltenburg, et al. (1993) J. Autoimmunity 6: 159 – 167; og Zhang J, R Medaer, et al. (1993) Science 261:1451 – 1454). Disse eksperimentelle behandlinger  
20 av MS har imidlertid kun målrettet myelin-basiske protein-aktiverede T-celler. Det er svært sannsynlig at MBP-reaktive T-celler kun representerer en liten gruppe av de autoreaktive T-celler som er ansvarlige for progresjonen av sykdommen.

Det finnes for tiden ingen effektiv terapi for primær eller sekundær MS. Det fremgår således at det er behov for forbedringer for å behandle MS og andre  
25 autoimmunforstyrrelser ved hjelp av en ikke-toksisk, effektiv immunspesifikk metode.

## **Oppfinnelsen**

### Oppsummering av oppfinnelsen

30 Foreliggende oppfinnelse er rettet mot manglene som er til stede i den kjente teknikk. Et aspekt av oppfinnelsen er en vaksine kjennetegnet ved at den omfatter svekkede T-celler som er rettet mot mer enn et myelinprotein, i en mengde som effektivt undertrykker multipel sklerose ved administrering til et menneske. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er T-cellene i vaksinen autologe. I en  
35 annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er T-cellene målrettet mot mer enn ett myelinprotein. Et annet aspekt av oppfinnelsen omfatter anvendelse av svekkede T-celler som er rettet mot mer enn et myelinprotein, for fremstilling av et medikament for formidling av immunrespons i en human pasient.

I en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen blir T-cellene dyrket i nærvær av en blanding av bovine myelinproteiner. I en ytterligere utførelsesform omfatter oppfinnelsen en vaksine, kjennetegnet ved at den omfatter, i en mengde som effektivt undertrykker multippel sklerose ved administrering til et menneske, svekkede T-celler, hvor de svekkede T-celler fremstilles ved dyrking av autologe, perifere mononukleære celler i nærvær av bovine totale myelinproteiner, seleksjon og ekspansjon av T-celler som reagerer på myelinproteinene og svekking av T-cellene ved bestråling.

#### 10 Kort beskrivelse av figurene

Figur 1A – 1D (samlet referert til heri som figur 1) viser EDSS-verdier og endringer i forekomstene av sirkulerende, bovine myelin-reaktive T-celler.

Figur 2A – 2C (samlet referert til her som figur 2) viser antallet interferon-gamma- og interleukin-2-sekreterende T-celler som er reaktive mot bovine myelinproteiner.

Figur 3A – 3D (samlet referert til heri som figur 3) illustrerer endringene i forekomstene av T-celler som er reaktive mot MBP, PLP og MOG-peptider.

Figur 4 viser inhibering av proliferasjonen av inokulater med anti-myelin-reaktive T-cellelinjer.

Figur 5 illustrerer cytotoxicitet av de anti-myelin-reaktive T-celler.

Figur 6 viser MHC-restriksjon av anti-myelin-reaktive T-celler.

#### **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

##### 25 Definisjoner

Anti-ergotypisk betyr mot strukturer for en aktiveringstilstand.

Anti-idiotypisk betyr mot de karakteristiske trekk hos en autoreaktiv T-celle.

Autoreaktiv betyr en B- eller T-celle som reagerer mot vertens egne vev.

Som angitt ovenfor angår foreliggende oppfinnelse en vaksine, kjennetegnet ved at den omfatter svekkede T-celler som er rettet mot mer enn et myelinprotein, i en mengde som effektivt undertrykker multippel sklerose ved administrering til et menneske. Vaksinen omfatter svekkede T-celler som antas å være autoreaktive. T-cellene tas fortrinnsvis fra pasienten som skal vaksineres. En ytterligere klargjøring av mål-T-cellesekvensene (inkludert sekvenser for T-cellerreseptorer) som gjenkjennes av anti-idiotypiske og anti-ergotypiske T-celler, kan anvendes for å utforme syntetiske peptider som tilsvarer dominerende sekvenser som er karakteristiske for patogene myelinreaktive T-celler. Denne metode kan derfor anvendes for å eliminere behovet for autolog T-cellevaksinasjon hvor hver pasient behøver hans eller hennes egen vaksine. T-celler blir fortrinnsvis fjernet fra pasienten

ved leukaferese. Patogene T-celler er beregnet å forekomme med en hyppighet på mellom 1:20 000 til 1:40 000 perifere blod-mononukleære celler (PBMC). For å få et effektivt utvalg av repertoaret er det derfor nødvendig å oppsamle så mange celler som mulig. Leukaferese gir i størrelsesordenen  $1 \times 10^9$  T-celler. Et tilstrekkelig antall autologe PBMC må også oppsamles for anvendelse som mateceller under dyrkingen av autoreaktive T-celler for vaksineutvikling.

De oppsamlede PBMC blir fortrinnsvis dyrket i nærvær av myelinproteiner fra kuer eller syntetiske, komplette, humane myelinproteiner når de er identifisert og blir tilgjengelige. Cellene som reagerer på myelinproteiner blir utvalgt og ekspandert. Dette oppnås ved dyrking av cellene i nærvær av spesifikke myelinantigener. De ikke-spesifikke celler går tapt i prosessen.

Cellene er svekket. Dette utføres fortrinnsvis ved bestråling av cellene ved 12 000 rad. Fordi disse T-celler er blitt utvalgt for deres reaktivitet overfor myelin må de avlives, ellers vil de angripe pasientens myelin når de injiseres. De bestrålede celler blir ikke nedfrosset, selv om de friske celler kan lagres nedfrosset og deretter bestråles og anvendes for fremtidig injeksjon i pasienten.

