



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 463**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04258069 .6**

96 Fecha de presentación : **22.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1550454**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54

Título: **Fotoféresis extracorpórea en combinación con tratamiento anti-TNF.**

30

Prioridad: **23.12.2003 US 532076 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

73

Titular/es: **THERAKOS, Inc.**
437 Creamery Way
Exton, Pennsylvania 19341, US

72

Inventor/es: **Gregory, David;**
Campbel, Kim;
Giles-Komar, Jill y
Harriman, Gregory

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 463 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

Fotoféresis extracorpórea en combinación con tratamiento anti-TNF

Antecedentes

La presente solicitud se refiere a tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmune.

- 5 Las enfermedades autoinmunes implican activación inapropiada de células inmunitarias que son reactivas contra tejidos propios. Estas células inmunitarias promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. Otras enfermedades que implican linfocitos T incluyen Enfermedad de Injerto frente a Hospedador (GVHD) que tiene lugar en el contexto de trasplante. En GVDH los linfocitos T del donante rechazan los tejidos y órganos del receptor organizando un ataque contra el cuerpo del receptor. Un huésped de otras enfermedades implica desregulación del sistema inmune del huésped. Algunas se tratan mejor con productos farmacéuticos, algunas con productos biológicos, otras con tratamientos tales como fotoféresis extracorpórea, y aún otras tienen otras opciones de tratamiento muy limitadas.

- 10 La fotoféresis extracorpórea (ECP) ha estado mostrando ser una terapia efectiva en ciertas enfermedades mediadas por linfocitos T. En el caso de GVHD, se ha usado fotoféresis como un tratamiento en asociación con pomada triamciclolona tópica, antifúngicos, antivirales, antibióticos, inmunoglobulinas y metotrexato. La ECP se ha usado también con agentes inmunosupresores tales como micofenolato de mofetilo, tacrolimus, prednisona, ciclosporina, hidroxicloroquina, esteroides, FK-506 y talidomida para cGVHD y cGVHD refractaria. Para trasplantes de órganos sólidos, ECP se ha usado en conjunción con agentes inmunosupresores para reducir el número de episodios de rechazo de aloinjerto agudo asociado con aloinjertos renales y trasplantes cardiacos. Por ejemplo, ECP se ha usado con OKT3 y/o los agentes inmunosupresores prednisona, azatioprina, y ciclosporina para revertir rechazo de aloinjerto renal agudo. La ECP también se ha usado con ciclofosfamida, irradiación corporal fraccionada total y etopósido para el trasplante de médula alogénica para leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielode crónica, linfoma no de Hodgkin, o grave anemia aplásica.

- 15 A pesar del uso de la combinación actual de ECP con otros agentes terapéuticos, sigue existiendo la necesidad de una combinación de ECP con un agente concomitante para tratar pacientes que tienen enfermedades mediadas por el sistema inmune, hipersensibilidades atópicas o GVDH, donde los tratamientos existentes no son tan efectivos como podrían ser de otro modo o pueden tener efectos secundarios graves o son difíciles de administrar a los niveles en los que cada tratamiento se administra por sí mismo.

- 20 Los monocitos y macrófagos segregan factor de necrosis tumoral (TNF- α) en forma de una citocina en respuesta a endotoxina u otros estímulos. TNF- α es un homotrímero soluble de subunidades proteicas de 17 kD. Células distintas de monocitos o macrófagos también fabrican TNF- α . Por ejemplo, las líneas celulares tumorales no monocíticas humanas producen TNF. TNF- α ha estado implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, bacterianas y parasitarias, malignidades, y/o enfermedades neurodegenerativas y es un objetivo útil para terapia biológica específica en enfermedades, tales como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. La administración de anticuerpos como un tratamiento no ha estado libre de problemas. Por ejemplo, usar un antagonista de TNF- α , en algunos casos, ha contribuido a la aparición de graves infecciones. Reducir la dosificación de tales sustancias reduciría complicaciones del tratamiento.

- 25 El uso exitoso de antagonistas de TNF tal como infliximab y etanercept en combinación con metotrexato (MTX) se ha comunicado para tratamiento de artritis y varios de estos agentes están actualmente aprobados por agencias reguladoras para este uso. Aunque estos agentes han sido un gran paso adelante en el tratamiento de artritis, por una diversidad de razones hay una minoría sustancial de pacientes quienes bien no responden o bien responden débilmente a estos agentes. Aún quedan asuntos de tratamiento difíciles para pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden evitar completamente la progresión de la enfermedad. Aunque agentes tales como metotrexato, esteroides y otros agentes quimioterapéuticos tienen una larga historia de uso en el tratamiento de diversas enfermedades inmunológicas, incluyendo artritis reumatoide, los pacientes que usan estos compuestos pueden tener efectos tóxicos principales, tales como anomalías hepáticas, pulmonares, renales y de la médula ósea. Los pacientes que usan estos compuestos pueden tener también efectos secundarios menores tales como estomatitis, malestar, náuseas, diarrea, dolores de cabeza y alopecia suave; sin embargo, éstos se pueden tratar con suplemento de folato. Así, hay una necesidad de tratamiento de combinación más seguro para artritis con antagonista de TNF además de los productos actualmente aprobados.

- 30 Redei y col., "Salvage therapy with infliximab for patients with severe acute and chronic GVHD", Blood, vol. 98, n.º: 11. Parte 1, página 399a, describe la administración de infliximab a una dosis de 10 mg/kg y la administración de (PUVA) (psolareno + tratamiento de rayos UVA -un tratamiento in vitro-).

- 35 Couriel y col., "Infliximab for the treatment of graft-versus-host disease in allogeneic transplant recipients: an update", Blood, vol. 96, n.º: 11. Parte 1, página 400A, describe la administración de Infliximab a 10 mg/kg y la terapia de salvamento adicional incluyendo fotoféresis.

- 40 Rook y col., "Photopheresis: Clinical applications and mechanism of action" Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, vol. 4, n.º: 1, páginas 85-90 resume el uso de fotoféresis para tratar linfoma de linfocito T cutáneo, rechazo de aloinjerto y enfermedad autoinmune.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un producto combinado que comprende:

- a) una población de células *ex vivo* que ha sido sometida a un tratamiento inductor de la apoptosis *ex vivo* y

b) infliximab en una dosis que no exceda de 3 mg/kg,

para administración combinada, simultánea o secuencial a un paciente para tratar una enfermedad autoinmune o para la mejora de uno o más síntomas de la misma.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende infliximab para usar en un procedimiento para tratar un paciente con un trastorno autoinmune o la predisposición a un trastorno autoinmune en el que dicho procedimiento comprende analizar al paciente para determinar si el paciente tiene un trastorno autoinmune, y administrar infliximab en una dosis que no exceda de 3 mg/kg y ECP si tal paciente tiene un trastorno autoinmune o una predisposición a tal trastorno.

10 La invención proporciona un producto para un tratamiento mejorado para GVHD y otros trastornos relacionados inmunitarios permitiendo dosis más bajas de inhibidor de TNF- α (y así bajar toxicidad), tiempo de prolongación entre infusiones e incrementar la eficacia tanto del tratamiento celular (por ejemplo, ECP) como del inhibidor de TNF- α .

Descripción detallada de la invención

Los términos "sujeto" o "paciente" se usan intercambiamente y se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero y más preferentemente a un ser humano.

15 Un "población celular" incluye generalmente un tipo celular encontrado en sangre. El término puede incluir uno o más tipos de células sanguíneas, específicamente, los glóbulos rojos, las plaquetas, y los glóbulos blancos. Una población celular puede comprender subtipos de glóbulos blancos, por ejemplo, linfocitos T, células dendríticas, linfocitos B, etc. En una realización, una población celular puede comprender una mezcla o reserva de tipos celulares. Alternativamente, una población celular puede comprender un tipo sustancialmente purificado de células, por ejemplo, linfocitos T o células dendríticas.

20 "Procedimiento de ECP" o "ECP" se refiere a fotoféresis extracorpórea, también conocida como fototerapia extracorpórea. Es un tratamiento de una población de células que se ha sometido a luz UVA y a un compuesto fotoactivable. Preferentemente la población de células es de un órgano o tejido; más preferentemente, la población de las células es una parte de sangre; y lo más preferentemente, la población de células es una capa leucoplaquetaria. ECP se usa algunas veces para referirse a un procedimiento en el que una población celular se ha sometido a un procedimiento inductor de apoptosis con luz UVA en presencia de un agente de reticulación de DNA tal como un psoraleno (preferentemente, 8-MOP).

25 Los efectos secundarios que se refieren en esta especificación son los efectos no deseados y adversos de un agente concomitante terapéutico. Los efectos adversos son siempre no deseados, pero los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso a partir de un agente terapéutico podría ser dañino o incómodo o peligroso. Los efectos secundarios de administración de un anticuerpo anti-tratamientos con TNF- α pueden incluir, pero no se limitan a, riesgo de infección y de reacciones de hipersensibilidad. Otros efectos secundarios varían a partir de síntomas no específicos tales como fiebre o resfriados, prurito o urticaria, y reacciones cardiopulmonares tales como dolor pectoral, hipotensión, hipertensión o disnea, a efectos tales como mialgia y/o artralgia, sarpullido, edema facial, manual o labial, disfagia, garganta irritada y dolor de cabeza. Aún otros efectos secundarios pueden incluir, pero no se limitan a, hernia abdominal, infarto esplénico, esplenomegalia, mareo, lesiones neuronales motoras superiores, síndrome de lupus eritematoso, nódulos reumatoides, ceruminosis, dolor abdominal, diarrea, úlceras gástricas, obstrucción intestinal, perforación intestinal, estenosis intestinal, náuseas, pancreatitis, vómitos, dolor de espalda, fractura ósea, trastorno o daño de tendones, fallo cardíaco, isquemia miocárdica, linfoma, trombocitopenia, celulitis, ansiedad, confusión, delirio, depresión, somnolencia, intentos de suicidio, anemia, abscesos, infecciones bacterianas y sepsis.

30 Los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan intercambiamente en esta memoria descriptiva. La expresión "enfermedad atópica" se usa de forma intercambiable con la expresión "trastorno inflamatorio" al hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación. Los trastornos autoinmunes pueden o no pueden estar asociados con inflamación. Además, la inflamación puede o no puede ser causada por un trastorno autoinmune. Así, ciertos trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunes como como trastornos inflamatorios.

