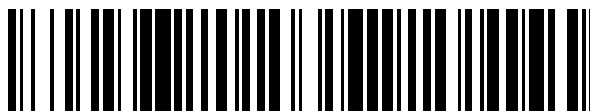


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 678**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/164 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09772430 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2318020**

54 Título: **Células sanguíneas inmunosupresoras y métodos de producir las mismas**

30 Prioridad:

30.06.2008 EP 08011780

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

01.12.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 672
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**TERNESSE, PETER;
OPELZ, GERHARD;
SIMON, HELMUT;
EHSER, SANDRA;
KLEIST, CHRISTIAN;
SANDRA-PETRESCU, FLAVIUS;
IANCU, MIRCEA;
JIGA, LUCIAN;
CHUANG, JING-JING y
OELERT, THILO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 552 678 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

Células sanguíneas inmunosupresoras y métodos de producir las mismas

- 5 La presente memoria descriptiva de invención se refiere a un método de producción de células sanguíneas inmunosupresoras que se pueden usar para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular esclerosis múltiple, rechazo de injerto de órgano y enfermedad de injerto frente al huésped.

Introducción

- 10 El papel de los autoantígenos y los linfocitos autorreactivos en el comienzo y mantenimiento de las enfermedades autoinmunes se ha discutido de forma controvertida (1). Incluso si los autoantígenos no fueran la causa principal de algunas afecciones autoinmunes, ofrecen una forma de dirigir un efecto inmunosupresor en el órgano afectado, y por lo tanto constituyen una alternativa prometedora a los inmunosupresores ampliamente reactivos usados habitualmente. En un ensayo clínico, un péptido inmunomodulador derivado de hsp60 - uno de los autoantígenos diana conocidos - se inyectó en pacientes con diabetes de tipo 1 recién diagnosticada. Aunque el estudio fue pequeño, sugirió que el tratamiento con el péptido mantuvo la producción de insulina endógena (3). También se ha contemplado la inducción de tolerancia mediante administración oral de autoantígenos. Esto se ha probado con mielina en esclerosis múltiple (MS), colágeno en RA, e insulina en diabetes del tipo I. A pesar de los éxitos en la prevención de enfermedades en modelos animales, los ensayos clínicos que intentan tratar una enfermedad en curso en seres humanos han tenido no obstante muy poco éxito (4). Lo que se ha aprendido de los modelos animales y de los pocos estudios clínicos es que los autoantígenos se deben presentar de una forma no inmunogénica, habitualmente alterando su estructura. Un ejemplo con éxito de la última estrategia es el tratamiento de pacientes de MS con copaxona - un péptido sintético que mimetiza la composición del componente nervioso central, proteína básica de mielina (4).

- Habitualmente se piensa que las células dendríticas (DC) son células fuertemente estimuladoras, pero las DC también pueden suprimir la respuesta inmune (5). Evidentemente, la evolución ha desarrollado mecanismos altamente eficaces para proteger los tejidos y los órganos de la autodestrucción, estando mediado uno de ellos por las DC (5). Lo que la naturaleza aplica para la protección frente al autoataque se podría usar por el hombre para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o rechazo a injerto. Desafortunadamente, las DC supresoras naturales son difíciles de definir fenotípicamente y por lo tanto difíciles de usar para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se ha mostrado que las DC inmaduras inducen tolerancia, mientras que las DC maduras activan respuestas inmunes (5). Sin embargo, un cuerpo creciente de evidencias recientes indica que la maduración de las DC por sí misma no es una característica diferencial de inmunogenicidad en lugar de tolerogenicidad (6). En la actualidad se cree que el desarrollo de una respuesta inmunogénica o tolerogénica depende del efecto neto de la dosis de antígeno, el linaje de DC y el estado maduracional, la estimulación de DC mediante productos derivados de patógenos, y el entorno de citoquinas (5, 6). Dada la función supresora apenas predecible de las DC naturales, una alternativa razonable para fines terapéuticos sería la generación *in vitro* de DC inhibitoras. Se han descrito varios métodos para diseñar DC supresoras (7). Un riesgo principal de las DC inhibitoras generadas deliberadamente es su potencial de reversibilidad frente a un estado estimulador. Además, su eficacia puede estar limitada a ciertas especies.

- En un enfoque diferente desvelado en el documento de Patente EP1 739 166, se intentó tratar una enfermedad autoinmune con una población específica de linfocitos T reguladores para un autoantígeno obtenido directamente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por estimulación de leucocitos o PBMC con el autoantígeno, en concreto proteína básica de mielina.

Descripción detallada

- 50 Jiga *et al.*, (2007) Transplantation 83:347-350 describen el uso de Mitomicina C para la transformación estable de células dendríticas estimuladoras en inhibitoras. Una inyección individual de tales DC donantes en el receptor antes de trasplante de corazón suprimió el rechazo de aloinjerto de corazón en ratas (8). Sin embargo, el uso de las DC conlleva la desventaja de que la generación de las DC y el período de maduración puede conducir a variaciones en la calidad de las DC, que influye negativamente en la reproducibilidad del enfoque.
- 55 Además, el uso terapéutico de células dendríticas aún se considera problemático ya que las DC son fuertemente inmunogénicas incluso cuando se convierten en células supresoras.
- 60 De ese modo, el problema que subyace la presente invención es proporcionar medios para inducir tolerancia inmune sin provocar los efectos adversos observados con las terapias convencionales. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o la sangre completa tratada con mitomicina C (MMC) sirvieron como potentes inductores de tolerancia en un modelo de trasplante de corazón de rata.

La estrategia para controlar reacciones autoinmunes prevista en la presente invención es cargar células sanguíneas humanas o murinas tratadas con MMC con autoantígenos y usar estas "balas inhibitoras" para fijar como diana la supresión de linfocitos T autorreactivos específicos *in vitro* e *in vivo*.