Pasienter mottar fortrinnsvis subkutane injeksjoner av svekkede T-celler hver 4 – 6 uke. Antallet celler er fortrinnsvis 40 000 000. Det optimale antall celler kan imidlertid variere fra pasient til pasient. Det foretrukne område av celler/vaksinasjon er mellom 30 og  $80 \times 10^6$ . Tidligere T-celle-vaksinasjonsprotokoller for multippel sklerose og reumatoid artritt har anvendt 30 –  $60 \times 10^6$  celler/vaksinasjon uten alvorlige bivirkninger (van Laar JM, AMM Miltenburg, et al. (1993) J. Autoimmunity 6:159-167; Zhang J, R Medaer, et al. (1993) Science 261:1451 – 1454). Inokulasjoner gis med 4 – 6 ukers mellomrom i 6 måneder, og avhengig av kliniske, immunologiske og MRI-data, kan dosen og intervallet for injeksjonene justeres.

Fortrinnsvis, dersom pasienter etter de første to inokulasjoner ikke reagerer klinisk på antallet administrerte myelin-autoreaktive T-celler, startes en doseopptrappingsadministrering. Antallet inokulerte celler kan økes med 25 % hver 3. måned til det punkt når ugunstige reaksjoner fremkommer. Denne type for gradvis opptrapping kan gi informasjon om de øvre sikkerhetsgrenser og indikere et doseområde hvor effektivitetsundersøkelser kan utføres. Dersom ingen opptrapping er nødvendig gis injeksjoner med 3 måneders intervaller i de neste 18 måneder. Ugunstige reaksjoner kan være reaksjoner som; 1) systemiske symptomer som fordrer at pasienter innlegges på sykehus; 2) en fase med økende uførhet som utvikler seg to eller flere trinn i EDSS-skalaen over to påfølgende oppsatte neurologiske evalueringer; 3) CD4+-lymfocyt-tellinger lavere enn  $500 \text{ celler/mm}^3$ .

Uten å ønske å være bundet av noen spesiell teori antas virkningsmekanismen for vaksinen å være en vertsrespons mot det T-cellereseptor (TCR)variable

område på den bestrålede patogene T-celle som inneholdes i vaksinen. Dette område er det eneste areale som man tror er forskjellig på den patogene T-celle sammenlignet med andre naturlige eller aktiverte T-celler. Metoden beskrevet heri er basert på hypotesen at det er mange involverte  $V_{\alpha}$  og  $V_{\beta}$ -familier, fordi progressiv MS har så mange forskjellige antigenspesifikke responser, og immundominante epitoper kan være forskjellige fra pasient til pasient. Dette tillater at T-celler fra hver pasient aktiveres mot epitoper som de har møtt *in vivo*. Når de inaktiveres ved bestråling blir TCR antigener og induserer enten et anti-idiotypisk antistoff eller en T-cellerespons mot  $V_{\alpha}$  og  $V_{\beta}$ -områdene av mange forskjellige patogene T-celler i denne pasient. Resultatet er enten nedregulering eller utslettelse av eksisterende og fremtidige patogene responser. Fordi dette er en "drept" vaksine, kan det være nødvendig å gi en forsterkningsinjeksjon én gang pr år for å bevare inaktiveringen, eller "drepningen" av de anti-myelin-spesifikke T-celler.

#### Eksempel 1

Fire pasienter med klart bestemt sekundær progressiv MS og uten respons på noen annen tilgjengelig behandling ble undersøkt. Aldersområde var 32 – 45 år, og ingen kjønnskriterier ble benyttet. Progresjon på minst én enhet i Kurtzke-skalaen forekom i året før start av behandlingen. Pasientene var ellers friske og hadde ingen andre sykdommer som kunne forklare deres neurologiske tilstander. Alle pasienter var frie for immunterapi i 60 dager, eller steroider i minst 90 dager, før starten av denne protokoll. To pasienter hadde aldri mottatt noen tidligere behandling for MS.

Perifere blod-mononukleære celler (PBMC) ble oppsamlet ved leukaferese. Ca  $10^5$ - $10^6$  myelinproteinspesifikke T-celler kan oppsamles pr aferese. For å oppsamle  $40 \times 10^6$  celler for vaksinasjon var det påkrevet med en 40 – 400 gangers utvidelse. Leukaferese ble utført før vaksinasjon. Det gikk 6 – 8 uker mellom den første aferese og den første injeksjon.

Rutineblodprøver ble oppsamlet for immunologisk sikkerhet ved hjelp av standard venepunktur. Pasienter ble bedt om å gi 50 – 70 ml blod med 1 måneds mellomrom i 3 måneder, og deretter med 2 måneders mellomrom i 21 måneder, for rutinebestemmelse for sikkerhetsmålinger og for å bestemme effekten av vaksinasjonsprogrammet på immunsystemet.

For å etablere autoreaktive T-cellelinjer ble PBMC dyrket i serumfritt medium supplert med gentamicin og stimulert med bovine totale myelinproteiner preparert i overensstemmelse med standard protokoller (Correale J, M McMillan, et al. (1995) *Neurology* 45:1370 – 1378) og sterilisert ved filtrering gjennom et 0,22  $\mu$  filter. Etter 5 – 7 dager ble celler ekspandert ved anvendelse av 50 U/ml rekombinant humant IL-2 (Cetus). T-cellelinjer ble restimulert etter 10 – 14 dager ved anvendelse av autologt bestrålte PBMC som antigenpresenterende celler (APC) og bovine

myelinproteiner. Sykluser med restimulering og ekspansjon ble gjentatt ukentlig inntil responsen på myelinantigener påvist i proliferasjonsanalyser overskred responsen på kontrollantigener med tre ganger. På dette tidspunkt, vanligvis etter 3 – 4 sykluser med restimulering og ekspansjon, ble aktiverte myelinspesifikke T-celler separert fra APC ved anvendelse av Ficoll-gradiensseparasjon, vasket i sterilt fosfatbufferet saltvann (PBS) og bestrålt for svekkelse (12 000 rad Cs<sup>137</sup>). Alikvoter av levende celler ble frosset (før bestråling) for fremtidige injeksjoner administrert hver 6 – 12 uker. For disse injeksjoner ble celler tinet og deretter bestrålt like før inokulering.