Los agentes concomitantes de esta invención incluyen un agente inmunomodulador relacionado con TNF- α . El agente inmunomodulador usado en los productos combinados de la invención es un antagonista de TNF- α que es REMICADE® (infliximab).

50 REMICADE® (infliximab), disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad de TNF- α *in vitro*, *in situ* y/o preferentemente *in vivo*.

El antagonista de TNF- α de la invención se administra preferentemente por medios parenterales, subcutáneos, intramusculares, intravenosos o intraarticulares. Otros medios son también posibles incluyendo medios intrabronquiales, intraabdominales, intracapsulares, intracartilagosos, intracavitarios, intraceliales, intracerebelares, intracerebroventriculares, intra-cólicos, intracervicales, intragástricos, intrahepáticos, intramiocárdicos, intraóseos, intrapélvicos, intrapericárdicos, intraperitoneales, intrapleurales, intraprostáticos, intrapulmonares, intrarrectales, intrarrenales, intrarretinales, intraespinales, intrasinoviales, intratorácicos, intrauterinos, intravesicales, de bolos, vaginales, rectales, bucales, sublinguales, intranasales o transdérmicos.

60 En una realización de la invención que proporciona composiciones para usar en terapias de combinación para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune en un sujeto, las terapias incluyen administrar a un sujeto una población de células que se ha sometido a un tratamiento inductor de apoptosis, por ejemplo, una población de células que se ha sometido a fotoféresis extracorpórea (ECP) y un antagonista de TNF- α .

La combinación de ECP y un agente concomitante (es decir, antagonista TNF- α) produce un mejor efectoterapéutico en un sujeto que cada tratamiento solo. En ciertas realizaciones, la combinación de ECP y un agente concomitante logra un efecto terapéutico 2 veces o más (y preferentemente un efecto de 10 a 20 veces) mejor efecto terapéutico en un sujeto en un sujeto con una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad, GVHD, o rechazo de trasplante que cada tratamiento solo. En otras realizaciones, la combinación de ECP y un antagonista de TNF tiene un efecto más que aditivo en un sujeto con una enfermedad autoinmune, GVHD y un rechazo de implante o de trasplante. Los productos de combinación para usar en las terapias de la invención permiten administración menos frecuente de ECP a un sujeto con un efecto autoinmune para lograr un efecto terapéutico; permiten dosificaciones menores de los antagonistas de TNF- α utilizados en conjunción con ECP para la prevención o el tratamiento de una enfermedad inmunitaria autoinmune, enfermedad atópica, o GVHD y/o administración menos frecuente de tal antagonista de TNF- α a un sujeto con una enfermedad autoinmune, o con GVHD para lograr un efecto terapéutico. Ellos reducen o evitan efectos secundarios indeseados o adversos asociados con la administración de terapias de agentes individuales actuales y/o terapias de combinación existentes para enfermedad autoinmune, o GVHD, lo que a su vez mejora la conformidad del paciente con el protocolo de tratamiento.

La disminución de las dosificaciones y/o de la frecuencia de administración de ECP o de agente concomitante a un sujeto con una enfermedad autoinmune mejora la calidad de vida de un paciente que sufre tal terapia. Las dosificaciones y/o la frecuencia de administración de ECP o de agente concomitante a un sujeto con una enfermedad autoinmune o una enfermedad se pueden reducir y se puede lograr aún así una reducción del 20% o más (y preferentemente una reducción del 90%-98% o mayor) en la inflamación de un órgano, tejido o articulación particular en el paciente.

En una realización, la ECP se usa en combinación con anticuerpos anti-TNF- α monoclonales. El anticuerpo anti-TNF monoclonal más preferido es infliximab (REMICADE®). El antagonista de TNF- α usado en las composiciones de la invención es infliximab (REMICADE®). Infliximab (REMICADE®) es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

En otra realización preferida de la invención, REMICADE® (infliximab) se suministra como un polvo liofilizado estéril para infusión intravenosa para reconstituirse con 10 ml de agua estéril para inyección. Cada vial de un solo uso de REMICADE® (infliximab) contiene 100 mg de infliximab, 500 mg de sacarosa, 0,5 mg de polisorbato 80, 2,2 mg de fosfato de sodio monobásico y 6,1 mg de fosfato de sodio dibásico. De acuerdo con El Vademecum estadounidense (PDR) (55ª ed., 2001), la dosis total del producto reconstituido debe diluirse adicionalmente hasta 250 ml con inyección de Cloruro de Sodio al 0,9% (USP), con la concentración de infusión variando entre 0,4 mg/ml y 4 mg/ml. En la invención, la dosis no excede de 3 mg/kg. En ciertas realizaciones preferidas, REMICADE® (infliximab) es para administración por infusión intravenosa seguida por una dosis adicional a 2 y 6 semanas después de la primera infusión cada 8 semanas a partir de entonces.

En una realización de la invención, se administra REMICADE® (infliximab) a una dosis de aproximadamente 2,5 mg/kg en combinación con ECP. En las realizaciones preferidas la cantidad de REMICADE es significativamente más baja con el fin de que la toxicidad sea más baja cuando la sinergia sea fuerte y la enfermedad lo justifique (tal como GVHD). En estas realizaciones la frecuencia de ECP y/o de tratamiento anti-TNF- α se reduce en un 20%, más preferentemente en un 40% y lo más preferentemente por lo menos en un 50%.

Se administra secuencialmente ECP, en cualquier orden, con el/los antagonista(s) de TNF- α de esta invención. Esto puede también hacerse cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de un agente concomitante durante un periodo de tiempo, seguida por la administración de una población celular que comprende células apoptóticas durante un periodo de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. Preferentemente, una población celular que comprende células apoptóticas (tal como una obtenida durante ECP) se administra al menos aproximadamente 15-60 minutos antes o después de un agente concomitante. La población celular que comprende células apoptóticas puede, sin embargo, administrarse a intervalos mucho mayores antes o después de un antagonista de TNF- α . Por ejemplo, en algunos casos es posible administrar la población celular que comprende células apoptóticas al menos aproximadamente 1 día a 30 días o más antes o después de la administración de un agente concomitante y obtener aún el efecto beneficioso de la terapia de combinación.

Las poblaciones celulares útiles en la terapia de los procedimientos revelados en el presente documento comprenden "células apoptóticas", que incluyen células y cuerpos celulares, es decir, cuerpos apoptóticos, que presentan, o presentarán, una o más características que caracterizan apoptosis. Una célula apoptótica puede comprender cualquier célula que esté en la fase de Inducción, la fase Efectora, o la fase de Degradación. Las poblaciones celulares reveladas en el presente documento pueden comprender también células que han sido tratadas con un agente inductor de apoptosis que sean todavía viables. Tales células pueden mostrar características que caractericen apoptosis en algún punto, por ejemplo, después de administración al sujeto.

La ECP induce directamente niveles significativos de apoptosis. Esto se ha observado, por ejemplo, en linfocitos de pacientes de CTCL, de GVHD y de escleredema. Las células apoptóticas contribuyen al efecto clínico observado.

Las características que caracterizan la apoptosis pueden incluir, pero no se limitan a, exposición de superficie a fosfatidil-serina, tal como se detecta mediante procedimientos estándar de detección tales como tinción con Anexina V; alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial medidas por procedimientos aceptados estándar (por ejemplo, Salvioli y col., 411 FEBS LETTERS 77-82 (1997)); evidencia de ADN de fragmentación tal como la aparición de escalonamiento de DNA en electroforesis en gel de agarosa tras extracción de DNA de las células (Teiger y col., 97 J. CLIN. INVEST. 2891-97 (1996)), o por etiquetado in situ (Gavrieli y col., 1992 anteriormente referido).

La población celular para usar en la presente invención se induce para llegar a ser apoptótica *ex vivo*, es decir, -extracorpóreamente, y es compatible con aquella del sujeto, donante, o receptor. Una población celular se puede preparar a partir de sustancialmente cualquier tipo de célula de mamífero incluyendo líneas celulares cultivadas. Por

ejemplo, una población celular se pueden preparar a partir de un tipo celular derivado del propio cuerpo del sujeto mamífero o a partir de una línea celular establecida. Específicamente, una población celular se puede preparar a partir de leucocitos de la sangre compatible con la del sujeto mamífero, más específicamente, de los propios leucocitos del sujeto e incluso más específicamente, de los propios linfocitos T del sujeto.

5 Una población celular también se puede preparar a partir de una línea celular establecida. Una línea celular que puede ser útil en los procedimientos de la presente invención incluye, por ejemplo, células Jurkat (ATCC N.º: TIB-152). Otras líneas celulares apropiadas para usar de acuerdo con la presente invención pueden identificarse y/o determinarse por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. La población celular se pueden preparar extracorpóreamente antes de la administración al sujeto, donante, o receptor. Así, en una realización, una alícuota de la sangre del sujeto, de la sangre del receptor, o de la sangre del donante se puede retirar, por ejemplo por venopunción y al menos una parte de los leucocitos de la misma se puede someter extracorpóreamente a las condiciones que inducen apoptosis.

10 En una realización, la población celular puede comprender un subgrupo particular de células incluyendo, pero no limitadas a, células dendríticas, linfocitos reguladores T CD4 CD25+ y linfocitos CD4+. La separación y purificación de los componentes de la sangre se conoce bien por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Es más, la llegada de terapia de componente de sangre ha dado lugar a numerosos sistemas diseñados para la recogida de los componentes específicos de la sangre. Varios de estos sistemas de recogida están comercialmente disponibles a partir de, por ejemplo, Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, PA), Baxter International (Deerfield, IL) y Dynal Biotech (Oslo, Noruega).

15 El sistema de separación de Immunicon separa componentes de la sangre usando nanopartículas magnéticas (ferrofluidos) recubiertos con anticuerpos que se conjugan, es decir, forman un complejo, a los componentes objetivos en una muestra de sangre. La muestra de sangre se incuba después en un fuerte campo magnético y el complejo objetivo migra a partir del resto de la muestra donde se pueda recoger después. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.ºs: 6,365,362; 6,361,749; 6,228,624; 6,136,182; 6,120,856; 6,013,532; 6,013,188; 5,993,665; 5,985,153; 5,876,593; 5,795,470; 5,741,714; 5,698,271; 5,660,990; 5,646,001; 5,622,831; 5,597,531; 5,541,072; 5,512,332; 5,466,574; 5,200,084; 5,186,827; 5,108,933; y 4,795,698.