5 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva desvela una composición farmacéutica para tratar una enfermedad inflamatoria en un paciente, comprendiendo dicha composición células sanguíneas inmunosupresoras aisladas tratadas con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, un autoantígeno, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Específicamente, el problema se soluciona mediante la presente invención, que proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, rechazo de injerto de órgano o enfermedad del injerto frente al huésped en un paciente, comprendiendo dicha composición células completas o Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) aisladas tratadas

15 (i) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, o

(ii) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico y un autoantígeno;

y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Con fines de conveniencia, las "células sanguíneas inmunosupresoras" o "células sanguíneas" se denominan en lo sucesivo en el presente documento "BC".

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "células sanguíneas" (BC) se refiere a sangre completa o distintos tipos de células dentro de la sangre completa que tienen las propiedades deseadas. Estos distintos tipos de células incluyen Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) tales como linfocitos o monocíticos, o células dendríticas (DC).

30 Preferentemente, las "células sanguíneas" son sangre completa o PBMC. Las PBMC se pueden extraer de la sangre completa usando Ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa las capas de la sangre, formando los monocitos y linfocitos un revestimiento leucocitario bajo una capa de plasma. Este revestimiento leucocitario contiene las PBMC. Además, las PBMC se pueden extraer de la sangre completa usando una lisis hipotónica que lisa preferentemente células sanguíneas rojas. Este método da como resultado neutrófilos y otras células polimorfonucleares (PMN) que son importantes para que se obtenga defensa inmune innata.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente quimioterapéutico" incluye cualquiera de numerosos fármacos quimioterapéuticos que se pueden usar en las composiciones, métodos o usos de la invención. Estos compuestos caen dentro de varias categorías diferentes, que incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, antimetabolitos, y derivados de fuentes naturales.

40 Algunos ejemplos de agentes alquilantes que se pueden usar en la invención incluyen busulfán, caroplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatina, ciclofosfamida (es decir, citoxano), dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, procarbazona, estreptozocina, y tiotepa.

45 Algunos ejemplos de antibióticos antineoplásicos incluyen bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, mitomicina (por ejemplo, mitomicina C), mitoxantrona, pentostatina, y plicamicina.

50 Algunos ejemplos de antimetabolitos incluyen fluorodesoxiuridina, cladribina, citarabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5FU)), gemcitabina, hidroxiurea, mercaptopurina, metotrexato, y tioguanina.

Algunos ejemplos de derivados de fuentes naturales incluyen micofenolato (mofetilo), docetaxel, etopósido, irinotecán, taxanos (por ejemplo paclitaxel), tenipósido, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, prednisona, y tamoxifeno.

55 Algunos ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en la invención incluyen asparaginasa y mitotano. Además, también se puede usar ceramida C2.

60 En una realización especialmente preferente, el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en mitomicina C, ceramida C2, tunicamicina, micofenolato mofetilo, metabolitos del triptófano (y derivados semisintéticos del mismo), e inhibidores del proteasoma. Los metabolitos del triptófano también se conocen como quinureninas, un ejemplo de las cuales es Tranilast.

Lo más preferentemente, el agente quimioterapéutico es mitomicina C.

65

El experto en la materia será consciente de una diversidad de antígenos o derivados de los mismos que se pueden usar en el contexto de la presente invención. Estos incluyen antígenos naturales tales como MBP (Proteína Básica de Mielina, humana), MOG (Glicoproteína de Oligodendrocito de Mielina), PLP (Proteína de Proteolípido), péptidos sintéticos tales como Copaxone® (también conocido como copolímero 1 o glatirámico acetato que comprende una mezcla de péptidos sintetizados aleatoriamente usando los siguientes cuatro aminoácidos: tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina; las secuencias de péptidos se basan en la proteína humana de origen natural MBP) (*Teva Pharmaceutical Industries Ltd.*), YEAKE, VEAKE, FEAKE (otros copolímeros basados en MBP₈₅₋₉₉) (*Fridkis-Hareli et al.*, 2002, *J. Clin. Invest.*, 109:1635-1643), péptidos naturales derivados de los antígenos anteriores descritos en *Bielekova et al.*, 2000, *Nature Med.*, 6:1167-1175.), ADN que codifica diversos autoantígenos de mielina, por ejemplo ADN que codifica MBP, PLP, MOG, MAG de longitud completa (*Ho et al.*, 2005, *J. Immunol.*, 175:6226-6234), ADN que codifica péptidos de mielina derivados de las proteínas MBP, MOG, PLP (*Weissert et al.*, 2000, *PNAS*, 97:1689-1694), antígenos de estudios clínicos tales como APL CGP77116 (ligando de péptido alterado para MBP₈₃₋₉₉) (*Bielekova et al.*, 2000, *Nature Med.*, 6:1167-1175), APL NBI-5788 (ligando de péptido alterado para MBP₈₃₋₉₉) (*Kappos et al.*, 2000, *Nature Med.*, 6:1176-1182), MBP₈₂₋₉₈ (*BioMS Technology Corp.*, AB, Canadá) (*Warren et al.*, 2006, *Eur. J. Neurol.*, 13:887-895, *Warren y Catz*, 2000, *Multiple Sclerosis*, 6:300-311) y BHT-3009 que representa un constructo de ADN que codifica MBP (*Bayhill Therapeutics, Palo Alto, CA, USA*) (*Bar-Or et al.*, 2007, *Arch Neurol.*, 64:1407-1415; *Bar-Or et al.*, 2005, *Multiple Sclerosis*, 11:S167. *Vollmer et al.*, 2005, *Multiple Sclerosis*, 11:S13).

En una realización preferente, el antígeno usado en el contexto de la presente invención es proteína básica de mielina (MBP). Incluso más preferente como antígeno es un péptido sintético de MBP, tal como Copaxone.