Hver pasient mottok  $40 \times 10^6$  celler resuspendert i 1 ml sterid PBS og injisert subkutant (0,5 ml/arm). Før injeksjon ble en alikvot av T-cellepreparatet testet for bakterievekst, endotoksiner, sopp, cytomegalovirus, herpes simplex, adenovirus, varicella zoster og mykoplasmer (GMP). En hudtest ble dessuten utført ved anvendelse av intradermal injeksjon av 25 000 – 50 000 T-celler suspendert i 0,1 ml sterid PBS for å teste for direkte type-hypersensitivitet. Disse prosedyrer ble gjentatt før hver inokulasjon. Pasientene ble holdt som innlagte pasienter i de første 48 timer etter vaksinasjon. Vaksinasjon ble gjentatt med 3 måneders mellomrom for de første to pasienter og med 6 ukers mellomrom for de andre to pasienter i 6 måneder, og deretter ble alle fire pasienter vaksinert med 3 måneders mellomrom.

Pasientene ble overvåket for å bestemme hvorvidt det var noen progresjon eller forbedring av neurologiske mangler og neurofysiologisk profil. Neurologisk progresjon ble definert som en økning av ett eller flere EDSS-trinn opprettholdt i mer enn 90 dager. Alle pasienter gjennomgikk en basislinje- og en årlig MRI-undersøkelse (hjerne eller ryggmarg i overensstemmelse med lokalisering av lesjonene) 12 og 24 måneder etter vaksinasjon. En reduksjon av lesjonsareale og prosentvis endring av lesjonsareale fra basislinje til ett og to år for individuelle individer, ble anvendt som parametre for effektivitet. Pasienter bør få utført MRI med 3 måneders mellomrom for å undersøke effektivitet og bestemme vaksinens dose og hyppighet. Hyppighet av sirkulerende myelinreaktive T-celler før og etter hver inokulasjon ble målt for å bestemme hvorvidt en reduksjon i slike celler korrelerte resiprokt med de proliferative responser fra perifere blod-mononukleære celler på inokulatene.

Kriterier for avslutning av behandling var graviditet. CD4+-lymfocyt-tellinger lavere enn  $500 \text{ celler/mm}^3$ , forekomst av grad III- eller IV-toksicitet, anvendelse av andre undersøkelsesmessige eller eksperimentelle terapier av MS, en fase med økende uførhet som fremskrider to eller flere trinn på EDSS-skalaen uopphørlig i en 6 måneders periode, eller alvorlig interkurrent sykdom som utelukker fortsatt behandling med T-cellevaksine.

### Måling av immunologisk respons

T-cellerrespons på inokulatene undersøkt i PBMC ved anvendelse av en standard 60 timers proliferasjonsanalyse, og responsene ble sammenlignet med T-celleblaster preparert samtidig ved hjelp av PHA-stimulering og hvilende autoreaktive myelin-T-celler (8 – 10 dager etter den siste stimulering med antigenpresenterende celler og myelin). Hyppighet av T-celler som er i stand til å undertrykke proliferasjonen av inokulater ble målt ved anvendelse av frekvensanalyse. Kulturer som oppviste mer en 60 % inhibering av proliferasjonen av inokulater ble betraktet som reagerende T-cellelinjer. Anti-idiotypiske og anti-ergotypiske responser ble evaluert ved anvendelse av standard Cr<sup>51</sup>-frigjøringsanalyser. Mønstre for cytokinsekresjon av anti-idiotypiske, anti-ergotypiske og myelinreaktive T-celler ble evaluert ved hjelp av ELISA og ELISPOTS. Fenotypebestemmelse av de regulatoriske populasjoner og friskt PBMC ble undersøkt ved anvendelse av strømningscytometrianalyse.

### Resultater

De foreliggende oppfinnere har nylig isolert anti-idiotypiske og anti-ergotypiske T-celler ved hjelp av *in vitro*-stimulering av T-celler med autologt bestrålte autoreaktive PLP CD4+ T-celler. Disse anti-idiotypiske og anti-ergotypiske T-cellekloner uttrykker en CD8+-fenotype og lyserer *in vitro* autoreaktive CD4+PLP T-cellekloner.

Etter vaksinasjon viste tre av de testede pasienter ingen endring i EDSS-verdi ved oppfølgingstester utført i 414 dager (pasient ML), 326 dager (pasient MK) eller 171 dager (pasient GL). Pasientene viste dessuten ingen T-cellerrespons på bovin myelin (figur 1). Hos disse tre pasienter ble det observert en reduksjon i antall interferon-gamma (IFN-gamma) og interleukin-2 (IL-2) sekreterende T-celler som er reaktive overfor bovine myelinproteiner (figur 2). Hos alle fire pasienter ble det også observert dramatiske reduksjoner i hyppighetene av T-celler som er reaktive overfor MBP-, PL- og MOG-peptider (figur 3). Figur 4 viser inhibering av proliferasjon av inokulatene med anti-myelinreaktive T-cellelinjer. Figur 5 viser cytotoxiciteten av de anti-myelinreaktive T-celler. Figur 6 viser MHC-restriksjon av anti-myelinreaktive T-celler.

Som konklusjon understøtter oppfinnernes tidligere data oppfatningen at T-celler fra kronisk progressive MS-pasienter er resistente overfor forskjellige immunsuppressive mekanismer, så vel som immunmodulatorisk legemiddelfase (Correale J., W. Gilmore, et al. (1996) Nature Medicine 2:1354 – 1360). Disse funn representerer den fornuftmessige begrunnelse for å utvikle nye alternativer for behandling av progressiv MS. Den bredt baserte immunrespons i denne gruppe av

**pasienter fordrer at det bredeste område av antigenspesifikke T-celler inaktiveres. Denne terapeutiske fremgangsmåte er en unik T-cellevaksine og er beskrevet i protokollen.**