20 El sistema de separación Biomagnético Dynal Dynabeads® separa los componentes de la sangre usando perlas magnéticas revestidas con anticuerpos que se conjugan a los componentes objetivo en una muestra de sangre, formando un complejo Dynabeads-objetivo. El complejo se retira después de la muestra usando un Concentrado de Partículas Magnéticas (Dynal MPC®). Varios tipos celulares diferentes se pueden recoger usando este sistema de separación, incluyendo por ejemplo, células dendríticas derivadas de monocitos (Kit de Aislamiento Negativo de Monocitos, Prod. N.º: 113.09), células dendríticas derivadas de células CD34+ (Selección de Sistema de Células Progenitoras Dynal®) y monocitos humanos (Dynabeads® CD 14: Aislamiento Positivo de Monocitos para Análisis Molecular, Prod de N.ºs: 111.11 ó 111.12). Los linfocitos T y los subgrupos de linfocitos T también se pueden aislar positivamente o negativamente o deplecionarse de sangre completa, capa leuco-plaquetaria, células mononucleares de gradiente o digestiones de tejidos usando, por ejemplo, kit CELlection™ CD2 (Prod. N.º: 116.03), perlas de Dyna-5® M-450 CD2 (Prod. N.º: 111.01/02), Dynabeads® CD3 (Prod. N.º: 111.13/14), Dynabeads® más DETACH-aBEAD (Prod. N.º: 113.03), Dynabeads® M-450 CD4 (Prod. N.º: 111.05/06), Kit de Aislamiento Negativo de CD4 (linfocitos T ayudantes/inductores) (Prod. N.º: 113.17), Kit de Aislamiento Positivo de CD8 (Prod. N.º: 113.05), CD8 (Dynabeads® Prod. N.º: 111.07/08), CD8 (Kit de Aislamiento Negativo Prod. N.º: 113.19), Kit de Aislamiento de linfocitos T Negativos (Prod. N.º: 113.11), Dynabeads® CD25 (Prod. N.º: 111.33/34), y perlas de Dyna® Expansor de linfocitos T CD3/CD28 (Prod. N.º: 111.31). Baxter International ha desarrollado varios sistemas de aféresis en base a las propiedades de centrifugación, incluyendo el separador de células de sangre SC-3000, el separador Amicus y el Autopheresis-Csystem. The SC-3000 El separador de células de la sangre SC-3000 recoge tanto productos de aféresis como plasma. Ello comprende un flujo continuo con un separador con un sistema centrifugal de cámara doble que recoge productos de aféresis. El Amicus opera bien en un flujo continuo o bien en formato de flujo intermitente para recoger plaquetas y plasma de donante individual. El sistema de Autopheresis-C se diseña para la recogida de plasma de donantes y puede recoger más de 250 ml de plasma. Véanse también, las patentes de los EE.UU. N.ºs: 6,451,203; 6,442,397; 6,315,707; 6,284,142; 6,251,284; 6,033,561; 6,027,441; y 5,494,578.

25 En la realización más preferida de la invención, se usa ECP para inducir apoptosis. Esto implica un compuesto fotoactivable añadido a una población celular *ex vivo*. El compuesto fotosensible se puede administrar a una población celular que comprende células sanguíneas siguiendo su retirada del sujeto, receptor, o donante, como puede ser el caso y antes de o de forma simultánea con exposición a luz ultravioleta. El compuesto fotosensible puede administrarse a una población celular que comprende sangre entera o una fracción de la misma con la condición de que las células objetivo de la sangre reciban el compuesto fotosensible. En otra realización, una parte de la sangre del sujeto, de la sangre del receptor, o de la sangre del donante podría procesarse primero usando procedimientos conocidos para eliminar los eritrocitos y el compuesto fotoactivo que se puede administrar después a la población de células resultantes que comprende la fracción de leucocitos enriquecida.

30 En una alternativa a la presente invención, el compuesto fotoactivable puede administrarse *in vivo*. El compuesto fotosensible, cuando se administra a una población celular que comprende la sangre del sujeto, la sangre del receptor, o la sangre del donante, como puede ser el caso, *in vivo* puede administrarse oralmente, pero también se puede administrar intravenosamente y/o mediante otras vías de administración convencionales. La dosificación oral del compuesto fotosensible puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 0,7 mg/kg, más específicamente, de aproximadamente 0,6 mg/kg. Cuando se administra oralmente, el compuesto se puede administrar al menos aproximadamente una hora antes del tratamiento de fotoféresis y no más de aproximadamente tres horas antes del tratamiento de fotoféresis.

35 Los compuestos fotoactivables para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, compuestos conocidos como psoralenos (o furanocumarinas) así como derivados de psoraleno tales como aquellos descritos en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º: 4,321,919 y la Patente de los E.E.U.U. N.º: 5,399,719. Los

5 compuestos preferidos incluyen 8-metoxipsoraleno; 4,5 '8-trimetilpsoraleno; 5-metoxipsoraleno; 4-metilpsoraleno; 4,4-dimetilpsoraleno; 4-5'-dimetilpsoraleno; 4'-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4'- hidroximetil-4,5', 8-trimetilpsoraleno; 4',8-metoxipsoraleno; y un grupo 4'-(omega-amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, incluyendo pero no limitadas a 4'-(4-amino-2-oxa)-butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. En una realización, el compuesto fotosensible que se pueden usar comprende el derivado de psoraleno, amotosaleno (S-59) (Cerus, Corp., Concord, CA). En otra realización, el compuesto fotosensible comprende 8-metoxipsoraleno (8-MOP).

10 La población celular a la que se ha añadido el compuesto fotoactivable se trata con una la luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable. La etapa de tratamiento que activa el compuesto fotoactivable se lleva a cabo preferentemente usando luz ultravioleta (UVA) de longitud de onda larga, por ejemplo, a una longitud de onda dentro del intervalo de 320 a 400 nm. La exposición a luz ultravioleta durante el tratamiento de fotoféresis se administra preferentemente durante una duración temporal suficiente para administrar aproximadamente 1-2 J/cm² a la población celular.

15 El aparato de fotoféresis extracorpórea útil en la invención incluye aquellos elaborados por Therakos, Inc., (Exton, PA) con el nombre UVAR®. Una descripción de un aparato tal se encuentra en la Patente de los Estados Unidos N.º: 4,683,889. El Sistema de UVAR® usa un sistema y consiste en un tratamiento de tres fases incluyendo: 1) la recogida de una fracción de capa leuco-plaquetaria (enriquecida en leucocitos), 2) irradiación de la fracción de capa leuco-plaquetaria recogida y 3) reinfusión de los glóbulos blancos tratados. La fase de recogida tiene seis ciclos de etapas de retirada, centrifugación y etapas de reinfusión de sangre. Durante cada ciclo, la sangre entera se centrifugó y se separó en un cuenco de aféresis. A partir de esta separación, el plasma (su volumen en cada ciclo se determina por el operador de Instrumento de UVAR®) y 40 ml de capa leuco-plaquetaria se guardaron en cada ciclo de recolección. Las células rojas y todo el plasma adicional se reinfundió al paciente antes de empezar el siguiente ciclo de recolección. Finalmente, un total de 240 ml de revestimiento leuco-plaquetario y 300 ml de plasma se separan y se guardan para irradiación con UVA.

25 La irradiación de la sangre enriquecida en leucocitos dentro del circuito comienza durante la recogida de la capa leuco-plaquetaria del primer ciclo de recogida. El plasma recogido y la capa leuco-plaquetaria recogida se mezclan con 200 ml de solución salina normal heparinizada de UVADEX® (8-metoxipsoralina soluble en agua). Esta mezcla fluye en una capa gruesa de 1,4 mm a través de la Cámara de Fotoactivación PHOTOCEPTOR®, que se inserta entre dos lados de lámparas de UVA de PHOTSETTE®. Las lámparas de UVA de PHOTSETTE® irradian ambos lados de esta cámara transparente UVA-PHOTOCEPTOR®, permitiendo una exposición de 180 minutos a una luz ultravioleta A leve, produciendo una exposición promedio por linfocito de 1-2 J/cm². La concentración final de revestimiento de capa leuco-plaquetaria contiene un 20% a 25% estimado del componente celular mononuclear de la sangre y tiene un hematocrito del 2,5% al 7%. Siguiendo el periodo de fotoactivación, el volumen se reinfunde al paciente durante un periodo de 10 a 45 minutos. La Solicitud de Patente de los EE.UU. 09/480,893 describe otro sistema para usar en administración de ECP. Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 5,951,509; 5,985,914; 5,984,887, 35 4,464,166; 4,428,744; 4,398,906; 4,321,919; Publicación PCT N.ºs: WO 97/36634; y el documento WO 97/36581 contiene también descripción de dispositivos y procedimientos útiles a este respecto.

Otro sistema que puede ser útil en usar la presente invención se describe en el documento WO01/80924. Ese sistema incluye un aparato por el que el volumen fluido neto recogido o eliminado de un sujeto se puede reducir durante ECP. La cantidad eficaz de energía lumínica que se administra a una población celular se puede determinar usando los procedimientos y sistemas descritos en la Patente de los Estados Unidos N.º: 6,219,584.

45 Una diversidad de otros procedimientos para inducir apoptosis en una población celular se conocen bien y se pueden adoptar para usarse en la presente invención. Tal tratamiento comprende someter una población celular a radiación ionizante (rayos gamma, rayos x, etc.) y/o radiación electromagnética no ionizante incluyendo luz ultravioleta, calentamiento, enfriamiento, a privación de suero, a privación de factor de crecimiento, a acidificación, a dilución, a alcalinización, a cambio de la fuerza iónica, a privación de suero, a irradiación, o a una combinación de los mismos. Alternativamente, la apoptosis se puede inducir sometiendo a una población celular a ultrasonidos.

Aún otro procedimiento de inducir apoptosis comprende la aplicación extracorpórea de estrés oxidativo a una población celular. Esto puede lograrse tratando la población celular, en suspensión, con agentes oxidantes químicos tales como peróxido de hidrógeno, otros peróxidos e hidroperóxidos, ozono, permanganatos, peryodatos, y similares. Se pueden usar agentes oxidantes biológicamente aceptables para reducir problemas potenciales asociados con residuos y contaminaciones de la población celular inducida por apoptosis así formada.