La composición de la presente invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, que es otra realización de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa con respecto al tratamiento de enfermedades inflamatorias, se ha de entender que incluye modos tanto sintomáticos como profilácticos, que es el tratamiento inmediato, por ejemplo de inflamación aguda (tratamiento sintomático) así como tratamiento anticipado para prevenir, mejorar o restringir sintomatología a largo plazo (tratamiento profiláctico). El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones con respecto a tales enfermedades se ha de interpretar en consecuencia que incluye tratamiento tanto sintomático como profiláctico, es decir tratamiento sintomático para mejorar sucesos inflamatorios agudos y tratamiento profiláctico para inhibir estado inflamatorio en curso y mejorar una exacerbación bronquial futura asociada al mismo.

Preferentemente, "tratamiento profiláctico" se refiere a prevenir las enfermedades y trastornos a los que se hace referencia en la presente solicitud. "Prevenir" se refiere a conservar la salud con respecto a las enfermedades o trastornos a los que se hace referencia en el presente documento durante un cierto período de tiempo en un sujeto. Se ha de entender que dicho período de tiempo depende de la cantidad de compuesto farmacológico que se ha administrado y factores individuales del sujeto discutidos en otro lugar en la presente memoria descriptiva. Se ha de entender que la prevención puede no ser eficaz en todos los sujetos tratados con el compuesto de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos de un grupo de edad o población se prevenga de forma eficaz de padecer una enfermedad o trastorno al que se hace referencia en el presente documento o sus síntomas acompañantes. Preferentemente, en este contexto se prevé un grupo de edad o población de sujetos que normalmente, es decir, sin las medidas preventivas de acuerdo con la presente invención, desarrollarían una enfermedad o trastorno al que se hace referencia en el presente documento. Alternativamente, la prevalencia de una enfermedad en un grupo de edad se podrá reducir significativamente con respecto a la prevalencia normal en un grupo de edad de sujetos que se ha prevenido (protegido) de forma eficaz de la enfermedad. El que una parte sea estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas discutidas posteriormente en la presente memoria descriptiva.

La expresión "tratamiento sintomático" se refiere a mejorar las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente o los síntomas que acompañan a las mismas en un grado significativo. En el caso de tratamiento de rechazo de injerto de órgano, preferentemente, suprime el rechazo de modo que el órgano u órganos trasplantados permanezcan funcionales. También preferentemente, la enfermedad de injerto frente al huésped se limita por el tratamiento en un grado tal que los órganos del paciente no se dañen de forma significativa.

Se ha de entender que tratamiento, como se usa de acuerdo con la presente invención, puede no ser eficaz en todos los sujetos que se van a tratar. Sin embargo, el término requerirá que una parte estadísticamente significativa de sujetos que padecen una enfermedad o trastorno al que se hace referencia en el presente documento se puedan tratar con éxito. El que una parte sea estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, ensayo t de Student, ensayo de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferentes son al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, o 0,0001. Preferentemente, el

tratamiento será eficaz para al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de los sujetos para un grupo de edad o población dados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad inflamatoria" se refiere a enfermedades que son el resultado de una reacción inmune del tejido conectivo y los vasos sanguíneos de un individuo a un estímulo, con el fin de eliminar o inactivar dicho estímulo. Algunos efectores desencadenantes incluyen estímulos mecánicos, u otros factores físicos, por ejemplo radiación ionizante, luz UV, calor, frío; sustancias químicas, por ejemplo bases, ácidos, metales pesados, toxinas bacterianas, alérgenos, y complejos inmunes, así como patógenos, por ejemplo microorganismos y virus, gusanos e insectos; y productos patógenos del metabolismo, enzimas de funcionamiento inadecuado, tumores malignos.

Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de dicho compuesto para tratar una enfermedad particular, con una proporción beneficio/riesgo razonable. En general, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se referirá a una cantidad de dicho compuesto que es fisiológicamente significativa y mejora la salud del individuo. Un agente, es decir, dicho compuesto, es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio en la fisiología del receptor humano. Por ejemplo, en el tratamiento de una afección patológica, la administración de dicho compuesto que alivia o detiene el progreso adicional de la afección se consideraría tanto fisiológicamente significativa como terapéuticamente eficaz.

Como se ha indicado anteriormente, las BC de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Tales enfermedades inflamatorias se pueden subdividir en enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades inflamatorias agudas, enfermedades inflamatorias alérgicas, enfermedades de rechazo de injerto frente al huésped, y trastornos autoinmunes, todas las cuales se incluyen dentro de la presente invención. Entre estos subgrupos, se pueden producir enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio, enfermedades inflamatorias de la piel, enfermedades inflamatorias alérgicas, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal y enfermedades inflamatorias cardíacas.

Preferentemente, las BC de la presente invención son útiles en el tratamiento de los trastornos autoinmunes que se enumeran posteriormente en el presente documento.

Las BC también se pueden usar para tratar cualquier enfermedad o afección de las vías aéreas o los pulmones que requiera terapia inmunosupresora, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes de, o que afectan a, los pulmones (por ejemplo, para el tratamiento de sarcoidosis, alveolitis o neumonitis por hipersensibilidad crónica) o para el mantenimiento de trasplante alogénico de pulmón, por ejemplo, después de trasplante de pulmón o trasplante del corazón y pulmón.

Una realización preferente adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedad de rechazo de injerto de órgano y/o injerto frente al huésped que comprende células sanguíneas inmunosupresoras aisladas tratadas con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como inmunosupresores, las BC son útiles cuando se administran para la prevención de rechazo de injerto de órgano o tejido mediado por inmunidad. Algunos ejemplos de tejidos y órganos trasplantados que padecen estos efectos son corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, córnea, pulmón, páncreas, intestino delgado, extremidades, músculo, nervio, duodeno, intestino delgado, células islote pancreáticas, y similares; así como enfermedades de injerto frente al huésped ocasionadas por trasplante de médula ósea.