Patentkrav

- 5 1. Vaksine,  
karakterisert ved at den omfatter svekkede T-celler som er rettet mot mer enn et myelinprotein, i en mengde som effektivt undertrykker multippel sklerose ved administrering til et menneske.
- 10 2. Vaksine ifølge krav 1,  
karakterisert ved at den omfatter T-celler dyrket i nærvær av bovine totale myelinproteiner.
3. Vaksine ifølge krav 2,  
15 karakterisert ved at den er fremstilt ved utvelgelse og ekspansjon av T-celler som reagerer på myelinproteiner.
4. Vaksine ifølge krav 1,  
karakterisert ved at T-cellene er avledet fra autologe, perifere,  
20 mononukleære celler.
5. Vaksine ifølge krav 1,  
karakterisert ved at T-cellene er svekket ved bestråling.
- 25 6. Vaksine ifølge krav 4,  
karakterisert ved at T-cellene nedfryses før de svekkes.
7. Anvendelse av svekkede T-celler som er rettet mot mer enn et myelinprotein, for fremstilling av et medikament for formidling av immunrespons i en human  
30 pasient.
8. Anvendelse ifølge krav 7,  
hvor T-cellene er avledet fra autologe, perifere, mononukleære celler.
- 35 9. Anvendelse ifølge krav 7, hvor T-cellene omfatter T-celler dyrket i nærvær av bovine totale myelinproteiner.

10. Anvendelse ifølge krav 9, hvori T-cellene fremstilles ved seleksjon og ekspansjon av T-celler som reagerer på myelinproteiner.

11. Anvendelse ifølge krav 7, hvori de svekkede T-celler svekkes ved bestråling.

5

12. Anvendelse ifølge krav 7, hvori at T-cellene administreres subkutant.

13. Anvendelse ifølge krav 7, hvori T-cellene administreres i 4 til 6 ukers intervaller.

10

14. Anvendelse ifølge krav 7, hvori T-cellene administreres i ca 18 måneder.

15. Anvendelse ifølge krav 7, hvori T-cellene administreres i en første dose på  $30 \times 10^6$  til  $80 \times 10^6$  svekkede T-celler.

15

16. Anvendelse ifølge krav 15, hvori den ytterligere omfatter mer enn én administrert dosering, hvor senere doseringer økes hvis det ikke blir noen klinisk respons på den første dosering, opp til det punkt hvor det inntreer ugunstige reaksjoner eller klinisk respons.

20

17. Vaksine ifølge krav 1,

karakterisert ved at de svekkede T-celler fremstilles ved;

dyrking av autologe, perifere mononukleære celler i nærvær av bovine totale myelinproteiner;

25

seleksjon og ekspansjon av T-celler som reagerer på myelinproteinene; og svekking av T-cellene ved bestråling.

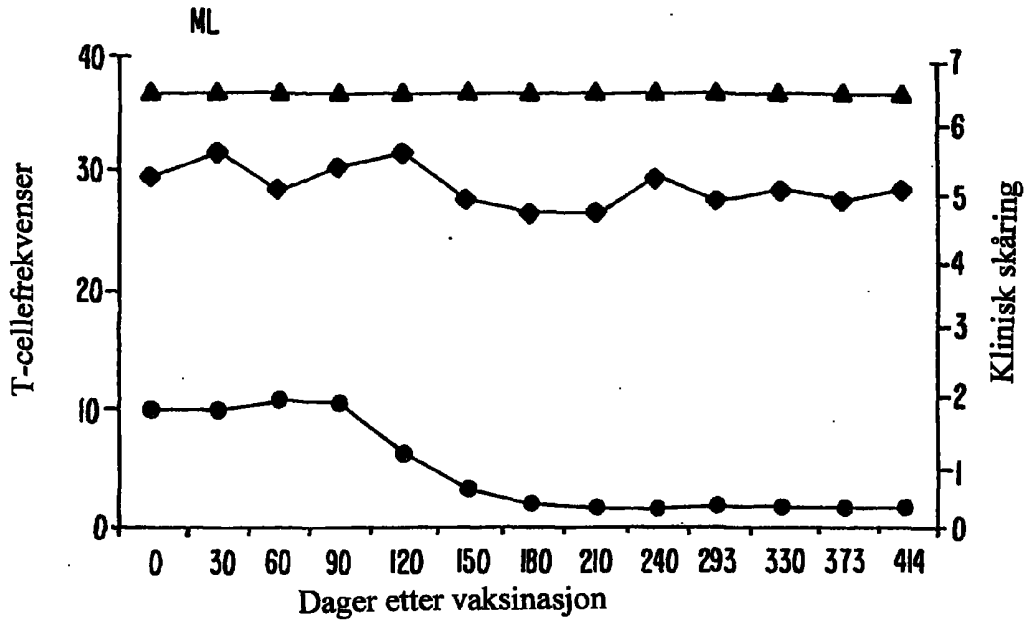


FIG. 1A.

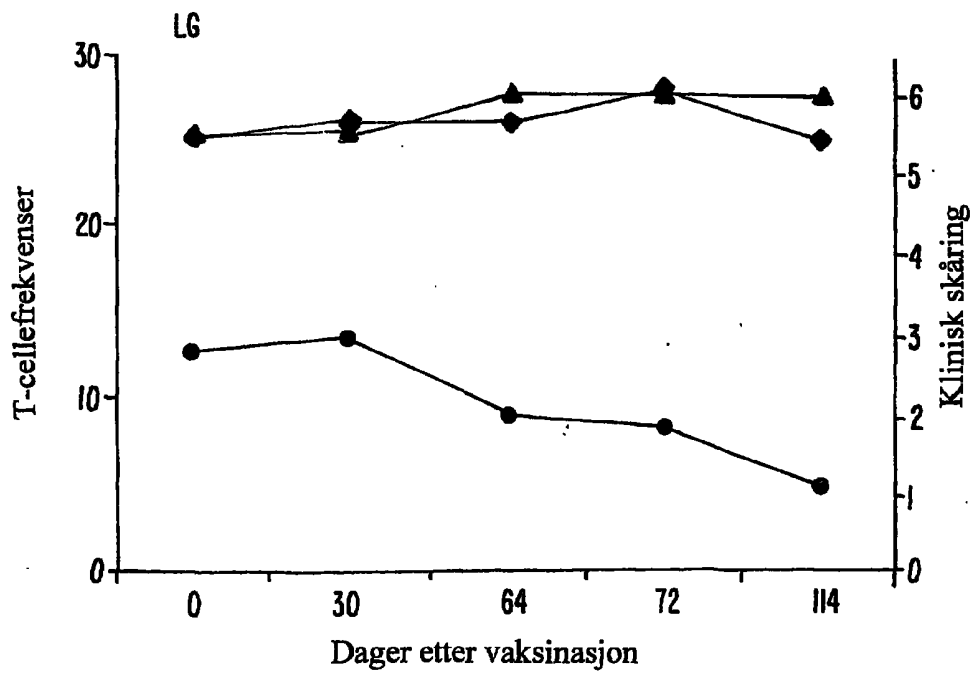


FIG. 1B.