55 En la preparación de la población celular inducida por apoptosis, debería tenerse cuidado para no aplicar niveles excesivos de estrés oxidativo, radiación, tratamiento de fármacos, etc., debido a que de otro modo puede haber un riesgo significativo de causar necrosis de al menos algunas de las células en tratamiento. La necrosis causa rotura de la membrana celular y la liberación de contenidos celulares a menudo con resultados biológicamente dañinos, en particular eventos inflamatorios, de modo que mejor se evita la presencia de células necróticas y sus componentes junto con la población celular que comprende células apoptóticas. Los niveles de tratamiento apropiados de la población celular para inducir apoptosis y del tipo de tratamiento elegido para inducir apoptosis son fácilmente determinables por aquellos expertos en la técnica.

60 Un procedimiento de acuerdo con la presente invención implica el cultivo de células del sujeto, o una línea celular de mamíferos compatible. Las células cultivadas pueden tratarse después extracorpóreamente para inducir apoptosis y para crear una población celular en ellas. El tratamiento extracorpóreo puede seleccionarse a partir del grupo constituido por anticuerpos, agentes quimioterapéuticos, de la radiación, fotoféresis extracorpórea, ultrasonidos, proteínas y agentes oxidantes. Las células, suspendidas en el plasma del sujeto u otro medio de suspensión adecuado, tal como solución salina o un cultivo celular de células de mamífero o un medio de cultivo celular, 65 después se pueden administrar como se indica anteriormente.

Procedimientos para la detección y cuantificación de apoptosis son útiles para determinar la presencia y el nivel de

apoptosis en la preparación para administrarse al sujeto. El número de células apoptóticas en una población celular requerido para obtener el beneficio clínico en un sujeto puede variar dependiendo de la fuente de las células, la afección del sujeto, la edad y el peso del sujeto y otros factores relevantes, que son fácilmente determinables mediante procedimientos conocidos. Preferentemente, el número de células apoptóticas que se administran a un paciente son 0,1 a 50 millardos, más preferentemente 1 a 10, y lo más preferentemente 2,5 a 7,5 millardos.

En una realización, las células que se someten a apoptosis se pueden identificar por un "escalonamiento" de ADN visto en electroforesis en gel de agarosa, que resulta de la escisión de ADN en una serie de fragmentos. En otra realización, la expresión superficial de fosfatidilserina en las células se puede usar para identificar y/o cuantificar una población celular en la que se ha inducido apoptosis. La medida de cambios en membrana mitocondrial potencial, reflejando cambios en permeabilidad de membrana mitocondrial, es otro procedimiento reconocido de identificación de una población celular. Un número de otros procedimientos de identificación de células que sufren apoptosis y de una población celular, muchos usando anticuerpos monoclonales frente a marcadores específicos para una población celular, se han descrito también en la bibliografía científica.

La administración de células apoptóticas de la presente invención y de antagonista de TNF- α encuentra utilidad en tratar artritis y otras enfermedades autoinmunes. Son también útiles en el tratamiento o profilaxis de al menos una enfermedad relacionada con autoinmunidad en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente incluyendo, pero sin limitarse a, leucemias agudas y crónicas y patologías autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, tiroidosis, enfermedad de injerto frente a hospedador, escleroderma, diabetes mellitus, enfermedad de Graves y similares; y enfermedades atópicas, incluyendo patologías inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, colitis ulcerosa y patología de Crohn.

A modo de ejemplo, el trasplante de órganos sólidos se trata más beneficiosamente por esta invención que por administración de un antagonista de TNF- α solo. El rechazo de trasplante de órganos sólidos agudo tiene lugar en el 30% al 60% de los pacientes después de trasplante de pulmón y en un menor grado con hígado, riñón, corazón etc. debido al éxito de agentes inmunosupresores. La reacción inmunitaria mediada por linfocitos (células) frente a antígenos de trasplante es el mecanismo principal de rechazo agudo. Un rechazo retardado o crónico causa destrucción del injerto en meses a años después del trasplante y se caracteriza por destrucción vascular que conduce a necrosis del tejido transplantado. Este rechazo no se suprime actualmente en cualquier alto grado por regímenes estándar y así la necesidad de más tolerancia inmune sostenible es una necesidad insatisfecha significativa.

El deterioro de injerto tardío tiene lugar ocasionalmente y este rechazo de tipo crónico a menudo progresa insidiosamente a pesar de la terapia inmunosupresora incrementada. El panorama patológico difiere de aquel de rechazo agudo. El endotelio arterial está implicado principalmente, con proliferación extensa que puede obstruir gradualmente la luz de los vasos, dando como resultado isquemia y fibrosis del injerto.

Los inmunosupresores son actualmente usados ampliamente para controlar la reacción del trasplante y son principalmente responsables del éxito del trasplante. Sin embargo, estos fármacos suprimen todas las reacciones inmunológicas, haciendo así a la infección incontenible la causa líder de muerte en receptores de trasplantes.

El tratamiento inmunosupresor existente puede diferir en el caso de diferentes tipos de trasplantes. Los alotransplantes de hígado se rechazan menos agresivamente que otros alotransplantes de órganos. Por ejemplo, el rechazo hiperagudo de un trasplante de hígado no se produce invariablemente en pacientes quienes están presensibilizados a antígenos HLA o incompatibilidades ABO. La terapia inmunosupresora típica en un adulto implica usar ciclosporina, dada usualmente IV a 4 a 6 mg/kg/día empezando en el momento de trasplante y después a 8 a 14 mg/kg/día p.o. cuando se tolera el suministro. Las dosis se ajustaron a la baja si la disfunción renal aparece y los niveles en sangre se usan como medidas aproximadas de dosificación adecuada.

En trasplante de corazón, las pautas inmunosupresoras son similares a aquellas para trasplante de riñón o de hígado. Sin embargo, en trasplantes de pulmón y de corazón-pulmón tiene lugar rechazo agudo de trasplantes en > 80% de los pacientes pero pueden ser controlados exitosamente. Los pacientes se tratan con corticosteroides, dados rápidamente IV en dosificación elevada, ATG, u OKT3. ALG u OKT3 profiláctico también se da frecuentemente durante las dos primeras semanas post-trasplante. El trasplante de páncreas es único entre los trasplantes de órganos vascularizados: En vez de usarse para salvar una vida, ello intenta para estabilizar o evitar las complicaciones de órganos objetivos devastadoras de la diabetes de tipo I. Debido a que el receptor intercambia los riesgos de inyección de insulina con los riesgos de inmunosupresión, el trasplante de páncreas se ha limitado generalmente principalmente a pacientes quienes ya necesitan recibir fármacos inmunosupresores (es decir, diabéticos con fallo renal que reciben un trasplante de riñón).

Pacientes con leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástica pueden beneficiarse del trasplante de médula ósea (BMT). El BMT pediátrico se ha expandido debido a su potencial para curar niños con enfermedades genéticas (por ejemplo, talasemia, anemia falciforme, inmunodeficiencias, errores innatos del metabolismo). Otra opción para BMT es el trasplante autólogo (eliminación de una médula ósea propia del paciente cuando se ha inducido una remisión completa, seguida por tratamiento ablativo del paciente con la esperanza de la destrucción de cualquier tumor residual y de rescate con la propia médula ósea del paciente). Dado que se usa un autoinjerto, no es necesaria inmunosupresión distinta de la quimioterapia de dosis alta a corto plazo usada para la erradicación del tumor y para la ablación de la médula ósea; los problemas post-trasplante con GVHD son mínimos.

La tasa de rechazo es < 5% en trasplantes para pacientes de leucemia a partir de donantes idénticos de HLA. Para pacientes transfundidos de forma múltiple con anemia aplásica, la tasa de rechazo también se ha disminuido significativamente debido a inmunosupresión incrementada durante inducción de trasplante. No obstante, pueden aparecer complicaciones incluyendo rechazo por el huésped del injerto de médula, GVHD aguda e infecciones. Las complicaciones más tardías incluyen GVHD crónica, inmunodeficiencia prolongada y recurrencia de la enfermedad.

La Enfermedad de Injerto frente a Huésped (GVHD) se trata más beneficiosamente por esta invención que bien por administración de antagonista de TNF- α o bien por ECP sola. La enfermedad crónica de injerto frente a huésped (cGVHD) tiene lugar en el 30% al 60% de los pacientes después del trasplante de médula ósea (BMT). Tanto terapia de ECP como terapia anti-TNF- α han mostrado efectos positivos en esta enfermedad pero ninguno son completos y anti-TNF- α se ha asociado con eventos adversos graves.

Se pueden hacer otros trasplantes numerosos más efectivos con el tratamiento de combinación de la invención actual. Los ejemplos incluyen, trasplante de córnea, aloinjertos de piel, aloinjertos de cartílago, injertos óseos y trasplantes de intestino delgado.

Un huésped de otros trastornos se puede tratar de forma más efectiva usando la invención actual. Por ejemplo, el linfoma de linfocitos T cutáneo es una enfermedad en la que los linfocitos T han llegado a ser malignos y afectan a la piel. Tres clases de tratamiento se usan comúnmente: radiación; quimioterapia; y fotoféresis. El tratamiento de linfoma de linfocitos T cutáneo depende de la fase de la enfermedad y de la edad y salud general del paciente. El tratamiento estándar puede considerarse debido a su eficacia, en pacientes en estudios pasados, o en participación en un ensayo clínico. La mayoría de los pacientes con linfoma de linfocitos T cutáneo no se cura con terapia estándar y algunos tratamientos estándar pueden tener más efectos secundarios de lo que se desea. El tratamiento usando la invención actual se pueden usar en el tratamiento de esta enfermedad también.

La presente invención se puede usar también en cirugía de implantes, por ejemplo, con cirugía de implantes llevada a cabo comúnmente en cirugía plástica cosmética y no cosmética. Tales implantes pueden incluir injerto dental, injerto de grasas, por ejemplo a las mejillas, labios y nalgas, implantes faciales, incluyendo aquellos para la nariz, mejillas, frente, barbilla y cráneo, implantes de nalgas, implantes mamarios, etc. Otros implantes incluyen, pero no se limitan a, implantes de anillo corneal, corticales, orbitales, cocleares, de músculos (todos los músculos, incluyendo pectoral, gluteal, abdominal, gastrocnemios, sóleo, bíceps, tríceps), articulación aloplástica y reemplazo óseo, de reparación ósea (tornillos, varillas, vigas, barras, resortes), placas metálicas, implantes espinales, -vertebrales, de pelo, de inyecciones de bótox/colágeno/restilano/perlano, de pene, implantes de semilla de próstata, implantes de mama (cosméticos y reconstructivos), dispositivos intrauterinos, implantes hormonales, implantación de células fetales y de células madre, marcapasos, desfibrilador, arterias/venas/válvulas artificiales y órganos artificiales.