Una realización preferente de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento sintomático de enfermedad de rechazo de injerto de órgano e injerto frente al huésped. Preferentemente, está incluido en la presente invención el tratamiento de rechazo de los siguientes órganos y tejidos: corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, córnea, pulmón, páncreas, intestino delgado, extremidades, músculo, nervios, duodeno, intestino delgado y células islote pancreáticas. Por lo general, la enfermedad del injerto frente al huésped está provocada por trasplante de médula ósea. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende BC del donante o el receptor. Más preferentemente, en el caso de enfermedad del injerto frente al huésped, las BC se toman del receptor del trasplante mientras que en el caso de rechazo de injerto de órgano las células se toman del donante.

De forma interesante, se ha descubierto en el estudio subyacente a la presente invención que la composición farmacéutica desvelada en la presente solicitud no solo se puede usar para el tratamiento profiláctico de un rechazo de injerto de órgano sino también para su tratamiento sintomático. Los mecanismos que se requieren para el tratamiento profiláctico de rechazo de injerto de órgano y para el tratamiento sintomático del mismo difieren considerablemente. El tratamiento profiláctico solo requiere la supresión de relativamente pocas células inmunes inactivas. En el estado sin estimular no tratado previamente se ha estimado que una frecuencia de aproximadamente un colon precursor en 100.000 linfocitos T CD8+ exhibe especificidad para un antígeno definido (Blattmann *et al.*, 2002, J. Exp. Med., 195:657-664).

En un rechazo de injerto de órgano agudo los clones de células inmunes que reconocen el tejido del donante ya se han expandido. Con respecto a las infecciones virales, en 7-8 días se produce un aumento masivo en el número de clones de linfocitos T específicos, hasta 50.000 veces comprendiendo aproximadamente de 15 a 20 ciclos de proliferación (Williams & Bevan, 2007, Ann. Rev. Immunol., 25:171-192). De ese modo, la actividad de un gran número de células se va a suprimir con éxito. Además las células inmunes activas están en un estado fisiológico diferente en comparación con las células inmunes restantes. Con el fin de iniciar la proliferación y diversas funciones efectoras los linfocitos T CD4+ y CD8+ no tratados previamente necesitan encontrar antígenos en órganos linfoides presentados por células presentadoras de antígeno (APC). Por el contrario, los linfocitos T activados y expandidos se acumulan en los tejidos periféricos para encontrar y posteriormente eliminar las fuentes antigénicas. Durante este procedimiento extremadamente complejo las células activadas expresan una mezcla de diversas moléculas de señalización y efectoras tales como citoquinas y quimioquinas que exhiben funciones incontables sobre células inmunes así como no inmunes. La exposición a antígenos extraños resulta habitualmente en la aparición de las denominadas células de memoria longevas que comprenden un 5 %-10 % del número original de células efectoras activadas. La calidad de las células de memoria se refleja en una mayor y más eficaz respuesta a encuentros adicionales con los mismos antígenos (Harty & Badovinac, 2008, Nat. Rev. Immunol., 8:107-119; Williams & Bevan, 2007, Ann. Rev. Immunol., 25:171-192; Sprent & Surh, 2002, Ann. Rev. Immunol., 20:551-579; Rogers *et al.*, 2000, J. Immunol., 164:2338-2346). Por lo tanto, la eficacia de la composición farmacéutica de la presente invención para el tratamiento sintomático de un rechazo de injerto de órgano fue sorprendente.

Preferentemente, las células sanguíneas de la composición farmacéutica para el tratamiento sintomático de rechazo de injerto de órgano y enfermedad del injerto frente al huésped eran células mononucleares de sangre periférica.

La regulación de la respuesta inmune por las BC podría encontrar una utilidad particular en el tratamiento de trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, hiperinmunoglobulinemia E, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, esclerosis sistémica progresiva, miastenia gravis, diabetes del tipo I, uveitis, encefalomielitis alérgica, glomerulonefritis, y similares; y otras enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos, tales como VIH. En los casos particulares de VIH-1, VIH-2 y cepas retrovirales relacionadas, la inhibición de la mitosis de linfocitos T suprimiría la replicación del virus, dado que el virus depende de las funciones proliferativas de los linfocitos T del hospedador para replicarse.

En una realización preferente, el trastorno autoinmune que se va a tratar con la composición farmacéutica de la presente invención es esclerosis múltiple.