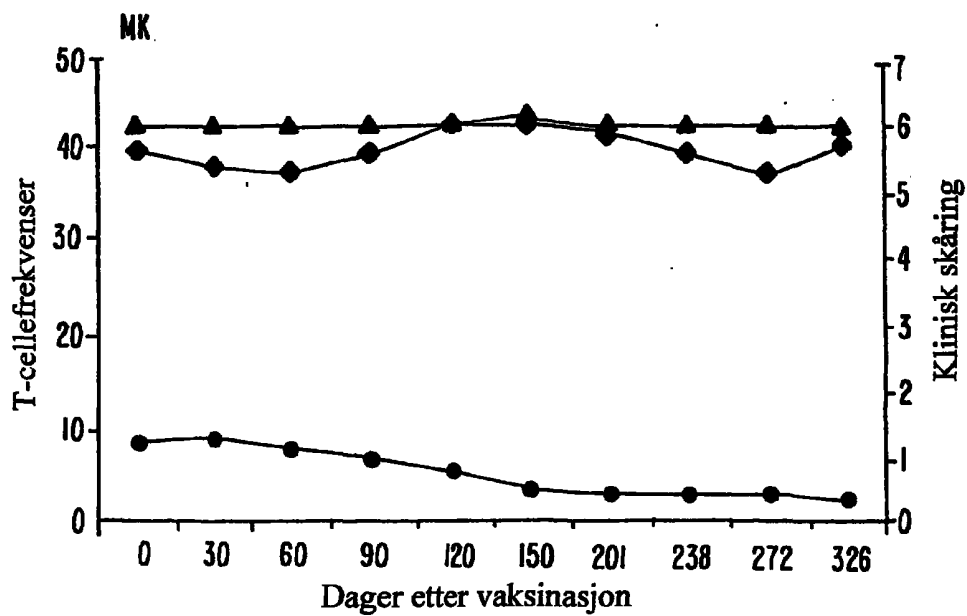


FIG. 1C.

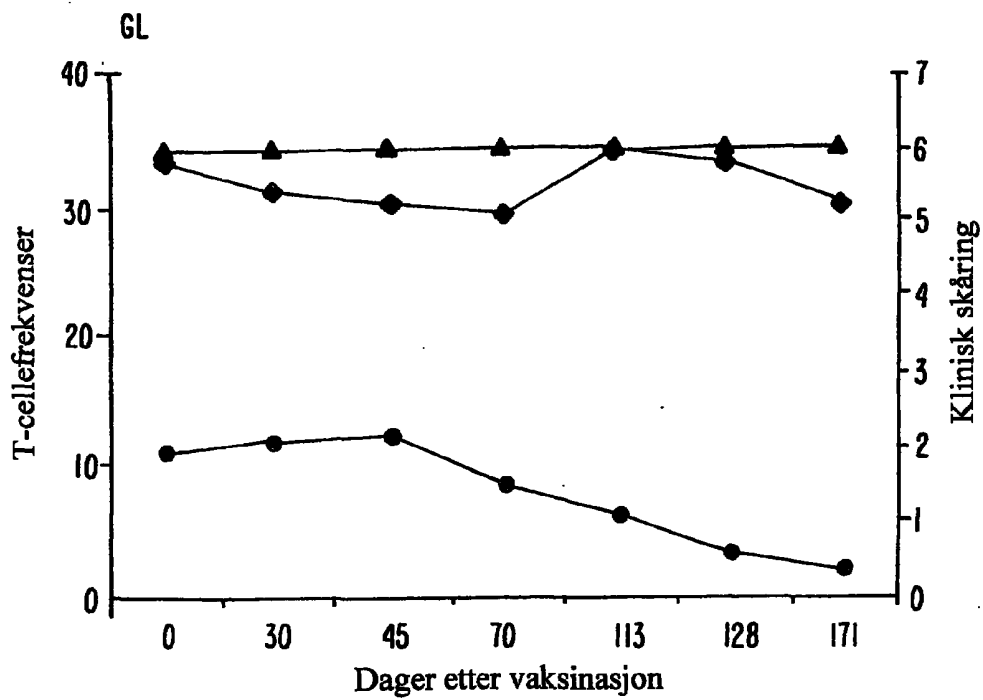


FIG. 1D.

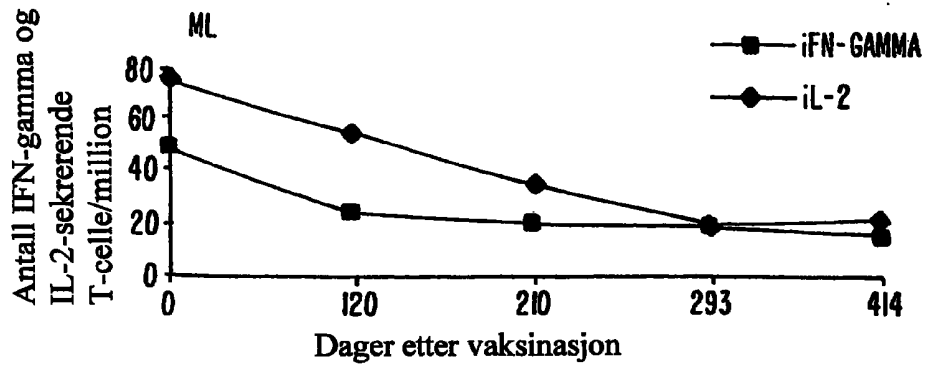


FIG. 2A.