Las enfermedades autoinmunes también pueden tratarse más eficazmente usando la invención actual. Éstas son -enfermedades en las que el sistema inmune produce autoanticuerpos para un antígeno endógeno, con el consiguiente daño a tejidos. Los individuos pueden identificarse como que tienen una enfermedad por varios procedimientos, incluyendo, pero no limitados a, tipificación de enlace de HLA, ensayos basados en sangre o en suero, o identificación de las variantes genéticas, por ejemplo, polimorfismos de nucleótido único (SNP). Por ejemplo, una vez se determina que un individuo tiene el enlace DR4 de HLA y se ha diagnosticado que tiene artritis reumatoide, puede prescribirse ECP y un tratamiento de combinación de un antagonista de TNF- α . El antagonista de TNF- α es infliximab. Otros alelos de HLA, también conocidos como alelos MHC, que están asociados con enfermedades autoinmunes incluyen B27 (Espondilitis anquilosante); y 0501 DQA1 * DQB1 *0201 (enfermedad Celíaca); DRB1 *03, DRB1 *04, DQB1 *0201, DQB1 *0302, y DMA *0101 (Diabetes de Tipo I); y Cw6 (Psoriasis). Estos alelos se pueden usar también para determinar si un individuo está experimentando una enfermedad autoinmune y, así, si puede ser tratamiento de combinación antagonista ECP y TNF- α .

Ensayos basados en sangre o en suero se pueden usar para evaluar predisposición a una enfermedad. Hay, por ejemplo, un ensayo que detecta la presencia de anticuerpos autonucleares en suero, que pueden conducir a la aparición de lupus. También existen ensayos basados en suero para predecir miocarditis autoinmunes. Además, los ensayos basados en suero se pueden usar para determinar los niveles de insulina (diabetes) o de enzimas del hígado o cardíacas para otras enfermedades. Los niveles de T-3 puede ser predictivos de tiroiditis de Hashimoto. Después de que se determinó que un individuo tiene una enfermedad usando un ensayo basado en sangre o en suero, la presente invención se puede usar para evitar, o para prevenir la aparición de, o para reducir los efectos de estas enfermedades. Los individuos pueden identificarse como que están predispuestos a enfermedad a través de la identificación de variaciones genéticas, incluyendo, pero no limitadas a, SNP. Así, en un uso adicional de la invención, se hace primero una determinación de que un paciente tiene una enfermedad autoinmune o está predispuesto a una y a ese paciente se le receta una combinación de ECP (u otra administración de células apoptóticas) y un antagonista de TNF- α .

Se pueden usar pruebas diagnósticas estándar para determinar si un paciente tiene un trastorno del tipo anteriormente descrito.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes describen adicionalmente la invención.

En los ejemplos 1-5, se obtuvieron células dendríticas derivadas de monocitos como sigue: Se aislaron PBMC a partir de la sangre periférica de donantes sanos por fraccionamiento sobre centrifugación de gradiente de Ficoll-Hypaque. Se seleccionaron positivamente monocitos usando el kit de aislamiento MACS CD14 y el sistema Automacs (Miltenyi Biotec, Alemania). Los monocitos CD14+ se cultivaron en RPMI completo suplementado con 40 ng/ml de IL-4 y GM-CSF (R&D Systems) durante 5 días. La secreción de citocinas se indujo por estimulación de células dendríticas con lipopolisacáridos ("LPS", Sigma). Se usaron procedimientos ELISA estándar midiendo niveles de TNF- α e IL-12 (R&D Systems) en los sobrenadantes de cultivo.

Ejemplo 1 (Estudio In Vitro de Inhibición de Producción de TNF- α)

Se cultivaron conjuntamente linfoblastos aislados recientemente de células CD14⁺ y células dendríticas derivadas de monocitos (5×10^5 células/pocillo) en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con células CD15+ tratadas con ECP

($2,5 \times 10^6$ células/pocillo). Después de 2 horas, se añadió LPS a 0,5 mg/ml a estos cultivos. Después de 24 horas de estimulación, los sobrenadantes se recogieron de estos cultivos para medidas de citocinas. Se encontró que las células tratadas con ECP inhiben la producción de TNF- α a partir de células presentadoras de antígenos activadas por LPS.

5 **Ejemplo 2 (Estudio In Vitro de Inhibición de Producción de TNF- α)**

Se cultivaron células dendríticas derivadas de monocitos (1×10^5 células/pocillo) en presencia de cantidades crecientes de LPS solas o con células CD15+ tratadas con EPC (5×10^5 células/pocillo), con 200 ng/ml de mAb infliximab solo, o con la combinación del mAb y las células CD15+ tratadas con EPC. Se recogieron sobrenadantes de cultivo a partir de estos cultivos a 48 horas para la medición de producción de TNF- α . Las células tratadas con mAb de infliximab solo se encontró que tenían aproximadamente 100 pg/ml de TNF- α . Aquellas tratadas con ECP sólo se encontró que tenían aproximadamente 1.000 pg/ml. Mientras que cada uno de estos tratamientos representa una reducción a partir del valor de la línea base sobre 1000 pg/ml, los niveles descendieron a un promedio de menos de 50 pg/ml cuando la invención se usó.

15 **Ejemplo 3 (Estudio In Vitro de Inhibición de Producción de TNF- α)**

Se cultivaron células dendríticas derivadas de monocitos (1×10^5 células/pocillo) en presencia de 0,1 mg/ml de LPS solo o con células CD15+ recién preparadas tratadas con ECP (5×10^5 células/pocillo), con 200 ng/ml de mAb infliximab solo, o con la combinación del mAb y las células CD15+ tratadas con ECP. Se recogieron sobrenadantes de cultivo a partir de estos cultivos a 48 horas para cuantificación de producción de TNF- α . Las células tratadas con mAb de infliximab solo se encontró que tenían aproximadamente 500 pg/ml de TNF- α . Aquellas tratadas con ECP sólo se encontró que tenían aproximadamente 1700 pg/ml. Mientras que cada uno de estos tratamientos representa una reducción del valor de la línea base sobre 2300 pg/ml, los niveles cayeron a aproximadamente 100 pg/ml cuando la invención se usó.

20 **Ejemplo 4 (Estudio In Vitro de Inhibición de Producción de TNF- α)**

Se cultivaron células dendríticas derivadas de monocitos (1×10^5 células/pocillo) en presencia de cantidades crecientes de LPS solo o con CD15+ tratadas con ECP+ (5×10^5 células/pocillo), con 200 ng/ml de mAb de infliximab solo, o con la combinación de células CD15+ tratadas con ECP. Se recogieron sobrenadantes de cultivo a partir de estos cultivos a 48 horas para la medición de producción de TNF- α . Otro grupo de células dendríticas se trataron de forma similar y los sobrenadantes de cultivos se recogieron a partir de estos cultivos a 48 horas para cuantificación de producción de TNF- α . Las células tratadas con aproximadamente 2 ng/ml de mAb de infliximab se encontró que tenían casi 1000 pg/ml de TNF- α . Cuando esta misma dosis de mAb infliximab se administró y se llevó a cabo ECP el nivel bajó a aproximadamente 1500 pg/ml. Cuando 8 ng/ml de mAb infliximab se administraron solos, el nivel fue mayor de 1300 pg/ml; la adición de tratamiento de ECP bajo éste a aproximadamente 100 pg/ml. Dosis de mAb infliximab de 40 ng/ml y mayor con o sin la combinación de ECP redujo el nivel a menos de 100 pg/ml. El efecto de terapia combinada fue más pronunciada a niveles bajos de administración de mAb de infliximab (por ejemplo, 2 ng/ml). Tales dosis no se consideran normalmente terapéuticas y demuestran eficacia a niveles a los que no se esperan normalmente efectos adversos.

25 **Ejemplo 5 (Estudio In Vitro de Inhibición de Otras Citocinas Proinflamatorias)**

Se cultivaron células dendríticas derivadas de monocitos (1×10^5 células/pocillo) en presencia de cantidades crecientes de mAb infliximab bien solo o bien tratado con células CD15+ frescas tratadas con ECP (5×10^5 células/pocillo). Las células se estimulan después con 0,8 ng/ml de LPS. Se recogieron sobrenadantes de cultivo a partir de estos cultivos a 48 horas para medida de producción de IL-12. Los niveles de IL-12 se redujeron a partir de un valor de línea base de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 125 pg/ml por el uso de ECP. Una combinación de ECP y 2 ng/ml de mAb infliximab dio como resultado una reducción de los niveles de IL-12 a aproximadamente 10 pg/ml. Cuando se emplearon 200 ng/ml de mAb de infliximab en combinación con ECP la ruta del nivel de IL-12 era casi indetectable. Así, la combinación de células tratadas con ECP y mAb infliximab disminuyó significativamente producción de IL-12 por células dendríticas.

30 **Ejemplo 6 (Aplicación de Modelo de Ratón In Vivo) [Prevista]**

Ratones

Ratones C3H/HeJ (C3H; H2k), (B6xC3H) F1 (H2b \times k), (B6xDBA/2) F1 (H2b \times d), C57BL/6 (B6; H2b), y CBA/JCr (CBA; H2k) machos se adquirirán del National Cancer Institute Research and Development Center (Frederick, MD). Los ratones B1 O.BR (H2k) se adquirirán de los Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME). Los ratones usados para experimentos serán de entre 6-10 semanas de edad, y se albergarán en jaulas microaislantes estériles dentro de un medio libre de patógenos específico, recibiendo comida y agua autoclavadas a demanda.

Medios

Se usará solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con seroalbúmina bovina al 0,1% (BSA; Sigma Chemical Co., San Luis, MO) para todas las manipulaciones in vitro de la médula ósea del donante y de los linfocitos del donante. Inmediatamente antes de la inyección, las células se pueden lavar y resuspender en PBS solo. Se usará medio RPM11640 (Mediatech, Herndon, VA), complementado con suero fetal bovino al 10% (FBS; GIBCO, Grand Island, NY), 2 mmol/l de L-glutamina, 50 UI/ml de penicilina, y 50 μ g/m de estreptomina, para el mantenimiento de líneas celulares y para ensayos in vitro.