Otras afecciones tratables podrían incluir, pero no se limitan a, enfermedades isquémicas del intestino, enfermedades inflamatorias del intestino, enterocolitis necrotizante, lesiones intestinales asociadas a quemaduras térmicas y enfermedades mediadas por leucotrieno B₄; inflamaciones/alergias intestinales tales como enfermedad celiaca, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, y mastocitosis; enfermedades alérgicas relacionadas con la alimentación que tienen manifestaciones sintomáticas remotas del tracto gastrointestinal (por ejemplo, migraña, rinitis y eccema); enfermedades renales tales como nefritis intersticial, síndrome de Good-pasture, síndrome hemolítico-urémico y nefropatía diabética; enfermedades nerviosas tales como miositis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Meniere, polineuritis, neuritis múltiple, mononeuritis y radiculopatía; enfermedades endocrinas tales como hipertiroidismo y enfermedad de Basedow; enfermedades hemáticas tales como aplasia de células rojas pura, anemia aplásica, anemia hipoplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, agranulocitosis, anemia perniciosa, anemia megaloblástica y aneritroplasia; enfermedades óseas tales como osteoporosis; enfermedades respiratorias tales como sarcoidosis, pulmón fibroide y neumonía intersticial idiopática; enfermedades de la piel tales como dermatomiositis, leucoderma vulgar, ictiosis vulgar, sensibilidad fotoalérgica y linfoma de linfocitos T cutáneo; enfermedades circulatorias tales como arteriosclerosis, aterosclerosis, síndrome de aortitis, poliarteritis nodosa y miocardosis; enfermedades del colágeno tales como esclerodermia, granuloma de Wegener y síndrome de Sjogren; adiposis; fascitis eosinofílica; enfermedades periodontales tales como lesiones de las encías, periodontio, hueso alveolar y sustancia ósea dental; síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis; alopecia androgénica o alopecia senil previniendo la depilación o proporcionando germinación capilar y/o estimulando la generación capilar y el crecimiento capilar; distrofia muscular; Pioderma y síndrome de Sezary; enfermedad de Addison; enfermedades mediadas por oxígeno activo, como por ejemplo lesión de órgano tal como lesión por isquemia-reperusión de órganos (tales como corazón, hígado, riñón y tracto digestivo) que se produce tras conservación, trasplante o enfermedad isquémica (por ejemplo, trombosis e infarto cardíaco); enfermedades intestinales tales como choque por endotoxinas, colitis pseudomembranosa y colitis causada por fármacos o radiación; enfermedades renales tales como insuficiencia renal aguda isquémica e insuficiencia renal crónica; enfermedades pulmonares tales como toxinosis causada por oxígeno en el pulmón o fármacos (por ejemplo, paracort y bleomicinas), cáncer pulmonar y enfisema pulmonar; enfermedades oculares tales como cataratas, siderosis, retinitis, pigmentosa, degeneración macular senil, cicatrización vítrea y quemadura corneal con bases; dermatitis tales como eritema multiforme, dermatosis ampollar IgA lineal y dermatitis por cemento; y otras tales como gingivitis, periodontitis, sepsis, pancreatitis, enfermedades causadas por contaminación medioambiental (por ejemplo, contaminación aérea), envejecimiento, carcinogénesis, metástasis de carcinoma e hipobaropatía; enfermedades causadas por liberación de histamina o leucotrieno C₄; enfermedad de Behcet tal como enfermedad de Behcet intestinal, vascular o neurológica, y también enfermedad de Behcet que afecta a la cavidad oral, piel, ojos, vulva, articulaciones, epidermis, pulmón, riñón etc.

En este contexto, la presente invención se refiere adicionalmente al uso de una composición de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. El medicamento, es decir las células sanguíneas tratadas como se ha descrito anteriormente, se puede modificar con métodos y compuestos conocidos por el experto en la materia con el fin de hacerlo fácilmente administrable al paciente. Por ejemplo, también se pueden añadir vehículos farmacéuticamente aceptables.

Por ejemplo, algunas composiciones líquidas acuosas de la presente invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades oculares tales como enfermedades autoinmunes (que incluyen, por ejemplo, queratocono, queratitis, distrofia epitelial de la córnea, leucoma, úlcera de Mooren, escleritis y oftalmopatía de Graves) y rechazo al trasplante de córnea. En particular, las composiciones que pertenecen a la presente invención son útiles para el tratamiento de un sujeto para rechazo de órganos mediado por el sistema inmune o aloinjerto tisular, una enfermedad de injerto frente al huésped, una enfermedad autoinmune, una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, una enfermedad hiperproliferativa, o una enfermedad intestinal o del intestino isquémica o inflamatoria.

El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con las BC.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulamiento o formulación auxiliar sólida, semisólida o líquida inerte, no tóxica de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorio; aceites tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de semilla de soja; glicoles, tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, soluciones de tampón fosfato; lubricantes compatibles, no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio; así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes. Algunos conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Las composiciones se pueden administrar a seres humanos y otros animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía bucal, o en forma de una pulverización oral o nasal. El término "parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular. Preferentemente, la administración se produce por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea.

Algunas composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral comprenden soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Algunos ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos o no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para producir células sanguíneas inmunosupresoras, que comprende la exposición de una muestra de células sanguíneas aisladas a un agente quimioterapéutico y/o un autoantígeno o un derivado del mismo.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para producir células de sangre completa inmunosupresoras o PBMC, que comprende la exposición de una muestra de sangre completa aislada o PBMC *in vitro* (i) a un agente quimioterapéutico y/o (ii) a un agente quimioterapéutico y un autoantígeno.

Preferentemente, las BC se tratan en primer lugar con el autoantígeno, y, posteriormente con el agente quimioterapéutico, de una manera tal como se describe en la sección de ejemplos. Sin embargo, la persona experta en la materia será capaz de ajustar fácilmente los tiempos de incubación y cantidades de antígeno o agente quimioterapéutico con el fin de obtener las células sanguíneas inmunosupresoras deseadas.

En algunos casos, es deseable añadir solamente el agente quimioterapéutico solo. Este es el caso en el que, por ejemplo, se usa sangre completa de donante o las PBMC como células inmunosupresoras para inhibir rechazos a trasplante. Para esta aplicación son particularmente preferentes algunos metabolitos de triptófano (quinureninas). Para esta aplicación también es preferente la mitomicina C.

La divulgación también proporciona un método para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad autoinmune, comprendiendo dicho método: a) obtener una muestra de células sanguíneas; b) tratar dicha muestra de células sanguíneas con un agente quimioterapéutico y un autoantígeno; y c) administrar tales células sanguíneas tratadas a dicho paciente; en el que dichas células sanguíneas tratadas mejoran dicha enfermedad autoinmune en dicho paciente.

De acuerdo con este aspecto de la divulgación, en primer lugar las células sanguíneas se cargan o se pulsan con uno o más antígenos, tal como uno o más autoantígenos, y a continuación se modifican *ex vivo* con un agente quimioterapéutico como se describe a continuación en la sección de Ejemplos. En una realización, las células sanguíneas se pulsan con uno o más autoantígenos diabetogénicos tales como GAD, un autoantígeno de células de los islotes (ICA), o autoantígeno NRP-A7. En una realización en particular, las células sanguíneas se pulsan con cada uno de GAD 65, ICA 512 y NRP-A7. De forma alternativa, las células sanguíneas se pueden pulsar con lisados de islote pancreático. En otra realización, las células sanguíneas se pulsan con colágeno (por ejemplo, para tratar la artritis). En otra realización, las células sanguíneas se pulsan con proteína básica de mielina (MBP) (por ejemplo, para tratar la esclerosis múltiple), o un derivado de la misma, como se ha descrito anteriormente.