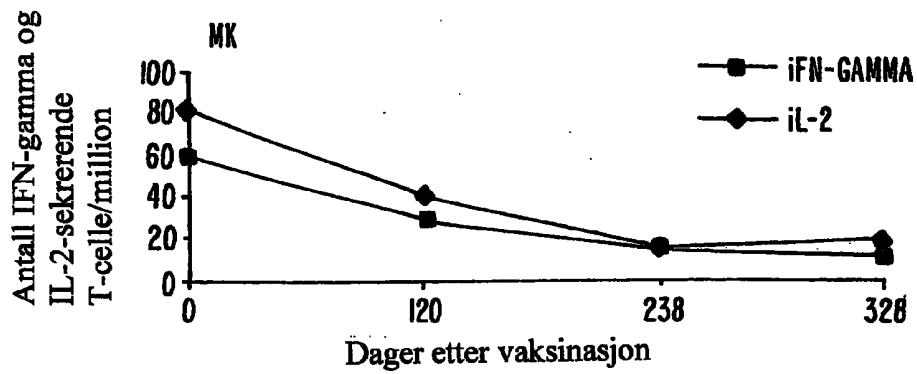


FIG. 2B.

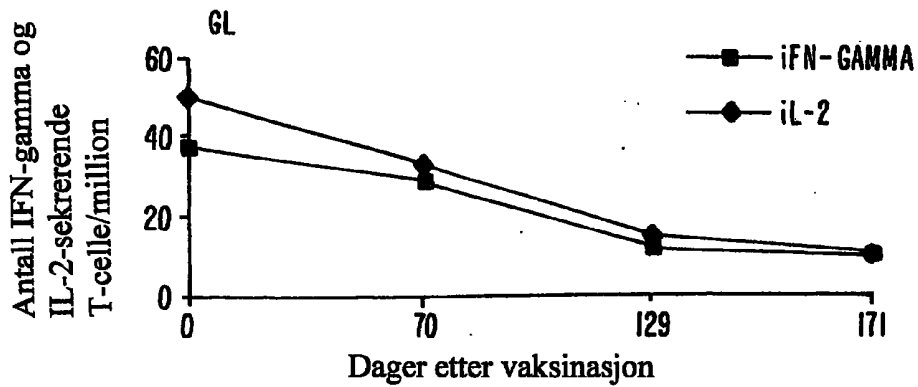
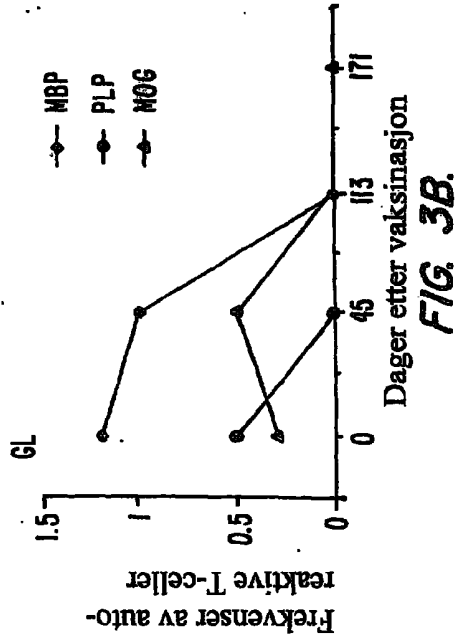
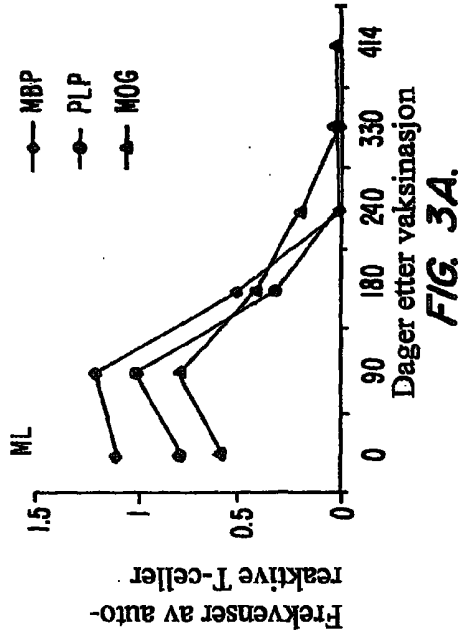
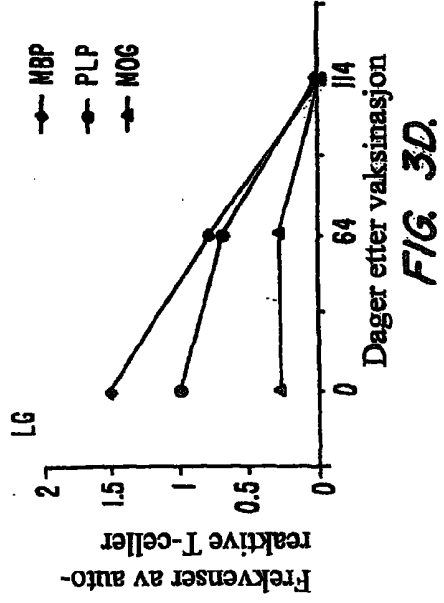
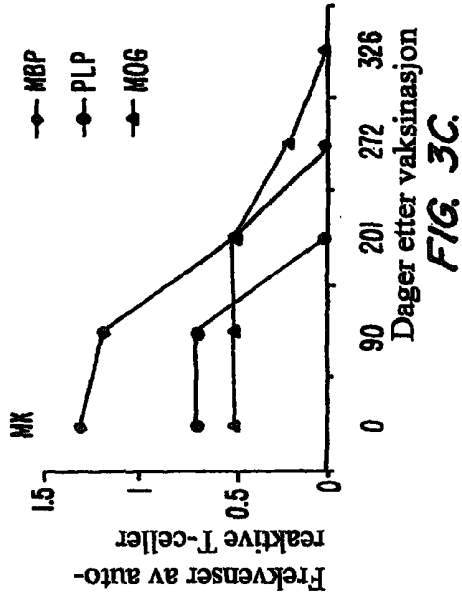


FIG. 2C.