Anticuerpos

El mAb cV1 q (aka. CNTO 2213), una construcción de IgG2 quimérica de rata/Fc de ratón con unidades (Fab)₂ de

5 rata específicas para TNF- α y su isotipo control M-T412, un mAb anti-CD4 humano se proporcionará por Centocor, Malvern, PA. El fluido de ascitis que contiene mAb se generará a partir de líneas celulares de hibridoma bien para proteínas Thy-1,2 (J1j; A-TCTIB-184), bien para proteínas CD4 (RL172), o bien para proteínas CD8 (3.168) y se usará para preparación de injertos celulares. La IgG antirratón de cabra purificada por afinidad (Cappel, Cosa Mesa, CA) se usará para depleción de células B. Se podrá adquirir complemento de cobaya de Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Anti-CD3, anti-CD4, CD8, anti-B220, y mAb de control de isotipo, todos acoplados a ficoeritrina (PE), se adquirirán todos de BD Biosciences (Palo Alto, CA).

Fotoféresis Experimental

10 Se cosecharán esplenocitos a partir de ratones sanos de la misma camada singénicos y se transformarán en suspensión celular individual moliendo con el extremo trasero de una jeringuilla en PBS. Estas células se resuspenderán y las células se lavarán dos veces con PBS antes de resuspenderse a $12,5 \times 10^6$ células/ml de PBS. Después de lavarse las células se resuspenderán en medio enfriado en hielo y se sembrarán a aproximadamente 10^6 células/ml en un matraz T75. Se añadirá psoraleno (solución de UVADEX) a una concentración final de 200 ng/ml, que es una dilución de 100 veces a partir de la solución de reserva proporcionada por Therakos. El matraz se situará recostado en la cámara de irradiación UVA y se le darán aproximadamente $1,5 \text{ J/cm}^2$ de luz que corresponden a 1,5 minutos de luz de fondo cuando la bandeja está a 6 cm de la fuente de luz. Las células se retirarán rápidamente del matraz evitando adherencia y se situarán a la concentración apropiada para inyección. Si hay adherencia, el matraz se raspará o golpeará con los dedos suavemente retirando la mayoría de las células.

Transplante de la Médula Ósea

20 Se recogerá la médula ósea de las tibias y los fémures de los ratones donantes lavando con PBS que contenga BSA al 0,01% (PBS/BSA). Las células de médula ósea se reducirán de linfocitos T usando un mAb anti-Thy (J1 j; American Type Culture Collection, Rockville, MD) a una dilución 1:100 y complemento de cobaya (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) a una dilución de 1:6 durante 45 minutos a 37°C. Los linfocitos se aislarán a partir de bazo y nódulos linfáticos de ratones donantes. Los esplenocitos se tratarán con solución de lisado de sal equilibrada de Gey que contenía cloruro amónico al 0,7% (NH_4Cl) eliminando las células rojas de la sangre (RBC). Después de depleción de las RBC, el bazo y las células de los nódulos linfáticos se almacenarán y deplecionarán de células B por inmunofijación en una placa de Petri de plástico, prerrecubierta con una dilución de 5 mg/ml de dilución de IgG de cabra antirratón durante 1 hora a 4°C. Estos tratamientos se espera que den como resultado poblaciones donantes de aproximadamente el 90%-95% de células CD3+, tal como se cuantifican por citometría de flujo fluorescente. Los subgrupos de linfocitos T se aislarán después por medio de selección negativa usando bien mAb anti-CD8 (3.168) o bien mAb anti-CD4 (RL172) y complemento. Estos tratamientos se espera que reduzcan las poblaciones de subgrupos de linfocitos T objetivo a niveles precedentes, según se determina por análisis citométrico de flujo. Los ratones receptores se expondrán a irradiación de cuerpo entero de 13 Gy a partir de una fuente de CS^{137} a 1,43 Gy/min, administrada en una dosis dividida de 6,5 Gy cada una, separada durante 3 horas. Estos ratones se transplantarán después con 2×10^6 células de la médula ósea tratadas con anti-Thy 1.2 (ATBM; deplecionado en linfocitos T) junto con el número indicado de linfocitos T apropiado (linfocitos T enriquecidas en CD4 o CD8 del donante), intravenosamente (i.v.) por la vena del rabo. Los ratones se tratarán con cV1q anti-TNF- α o con mAb M-T412 de control de isotipo (1 mg; i.p.) 1 día antes del transplante y de nuevo en los días 0, 4, 8 y 12 (todos a 0,5 mg; i.p.). For GVL experiments, B6 recipient mice will be challenged with an injection of MMB3.19 cells (1×10^5 in 0.5 mL PBS; i.p.) one day before transplantation of donor ATBM and T cells, with a similar schedule of anti-TNF α mAb treatment. En ambos experimentos de GVHD y GVL, los ratones se examinarán diariamente durante morbilidad y mortalidad hasta finalización. Los datos se almacenarán a partir de 2-3 experimentos separados y se determinarán tiempos de supervivencia de mediana (MST) como el punto de supervivencia al 50% de una regresión lineal a través de todos los días de los puntos de datos de muerte, incluyendo cero. Las comparaciones estadísticas para supervivencia entre grupos experimentales se llevarán a cabo mediante la prueba de los signos de Wilcoxon no paramétrica. La significancia para comparaciones de peso se determinará por la prueba T en los puntos temporales individuales.

Citometría de flujo

50 Los mAbs apropiados en volúmenes de 25 μl se incubaron con $2-5 \times 10^5$ células en los pocillos de 96 pocillos de fondo en U de microplaca a 4°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos, y se lavaron con PBS conteniendo BSA al 0,1% y azida de sodio al 0,01% (tampón de lavado). El porcentaje de células positivas y la media aritmética de intensidad de fluorescencia se calculará para cada muestra.

Análisis Patológico

55 Se tomarán las biopsias de las orejas de grosor total (3 x 2 mm) de cada ratón de cada uno de los diversos grupos de tratamiento y se fijarán inmediatamente en glutaraldehído al 4% durante toda una noche con tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4). Los tejidos se fijarán después con tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas, se deshidrataron en etanol graduado y se embebieron en Epon 812. Se cortarán unas secciones de espesor micrométrico con un ultramicrotomo MT2B Porter-Blum, se teñirán con toluidina azul y finalmente se sumergirán en etanol al 95% para análisis microscópicos ligeros. El número de células epidérmicas disqueratóticas/mm lineal, como se ha determinado previamente, se contarán bajo un objetivo x100 y un ocular x10 de un microscopio óptico. Más de diez mm lineales de la epidermis se valorarán en cada animal y en cada punto temporal. El análisis se puede realizar bajo condiciones ciegas con respecto a los grupos de tratamiento.

Efecto de mAb anti-TNF- α en GVHD mediada por linfocitos T CD8

65 Para determinar si el tratamiento de anti-TNF- α mAb podría afectar al desarrollo de GVHD mediado por linfocitos T CD8+, se utilizará, según una etiología bien establecida el modelo GVHD BIO.BRaCBA ajustado por MHC disparado por miHA. Los ratones CBA se irradiarán de forma letal (13 Gy, dosis dividida) y se transplantarán con células

B10.BR ATBM (2×10^6), solos, o además de una población altamente enriquecida (95%) de linfocitos T CD8+ (3×10^6). Los ratones bien se dejarán sin tratar, bien se tratarán con el control ajustado con el isotipo mAb MT412, o bien el mAb anti-TNF α (cV1q) en el día-1 (1 mg, i.p.) y en los días 0, 4, 8 y 12 del trasplante (0,5 mg; i.p.). Mientras que todos los receptores de células ATBM solos sobrevivirán durante al menos 70 días, los ratones transplantados con linfocitos T de donantes, y dejados sin tratar o tratados con mAb MT412 control, sucumbirán a GVHD con valores de MST similares de aproximadamente 20 días. En contraste, los receptores CBA de linfocitos T de donante, pero administrados con cV1 q mAb, presentarán aproximadamente supervivencia del 40% con una MST de aproximadamente 50 días que será significativamente diferente que el grupo control de MT412. Además, los ratones supervivientes tratados con mAb anti-TNF- α no presentan síntomas evidentes de GVHD (por ejemplo, piel erizada, lesiones de piel, postura encorvada, o diarrea), y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que varía 5-12% por debajo de la del grupo control ATBM transplantado. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de cV1 q lo hacen así con cinéticas más lentas que los grupos no tratados otrotados con MT412. Cuando se administra cV1q a 0,1 mg i.p. no habrá decrecimiento significativo en aparición de GVHD.

Se administrará ECP experimental por inyección i.v. de 10^7 esplenocitos singénicos de un ratón control de la misma camada en el mismo día que la BMT y 3 días más tarde. Los receptores CBA de linfocitos T del donante, menos células tratadas con ECP administradas, presentarán aproximadamente el 20% de supervivencia con una MST de aproximadamente 30 días que será significativamente diferente del grupo control. Además, ratones tratados con ECP supervivientes presentarán evidencia disminuida de síntomas de GVHD (por ejemplo, pelaje alborotado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea) y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará del 5-20% por debajo de aquel del grupo transplantado control de ATBM. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de células tratadas con ECP lo harán entonces con cinéticas más lentas que los grupos no tratados.

La combinación de tratamiento de ECP con dosis subeficaces de tratamiento anti-TNF será superior a cada tratamiento solo. Los receptores CBA de linfocitos T donantes, pero administrados con mAb cV1q a 0,1 mg junto con ECP, presentarán aproximadamente el 60% de supervivencia con un MST de aproximadamente 70 días que serán significativamente diferentes de los grupos control. Además, ratones tratados de forma dual supervivientes no presentarán síntomas evidentes de GVHD (por ejemplo, pelaje desordenado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea), y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará 5-12% por debajo de aquel del grupo transplantado ATBM control. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de terapia dual lo harán con cinéticas más lentas que los grupos no tratados y más lentas que los grupos de ECP o de anti-TNF solos.