En una divulgación adicional, las células sanguíneas se pulsan con MBP o un derivado, péptido sintético del mismo, y la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

Además, en otra divulgación, la muestra de sangre se trata en primer lugar con el autoantígeno y posteriormente con el agente quimioterapéutico.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un receptor de injerto, comprendiendo dicho método a) la obtener una muestra de células sanguíneas de un donante, b) tratar dicha muestra de células sanguíneas con un agente quimioterapéutico, y c) administrar tales células sanguíneas tratadas a dicho receptor del injerto, en el que dichas células sanguíneas de donante tratadas mejoran el riesgo de desarrollar rechazo al injerto en dicho paciente.

Además, la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un receptor de injerto, comprendiendo dicho método

a) obtener una muestra de células sanguíneas de un donante, en el que el receptor padece rechazo al injerto de órganos;

b) tratar dicha muestra de células sanguíneas con un agente quimioterapéutico; y

c) administrar tales células sanguíneas tratadas a dicho receptor de injerto, en el que dichas células sanguíneas de donante tratadas mejoran el rechazo al injerto de órganos en desarrollo en dicho paciente.

En una divulgación adicional, el agente quimioterapéutico es un metabolito de triptófano, lo más preferentemente un derivado de quinurenina, tal como Tranilast. También preferentemente, el agente quimioterapéutico es mitomicina C.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un receptor de injerto, comprendiendo dicho método

a) obtener una muestra de células sanguíneas de un receptor

b) tratar dicha muestra de células sanguíneas con un agente quimioterapéutico, y

c) administrar tales células sanguíneas tratadas a dicho receptor de injerto, en el que dichas células sanguíneas de receptor tratadas mejoran el riesgo de desarrollar la enfermedad de injerto frente al huésped iniciada en dicho paciente.

Además, la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un receptor de injerto, comprendiendo dicho método

a) obtener una muestra de células sanguíneas de un receptor, en el que el receptor está padeciendo la enfermedad de injerto frente al huésped;

b) tratar dicha muestra de células sanguíneas con un agente quimioterapéutico; y

c) administrar tales células sanguíneas tratadas a dicho receptor de injerto, en el que dichas células sanguíneas de receptor tratadas mejoran la enfermedad de injerto frente al huésped en desarrollo en dicho paciente.

En una divulgación adicional, el agente quimioterapéutico es un metabolito de triptófano, lo más preferentemente un derivado de quinurenina, tal como Tranilast. También preferentemente, el agente quimioterapéutico es mitomicina C.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Efecto de las BC tratadas con MMC cargadas con MBP en linfocitos T en reposo o activados de pacientes con MS. Estimulación primaria (A, B): Las MBP-MMC-BC se coincubaban con linfocitos periféricos en reposo (A) (n = 8) o linfocitos periféricos activados (B) (n = 7). Controles negativos: solamente las MBP-BC o linfocitos; controles positivos: las MBP-BC sin tratar con MMC más linfocitos. Reestimulación (C, D): los linfocitos CD4⁺ se aíslan y se reestiman con las MBP-BC del mismo donante. El eje de abscisas muestra el tratamiento previo de células CD4. El eje de ordenadas muestra la proliferación de linfocitos T. La primera columna representa solamente las BC (control negativo). Los datos representan la media $\pm$ SD y se expresan como porcentaje de valores de control positivo (BC cargadas con MBP + linfocitos = 100 %).

Fig. 2. Influencia del medio de cultivo de las MMC-BC en linfocitos T estimulados. Las BC tratadas con MMC o sin tratar se cultivan durante 72 h. Los sobrenadantes (medio acondicionado) se recogen y se usan para cultivos de linfocitos T estimulados con anticuerpo anti-CD3 con o sin BC autólogas. Los controles consistían solamente en las BC y linfocitos. Los datos representan la media $\pm$ SD y se expresan como porcentaje de valores de control positivo (BC + anti-CD3 + linfocitos = 100 %) (n = 4).

Fig. 3. Análisis del ciclo celular de linfocitos T expuestos a las MMC-BC. Los linfocitos T estimulados con anticuerpo anti-CD3 se cocultivan con las BC autólogas (A) sin tratar y (B) tratadas con MMC (25 μ g de MMC/ml). Veinticuatro horas después de complementación con BrdU 10 μ M las células se analizan mediante citometría de flujo usando un Kit de Flujo para BrdU. Los cuadrantes presentados muestran el porcentaje de células en el ciclo celular correspondiente (G0/G1, G2/M, S) así como el de las células muertas.

Fig. 4. Análisis de citometría de flujo de apoptosis después de tratamiento de las BC con MMC. Las BC se tratan con 50 μ g/ml de MMC y se etiquetan con anexina-V-FITC y 7-AAD después de 2, 6 y 24 horas de incubación. Los controles consistían en las BC sin tratar (- MMC). El cuadrante inferior y superior muestra apoptosis. Se presentan porcentajes de células apoptóticas.

Fig. 5. Efecto de las BC que presentan MBP, tratadas con MMC *in vivo*. (A) Los ratones Tg4 se inyectan i.v. con cualquiera de las MBP-BC (♦) o las MBP-BC tratadas con MMC (■). (B) Los ratones inmunizados en el experimento A con las MBP-BC tratadas con MMC (■) se someten a exposición inmune el día 28 con las BC cargadas con MBP. Los ratones inmunizados en el experimento A con las MBP-BC (♦) sirvieron como controles. La evaluación de la EAE se realizó de acuerdo con la puntuación de Coligan. Los datos se muestran como valores medidos $\pm$ ETM (n = 8 por grupo).