5/7

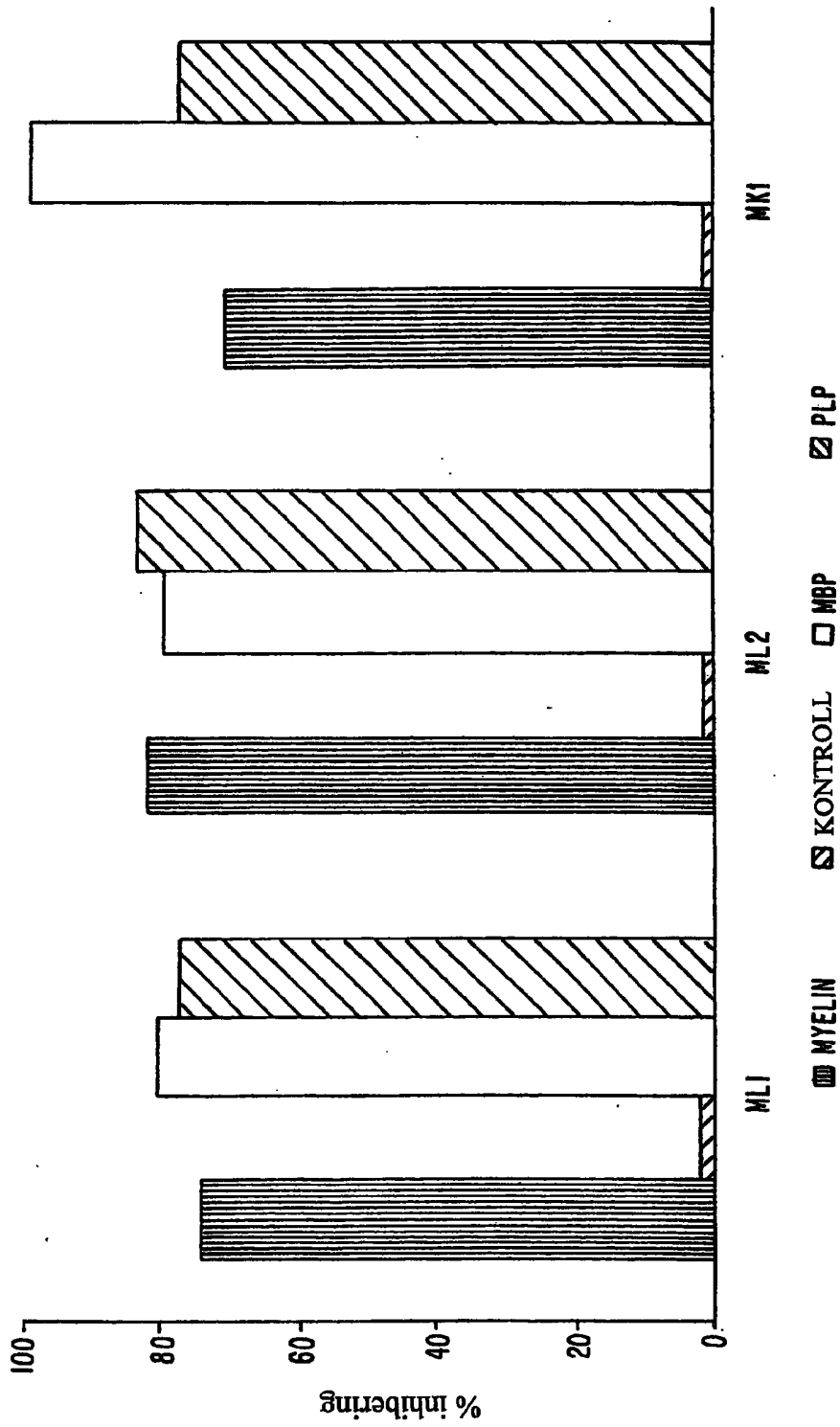


FIG. 4.