Efecto de mAb anti-TNF- α en GVHD a través de una barrera de MHC

Para determinar si la neutralización de TNF- α por tratamiento de cV1 q podría afectar el curso de GVHD a través de una barrera de MHC completa, se utilizará el modelo de ratón de C3H(B6xC3H)F1 haploide. Los linfocitos T C3H (tanto CD4+ como CD8+; 5×10^6) y las células ATBM (2×10^6) se transplantarán i.v. en ratones F1 irradiados letalmente (13 Gy, dosis dividida) (B6xC3H), lo que induce una respuesta de GVHD aguda rápida caracterizada por pérdida de peso grave y por mortalidad temprana (MST de aproximadamente 5 días). Se obtendrán resultados similares en los receptores tratados con mAb MT412 control, pero aquellos ratones tratados con cV1 q (1 mg i.p. en el día 1 y 0,5 mg en los días 0, 4, 8, y 12) presentarán aproximadamente supervivencia a largo plazo del 40% con un MST de aproximadamente 40 días que serán significativamente diferentes comparados bien con grupos no tratados o bien con los grupos control de MT412. El tratamiento con 0,1 mg de cV1q tendrá un efecto no significativo pero notable sobre la aparición de GVHD.

El ECP experimental se administrará por inyección i.v. de 10^7 esplenocitos singénicos de un ratón control de la misma camada en el mismo día que la BMT y 3 días más tarde. Los receptores CBA de linfocitos T donantes, salvo células tratadas con ECP, presentarán aproximadamente supervivencia del 20% con un MST de aproximadamente 10 días que serán diferentes pero no significativamente diferentes que el grupo control. Además, los ratones supervivientes tratados con ECP presentarán evidencia disminuida de síntomas de GVHD (por ejemplo, pelaje desordenado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea) y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará 5-20% por debajo de aquella del grupo transplantado de ATBM control. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de células tratadas con ECP lo harán con cinéticas más lentas que los grupos no tratados.

La combinación de tratamiento de ECP con dosis sub-eficaces de tratamiento anti-TNF- α será superior a cada tratamiento solo. Los receptores CBA de los linfocitos T donantes, menos los administrados con cV1q mAb a 0,1 mg junto con ECP, presentarán aproximadamente supervivencia del 60% con un MST de aproximadamente 70 días que será significativamente diferente de los grupos control. Además, los ratones tratados de forma dual supervivientes no presentarán síntomas evidentes de GVHD por ejemplo, pelaje desordenado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea) y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará 5-20% por debajo de aquella del grupo transplantado de ATBM control. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de terapia dual lo harán con cinéticas más lentas que los grupos no tratados y más lentas que los grupos de ECP o los grupos anti-TNF solos.

En términos de pérdida de peso, después de una caída ligera inicial en los primeros pocos días debido al condicionamiento por irradiación, los ratones ATBM control ganarán peso de forma estable durante todo el resto del experimento. Por otro lado, los grupos no tratados y los grupos tratados con MT412 transplantados con linfocitos T donantes nunca se recuperan de la caída inicial y probablemente en cambio continúen rápidamente con la pérdida de peso hasta su muerte, de forma consistente con GVHD grave. Sin embargo, los ratones tratados con mAb anti-TNF α cV1q mAb se recuperarán algo en el día 9 y los animales supervivientes después del día 37 continuarán ganando peso durante el curso que queda del experimento, encontrando aproximadamente el 6-12% por debajo del grupo ATBM. Los animales tratados con 0,1 mg de cV1q perderán peso a sólo una cinética ligeramente mejor, aunque diferente de forma insignificante, que los animales control. Los animales tratados con ECP tendrán una ganancia en peso significativamente incrementada y la combinación de anti-TNF α y ECP será virtualmente idéntica a

los animales control no dando un BMT o el 1 mg de grupos anti-TNF.

Efecto de mAb anti-TNF- α en GVHD mediada por linfocitos T CD4+

5 Dado que las respuestas de linfocitos T CD4+ tienden a dominar el desarrollo de GVHD en el modelo C3Ha (B6xC3H)F1 y a la luz de la observación inicial de un efecto moderado de tratamiento de mAb anti-TNF- α cuando se
 10 transplantó el inóculo de linfocitos T, los autores de la presente invención centrarán su atención en el componente de GVHD mediado por CD4. La inyección de 3×10^9 linfocitos T CD4+ C3H conjuntamente con 2×10^6 células de ATBM en ratones (B6xC3H)F1 (13 Gy, dosis dividida) irradiados dará resultado en la mayoría de los ratones no
 15 tratados (aproximadamente el 75%; MST de 10-30 días) y los ratones control MT412 tratados (aproximadamente el 80%; MST de 10-30 días) sucumbirán a GVHD aguda grave. En contraste, el 100% de los ratones tratados con el mAb de TNF- α cV1q (1 mg i.p. en el día 5-1 y 0,5 mg en los días 0, 4, 8 y 12) sobrevivirán más allá de 60 días. Estos ratones no presentan cualesquiera síntomas visibles de GVHD y se recuperarán rápidamente de su pérdida de peso corporal tras irradiación y continúan ganando peso hasta el final del experimento en paralelo al grupo control de ATBM. El efecto altamente significativo de tratamiento de cV1 q en supervivencia en la GVHD mediada por CD4 sugerirá que el efecto más modesto observado previamente con transferencia de un inóculo de linfocitos T donantes se deberá probablemente a menos inhibición de respuestas de clase I anti-MHC mediadas por CD8. Sin embargo, esto no puede probarse directamente en este modelo, debido a que los linfocitos T CD8+ C3H purificadas son incapaces de mediar GVHD letal por sí mismas, sin la presencia de linfocitos T CD4+.

20 El tratamiento con 0,1 mg de anticuerpos anti TNF- α cV1q tendrá un efecto más moderno en inhibir GVHD. Aproximadamente el 40% de los animales sobrevivirán pasados 60 días. Los ratones supervivientes mostrarán signos iniciales de GVHD pero se apagarán y la pérdida de peso no se incrementará tan rápido como en el grupo de 1 mg de cV1q sino que será significativamente diferente de los controles.

25 La ECP experimental se administrará mediante inyección i.v. de 10^7 esplenocitos singénicos de un ratón control de la misma camada en el mismo día que la BMT y 3 días más tarde. Los receptores F1 de linfocitos T del donante, en vez de células tratadas con ECP, presentarán aproximadamente supervivencia del 20% con un MST de aproximadamente 10 días que serán diferentes pero no significativamente diferentes del grupo control. Además, los ratones ECP supervivientes presentarán evidencia disminuida de síntomas de GVHD (por ejemplo, pelaje desordenado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea), y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará 5-20% por debajo de aquel del grupo transplantado ATBM control. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de células tratadas con ECP lo harán con cinéticas más lentas que los grupos no tratados.

30 La combinación de tratamiento de ECP con dosis subeficaces de anti-TNF- α será superior a cada tratamiento solo. Los receptores CBA de linfocitos T de donante, salvo los administrados con mAb cV1q a 0,1 mg junto con ECP, presentarán aproximadamente supervivencia del 90% en el día 60 que serán significativamente diferentes de los grupos control. Además, los ratones tratados de forma dual supervivientes no presentarán síntomas evidentes de GVHD (por ejemplo, pelaje desordenado, lesiones de la piel, postura encorvada, o diarrea), y sus pesos corporales estarán a un nivel relativamente constante que variará 5-12% por debajo de aquel del grupo transplantado ATBM control. Los ratones que desarrollan GVHD mortal en presencia de terapia dual lo harán con cinéticas más lentas que los grupos no tratados y, aunque no sea estadísticamente significativo, con cinéticas más lentas que los grupos de ECP y de anti-TNF solos.

Ejemplo 7 (Aplicación Humana para sinergizar y bajar la toxicidad de terapia de anti-TNF- α sola) (Prevista)

Sumario de Ejemplos

Este ejemplo demostrará que la pauta de intensidad de anti-TNF- α junto con ECP tiene un perfil de toxicidad significativamente mejor que aquellas propuestos en la bibliografía. Inicialmente se usará 1 mg/kg de infliximab anti-TNF- α . Sin embargo, el intervalo de dosis útiles puede variar de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg.

Pacientes

50 Los pacientes recibirán un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) usando estándar de régimen dictado por los sitios y el protocolo de acuerdo con las siguientes medicaciones y que no estará limitado a las siguientes medicaciones; incluirán corticosteroides orales e intravenosos, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetilo (MMF). Los pacientes que reciben trasplantes de HSC no mieloablativos recibirán quimioterapia de condicionamiento con busulfán y fludarabina y pautas de profilaxis de GVHD diferentes. El estatus serológico de CMV de pares donante-receptor y los tiempos de seguimiento serán similares. Se administrará ECP usando procedimientos estándar antes de HSC y posiblemente en varios momentos tras HSC. Infliximab se administrará tras HSC a una dosis de 0,5 mg/kg. Los pacientes se seguirán y evaluarán usando procedimientos estándar según la escala modificada de Glucksberg y los datos se recogerán en régimen de profilaxis de GVHD, fecha de aparición, y grado general y específico de órganos máximo.

60 Los IFI se clasificarán de acuerdo con el consenso internacional de la 2002 European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Se identificarán casos de IFI por revisión de los registros médicos de todos los pacientes identificados en la cohorte y por revisión de todas las bases de datos de patología, microbiología, control de infecciones y radiología. Los médicos documentarán sus hallazgos sin conocimiento de exposición a infliximab. Sólo se considerará para los análisis IFI probada o probable no debida a especies de *Candida*. La fecha de IFI se documentará según el día cuando el procedimiento de diagnóstico se lleve a cabo probando IFI, o según el día en el que estén disponibles datos de radiología y de microbiología para el trabajador clínico para IFI probable. Si un diagnóstico de IFI se hará después de muerte, la fecha de IFI se considerará la fecha de la muerte, pero si un diagnóstico IFI probable se confirma en examen postmortem, la fecha de IFI se documentará como el día cuando se haga el diagnóstico de IFI probable.

65

5 Todas las dosis de cualquier corticosteroide recibido por pacientes con GVHD grave se transformarán en equivalentes de prednisona usando la tabla de equivalencias de corticosteroides. La dosis de corticosteroides acumulativa, ajustada al peso corporal, se calculará desde el día de HSCT hasta la muerte, el desarrollo de IFI, el final del periodo de seguimiento de cohorte, o cuando los corticosteroides disminuyan gradualmente por debajo de 20 mg/día durante más de 30 días. Se documentará el uso de antifúngico empírico y profiláctico.

Los pacientes supervivientes se censurarán en esta fecha o en la última visita antes de esa fecha. El estudio será aprobado por cuerpos administrativos/reguladores apropiados.