Fig. 6. Vacunación profiláctica frente a la EAE con las BC tratadas con MMC cargadas con MBP. (A) Los ratones Tg4 se inmunizan de forma repetitiva con las MBP-MMC-BC. En el día 0 estos ratones (■), así como los ratones no vacunados (♦), se someten a exposición inmune con las BC pulsadas con MBP. (B) Se muestra la gravedad de la EAE (puntuación de Coligan), comenzando desde el día 10 después de la exposición inmune de MBP-BC. Los datos se presentan como media $\pm$ ETM (n = 8 no vacunados, n = 10 grupo vacunado).

Fig. 7. Fenotipo de las BC tratadas con MMC. Las BC humanas tratadas con MMC (50 μ g/ml) y sin tratar se etiquetan con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con FITC o PE para la clase II de MHC, CD80, CD86, y la expresión de las moléculas se analizó mediante citometría de flujo con un FACScalibur. La unión de los anticuerpos se presenta en los histogramas: el histograma de color gris relleno representa el control de isotipo, la línea de color rojo la unión a las BC tratadas con MMC, y la línea de color azul a las BC sin tratar con MMC.

Fig. 8. PCR Cuantitativa en Tiempo Real de células dendríticas tratadas con MMC. El ARN total de las BC tratadas con MMC y sin tratar se extrajo 18 horas después del tratamiento, se transcribió de forma inversa y se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real basándose en el método de SYBR Green. Los datos se normalizan con respecto a la ARN polimerasa II. El eje de ordenadas muestra el número de veces de cambio de los niveles de la expresión de ARN ($\pm$ ETM) de las BC tratadas con MMC en comparación con los homólogos sin tratar (para cada gen n $\geq$ 5).

Fig. 9. Efecto de células sanguíneas tratadas con MMC en linfocitos CD4⁺-T *in vivo*. Los linfocitos TG4 T específicos para MBP se etiquetan con colorante CFSE y se transfieren i.v. a ratones B10.PL singeneicos. Después de 24 h, PBS (control negativo) (parte superior), células sanguíneas cargadas con MBP (control positivo) (parte media), o células sanguíneas cargadas con MBP / tratadas con MMC (parte inferior) se inyectan i.v.. Después de 4 días en total, se aíslan células de los nódulos linfáticos y se analizan para tinción con CFSE de

linfocitos F23.1⁺ (V β 8.2) CD4⁺ T. Los datos representan porcentajes medios de linfocitos T que proliferan con CFSE^{bajo} (las MBP-MMC-BC con respecto al grupo de PBS: p = 0,031; las MBP-MMC-BC con respecto al grupo de las MBP-BC: p = no significativo).

La invención se explica adicionalmente con los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos Experimentales

(a) Ratones

Los ratones B10.PL se obtuvieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ratones Tg4 transgénicos para TCR (fondo de I-A^u) expresan un TCR derivado de un clon de linfocitos CD4⁺ T encefalitogénico específico para un péptido MBP (aa 1-9) (9).

(b) Generación de células dendríticas

Las DC de murino se generan a partir de células de médula ósea de ratones B10.PL de acuerdo con el protocolo de Lutz *et al.* (10). Para activación, se añade CpG-ODN 1668 0,5 μ M. 90 min más tarde, se obtienen BMDC no adherentes. Se añade MMC (50 μ g/ml) durante 30 min de cultivo y las células (10^6 /ml) se lavan minuciosamente. El péptido Ac-ASQKRPSQRS (Ac1-10) de MBP₁₋₁₀ acetilado N-terminal se añade a una concentración de 5 μ M en combinación con CpG-ODN. Las DC humanas se generan de acuerdo con un protocolo convencional como se ha descrito anteriormente (11). Para estudios de linfocitos T específicos para MBP, se añaden 30 μ g/ml de MBP (Sigma-Aldrich) a las DC inmaduras hasta maduración. Se añade MMC (10-100 μ g/ml) al medio de cultivo de DC; después de 30 min de incubación, las células se lavan.

(c) Estudios de linfocitos T *in vitro*

Los linfocitos de murino se cultivan con las BC derivadas de BM. Los linfocitos de sangre periférica humana de pacientes con MS se coinubaban con las BC autólogas cargadas con MBP. En un experimento en paralelo, las DRB1*0301-BC de donantes sanos se cargan con MBP y se coinubaban con linfocitos CD4⁺ T específicos para MBP (clon ES-BP8T) como se ha descrito anteriormente (11). En un experimento de control, las BC se cargan con un péptido irrelevante con interacción comparable con DRB1*0301. La restricción de HLA se puede calcular con el software SYFPEITHI (www.uni-tuebingen.de/uni/kxi). Los cocultivos se realizan a una proporción de BC:linfocitos T de 1:10. La proliferación de linfocitos T se mide mediante la incorporación de [³H]timidina.

(d) Sobrenadantes de las MMC-BC

Las BC maduras se tratan con 25, 50 o 75 μ g/ml de MMC y se lavan. Después de 72 h de incubación adicional, los sobrenadantes se recogen y se usan como medio de cultivo celular en un ensayo de proliferación de linfocitos T. Se estimulan 2×10^5 células/pocillo durante 4 días con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (dilución a 1:6400).

(e) Análisis del ciclo celular

Los linfocitos se estimulan durante 2 días con anticuerpo monoclonal anti-CD3 y el análisis del ciclo celular se realiza usando el Kit de Flujo de BrdU (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Las células (10^6) se incuban durante la noche con BrdU 10 μ M. Después de fijación, permeabilización y tratamiento con 300 μ g/ml de DNasa, las células se tiñen con anticuerpo anti-BrdU etiquetado con FITC y 7-AAD y se analizan mediante citometría de flujo.