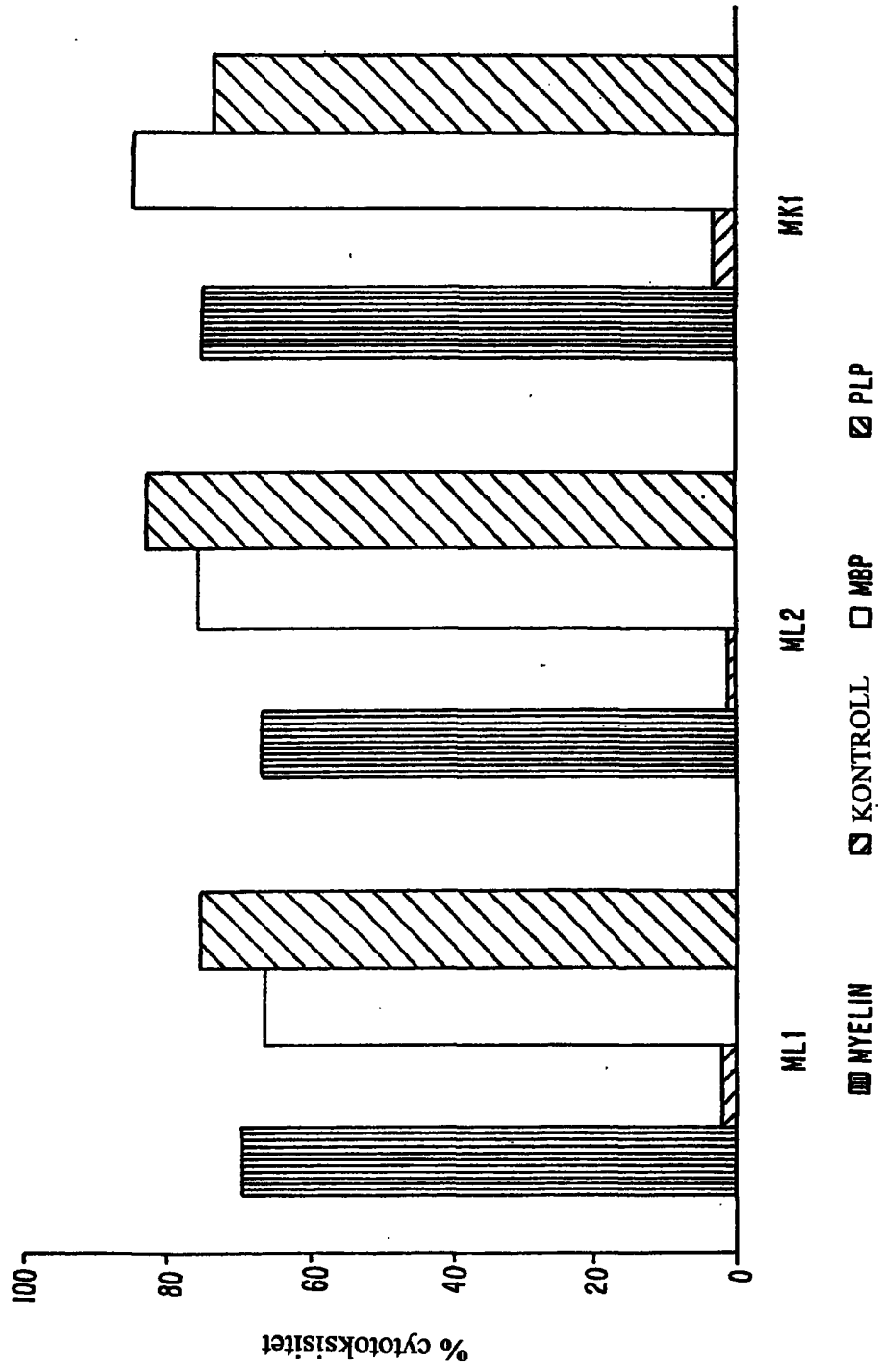


FIG. 5.

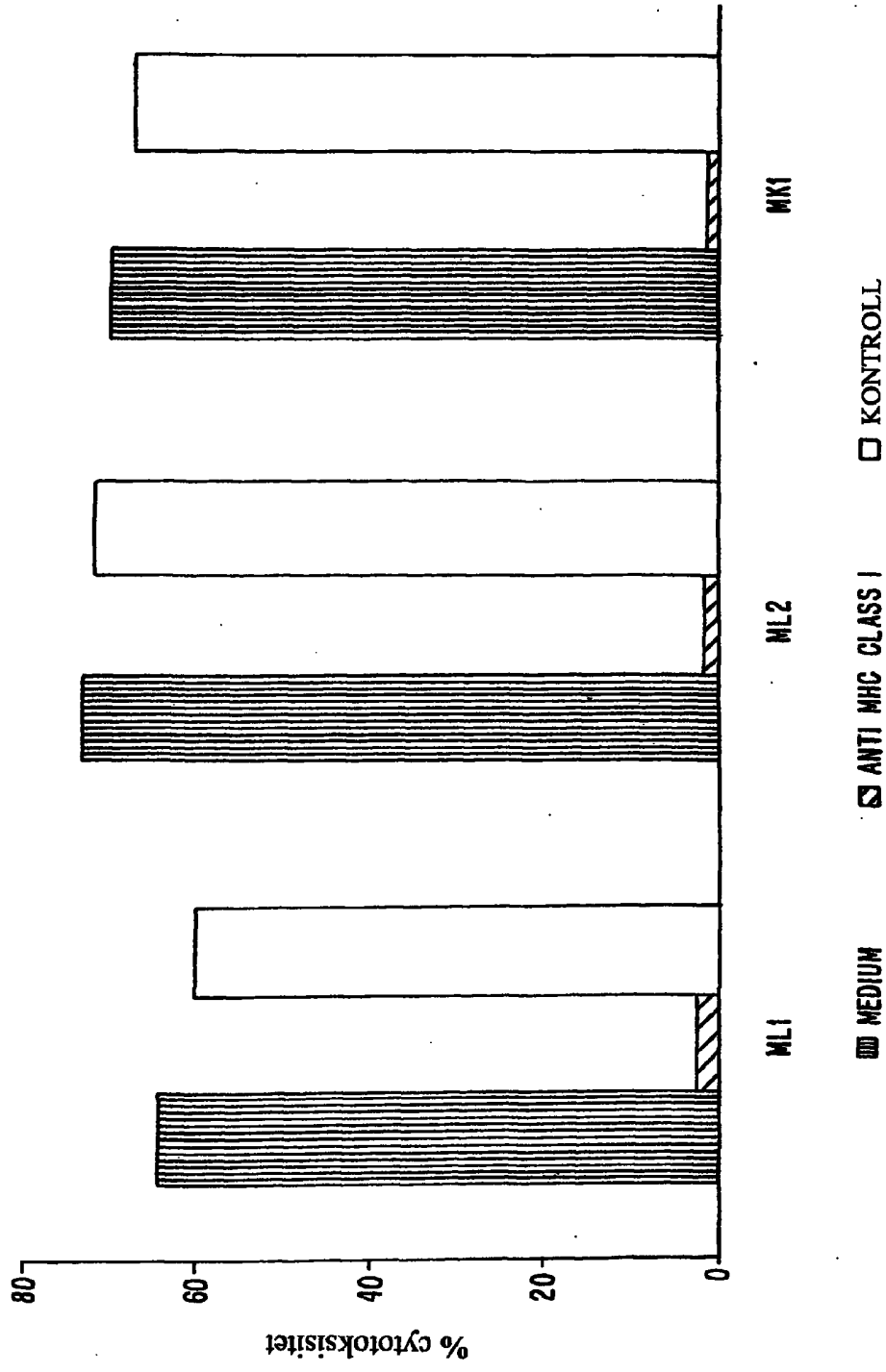


FIG. 6.