Análisis estadístico

10 La prueba exacta de Fisher de dos lados, o la prueba χ^2 se usarán como sea apropiado para comparación de las características de línea base. Las tasas de incidencia de IFI y las proporciones de tasas de incidencia se calcularán de acuerdo con categorías de exposición diferentes a partir del día de trasplante en la cohorte de HSCT, y desde el día de aparición de GVHD en aquellos quienes desarrollan GVHD grave; los pacientes serán censurados en la muerte o en la última visita antes del final de seguimiento. Los intervalos de confianza para tasas de incidencia y para proporciones de tasas de incidencia se calcularán usando el procedimiento de Haensze y el de Byar, respectivamente. Las curvas de Kaplan-Meier se calcularán para supervivencia y para el tiempo para IFI a partir de la fecha de trasplante. En aquellos pacientes con GVHD grave, se calculará también el tiempo para IFI a partir de la aparición de GVHD aguda. Los tiempos para el evento se compararán usando la prueba de log-rank. El análisis de regresión de Cox dependiente del tiempo para IFI de aparición de GVHD se hará controlando posibles variables que se confunden o interacciones entre variables para pacientes con GVHD grave. Los modelos de Cox Univariate se calcularán para todos los posibles factores de riesgo con GVHD grave. Todas las covariables con un valor de P de menos de 2 en análisis de Cox de univariable de IFI se considerarán en el modelo de Cox de multivariable. Infiximab será modelará como una variable dependiente del tiempo; su exposición se asumirá como constante una vez se inicien las infusiones semanales. Sólo las variables candidatas que estén asociadas significativamente estadísticamente ($P < 0,05$) con IFI en el modelo final se retendrán a menos que se destaquen confundiendo de forma significativa. El Sistema SAS para Windows, versión 8.01 (SAS Institute, Carey, NC), se usará para los análisis anteriores.

Resultados

Incidencia de y tratamientos para GVHD aguda

30 Se administrará ECP aproximadamente 2 veces antes de HSC en los días -10 a -4 antes de HSC. Además, la terapia de ECP se administrará aproximadamente semanalmente evitando adicionalmente el desarrollo de GVHD aguda durante los primeros 100 días después del trasplante. Un análisis preliminar demostrará supervivencia y tasa de IFI similares entre pacientes sin GVHD y aquellos con GVHD de grados I a II, consecuentemente, estos grupos se almacenarán juntos dentro de ninguna GVHD o dentro de GVHD no grave. GVHD grave se definirá como un grado general de III o IV. Aproximadamente el 20% en la cohorte desarrollará GVDV grave aguda. La proporción de donantes no relacionados será más alta en pacientes con GVHD grave cuando se compara con el resto de la cohorte; de lo contrario, las características de la línea base serán similares. Entre receptores de trasplantes de HSC mieloablativos y no mieloablativos, la proporción de cualquier grado de GVHD o de GVHD grave será similar.

40 Los pacientes diagnosticados con GVHD grave pueden recibir medicaciones múltiples que pueden incluir MMF y corticosteroides a una dosis inicial de al menos 2 mg/kg/d, disminuida gradualmente para respuesta y la adición o el incremento en dosis de un inhibidor de calcineurina o sirolimus.

La administración de infliximab se iniciará aproximadamente 10-50 días después del diagnóstico inicial de GVHD aguda. Los pacientes recibirán 2-15 dosis de 1 mg/kg en una base semanalmente o bisemanalmente. Cuando se comparan con pacientes quienes no reciben infliximab, los receptores tendrán más probablemente signos y síntomas de GVHD.

IFI en la cohorte

IFI demostrada o probable no debida a especies de *Candida* (aspergilosis, cigomicosis, etc.) se diagnosticará en la cohorte durante el periodo de observación.

50 La IR de IFI general entre pacientes con GVHD grave será aproximadamente 1 caso/1000 días de pacientes de GVHD. Entre características de línea base, no estarán asociadas HSCT mieloablativas con un incremento significativo en IR de IFI de aproximadamente 3 casos/1000 pacientes-días de GVHD, mientras que los receptores de trasplantes mieloablativos quienes desarrollan GVHD grave tendrán una IR de IFI de menos de 1 caso/1000 días de pacientes de GVHD. Las características de protocolos de HSCT no mieloablativos, tales como régimen de condicionamiento, que reciben células madre de sangre periférica y uso de ciclosporina para profilaxis de GVHD, estarán asociadas también con un riesgo ligeramente más alto de IFI.

55 El tiempo hasta IFI a partir de la aparición de GVHD entre pacientes con GVHD grave estará estratificado por uso de 3 mg/kg de infliximab. Habrá una probabilidad significativamente mayor de IFI en los receptores de infliximab. El tratamiento con ECP no mostrará un incremento estadísticamente significativo en IFI.

60 Se desarrollará un modelo de análisis de regresión de Cox dependiente del tiempo desarrollando IFI en pacientes con GVHD grave. Se calcularán proporciones de riesgo (HR) de univariable para todos los factores de riesgo posibles. Sólo se tomarán en consideración características con una HR no ajustada. Los valores de P de menos de 0,20 se tomarán en consideración en el modelo de multivariable.

Las variables que serán colineales con una HSCT no mieloablativa descrita no se incluirán por separado, y dado que se analizarán 10 IFI, se retendrán en la concentración final de modelo 2 covariables con el HR más alto y los valores

de P de menos de 0,05 se retendrán en el modelo final. Dado que infliximab se administrará preferencialmente a pacientes con GVHD gastrointestinales graves y que el grado 3 ó 4 específico de órganos gastrointestinales se encontrará que están asociados significativamente con IFI en Cox univariable, esta covariable se mantendrá en el modelo final minimizando confusión por indicación, incluso aunque llegue a ser no significativa en la presencia de otras covariables modeladas. La HR ajustada de uso de infliximab, como una covariable dependiente del tiempo, será aproximadamente 14; la HR ajustada de HSCT no mieloablativa será aproximadamente 8. La HR ajustada de GVHD de grado 3 ó 4 específico de órgano gastrointestinal grave será aproximadamente 4 en presencia de uso de infliximab y tipo de trasplante como covariables. Los trazados de funciones de tiempo frente a riesgo de IFI de exposición a 3 mg/kg de infliximab mostrarán riesgo creciente a lo largo del tiempo. El uso de 1 mg/kg o menos de infliximab no revelará un incremento significativo en HR. ECP solo mostrará una HR no significativamente diferente de aquellos pacientes tratados sólo con régimen estándar. La combinación de infliximab de dosis baja con ECP tendrá una HR significativamente más baja que dosis alta de infliximab solo. Tomado conjuntamente con la eficacia incrementada este régimen de tratamiento es una modalidad de tratamiento más segura, más efectiva.

Supervivencia

La supervivencia mediana de toda la cohorte al final del seguimiento será aproximadamente 250-400 días. Cuando se estratifica de acuerdo con la gravedad de GVHD, la supervivencia mediana de pacientes será significativamente más baja que aquella de pacientes con o sin GVHD no grave. Entre pacientes con GVHD grave, la supervivencia mediana de receptores de infliximab 3 mg/kg puede ser significativamente más baja que aquella de los no receptores. Los pacientes tratados con ECP tendrán un patrón de supervivencia significativo sobre pacientes de pauta estándar o sobre pacientes que reciben dosis baja de infliximab solo. Disminuir la dosis de infliximab a 1 mg/kg junto con la pauta de ECP estándar conducirá a mejoras significativas en valor de GVHD pero la IFI asociada con niveles más altos de infliximab se reducirá espectacularmente y estadísticamente.

REIVINDICACIONES

1. Un producto combinado que comprende:
 - a) una población de células *ex vivo* que ha sido sometida a un tratamiento de inducción de apoptosis *ex vivo*; y
 - 5 b) infliximab en una dosis que no excede de 3 mg/kg,
 - c) para administración combinada, simultánea o secuencial a un paciente para usar en tratar una enfermedad autoinmune o en mejorar uno o más síntomas de la misma.
2. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, para administración simultánea.
- 10 3. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la población de células se obtiene a partir de una porción de sangre.
4. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las células son leucocitos autólogos.
- 15 5. El producto para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la población de células se ha sometido a un tratamiento de inducción de apoptosis que es un procedimiento de fotoféresis extracorpórea (ECP) que emplea un compuesto fotoactivable conjuntamente con luz de una longitud de onda que activa dicho compuesto fotoactivable.
6. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA.
7. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el psoraleno es 8-metoxipsoraleno (8-MOP).
- 20 8. El producto para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para usar en tratar lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, tiroidosis, enfermedad de injerto frente a hospedador, escleroderma, diabetes mellitus, enfermedad de Graves; sarcoidosis, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, colitis ulcerosa y patología de Crohn.
9. El producto para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para usar en tratar enfermedad de injerto frente a hospedador.
- 25 10. El producto para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para usar en administración a un receptor de trasplante.
- 30 11. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los componentes a) y b) se adaptaron para administrarse de acuerdo con un programa seleccionado del grupo constituido por dos días, una semana antes del trasplante; tres días, una semana antes de recoger dicho trasplante; dos días a la semana durante dos semanas antes del trasplante; y tres días a la semana durante tres semanas antes del trasplante.
- 35 12. El producto para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha población de células es una población autóloga obtenida del paciente antes de un trasplante y en el que el producto comprende adicionalmente una segunda población de células autólogas obtenidas del paciente después de que dicho paciente ha recibido dicho trasplante, en el que dicha segunda población de células se ha sometido a un tratamiento inductor de la apoptosis.
- 40 13. El producto para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los componentes a) y b) se adaptaron para administrarse de acuerdo con un programa seleccionado del grupo constituido por dos días, una semana antes de que dicho receptor reciba dicho implante; tres días, una semana antes de que dicho receptor reciba dicho implante; dos días a la semana durante dos semanas antes de que dicho receptor reciba dicho implante; y tres días a la semana durante tres semanas antes de que dicho receptor reciba dicho implante; y la etapa c) se lleva a cabo de acuerdo con un programa seleccionado del grupo constituido por semanalmente, mensualmente, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos meses, cada tres meses, cada seis meses y anualmente.
- 45 14. Una composición que comprende infliximab para usar en un procedimiento para tratar un paciente con un trastorno autoinmune o la predisposición para un trastorno autoinmune, comprendiendo dicho procedimiento, analizar al paciente para determinar si el paciente tiene un trastorno autoinmune y administrar infliximab en una dosis que no exceda de 3 mg/kg y ECP si tal paciente tiene un trastorno autoinmune o una predisposición a tal trastorno.