(f) Modelo de EAE

La EAE se induce mediante inyección i.v. de 5×10^6 BC activadas (en 0,2 ml) pulsadas con 5 μ M de péptido MBP autoantigénico (+/- MMC). En el día 1 y 2 después de la inmunización, cada ratón se inyecta i.p. con 200 ng de toxina Pertussis (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) en 50 μ l de DPBS. Los síntomas se evalúan diariamente de acuerdo con la puntuación de Coligan.

(g) Micromatriz de Affymetrix

El ARN se convierte en ds-cADN usando cebadores de T7-(dT)₂₄ y el sistema Superscript Choice (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El ARNc etiquetado con biotina se genera a partir de la muestra de ADNc, se hibrida con chips genéticos de U133 Plus 2.0 (Affymetrix, High Wycombe, UK), se tiñe con estreptavidina-ficoeritrina (MoBiTec, Göttingen Alemania) y se escanea usando el Escáner GeneArray (Affymetrix). Los datos de micromatriz de muestras derivadas de 3 donantes de BC sin relacionar se analizan usando la herramienta de Minería de Datos de Affymetrix (DMT 4.0), la herramienta de publicación de Affymetrix (MDB 3.0), y el software de análisis de datos estadísticos (Affymetrix Microarray Suite 5.0). Se realizan comparaciones entre las BC tratadas con MMC y sin tratar para genes con una llamada de detección positiva en al menos un grupo experimental y con un número de veces de cambio de

al menos 3 (que corresponde a una proporción log de la señal entre los dos grupos experimentales inferior a -1,5 o superior a 1,5). Se asignan clasificaciones funcionales del Consorcio de Ontología Genética (GO) (<http://www.geneontology.org>) a cada gen identificado.

(h) *Análisis de FACS*

Las BC humanas se tiñen con anexina V etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 7-amino-actinomicina (7-AAD) para confirmar la muerte celular apoptótica.

La tinción de BC se realiza con anticuerpos monoclonales etiquetados con fluorescencia (FITC, PE) (para MHC II, CD80, CD86,) hasta concentraciones indicadas por los fabricantes (BD Biosciences).

(i) *Aprobación para estudios en animales y seres humanos*

los experimentos en animales se aprueban en el Animal Welfare Board del Governmental Office Karlsruhe. Los estudios de sueros y células de seres humanos se aprueban en la University of Heidelberg Ethics Committee.

(k) *Estadísticas*

Los resultados se muestran como media $\pm$ SD o ETM según se indique. Los valores individuales de la proliferación de linfocitos T representan la incorporación media de [3 H]timidina (cpm) de cultivos por triplicado y se proporcionan en porcentaje del control positivo (= 100 % de proliferación) o cpm. Los valores de P se calculan con el ensayo de t de Student sin emparejar usando el software SigmaStat (SPSS). La significancia estadística se establece en $p < 0,05$.

EJEMPLO 2: RESULTADOS

Se ha propuesto que los linfocitos T específicos de mielina desempeñan un papel en la patogénesis de la MS (1, 4). Por lo tanto, la MBP representa un antígeno candidato para inmunoterapia específica en MS. En los siguientes experimentos, los inventores estudiaron la capacidad de las MMC-BC cargadas con MBP para controlar la actividad de los linfocitos T específicos derivados de pacientes con MS en cultivos celulares, y los inventores sometieron a ensayo su acción en un modelo de EAE en ratón.

(a) *Las MMC-BC cargadas con proteína básica de mielina inhiben linfocitos T específicos de pacientes con esclerosis múltiple in vitro*

Las BC derivadas de pacientes con MS se cargan con MBP y se coincuban con linfocitos T autólogos. En un experimento en paralelo, las BC se cargan con MBP y se tratan con MMC. Mientras que las BC sin tratar inducen una fuerte estimulación de los linfocitos T, las MMC-BC no lo hacen (Fig. 1A).

La terapia de pacientes con MS activa se debería dirigir a los linfocitos T autorreactivos ya activados. Para descubrir si estos linfocitos se pueden controlar mediante las BC inhibitorias, algunos linfocitos T específicos para MBP activados previamente derivados de un paciente con MS se incuban con las MMC-BC cargadas con MBP, emparejadas con HLA-DR. La respuesta de estos linfocitos T se redujo de forma significativa (Fig. 1B).

En el siguiente experimento, los inventores investigaron si los linfocitos T suprimidos se podían volver a estimular con las BC cargadas con MBP sin tratamiento previo del mismo donante. Los resultados muestran que, una vez que se suprimen con las MMC-BC, los linfocitos T no se pueden reactivar o solamente se pueden reactivar débilmente (Fig. 1C, Fig. 1D).

(b) *Los sobrenadantes de las BC tratadas con mitomicina no inhiben los linfocitos T*

Después del tratamiento de las BC con MMC, una cierta cantidad de sustancia se podría haber difundido desde el compartimento intracelular en el medio de cultivo y bloquear la proliferación de linfocitos T. Con el fin de excluir eso, los sobrenadantes de las células BC tratadas con MMC se recogen y se usan como medio en ensayos de proliferación de linfocitos T. Los resultados mostraron que la proliferación de linfocitos T no se ve afectada (Fig. 2), lo que indica que la pérdida de MMC a partir de células tratadas no es la razón de la supresión.

(c) *Los linfocitos T se bloquean en la fase G0/G1*

Cuando se analiza el mecanismo de supresión, se deben considerar dos aspectos: la reacción de los linfocitos T hacia las BC inhibitorias y los cambios moleculares de las BC inducidos por el tratamiento con MMC.

Como se ha mostrado el experimento anterior, la reestimulación de los linfocitos T suprimidos no es posible o solamente lo es parcialmente, lo que indica que las células llegan a ser arreactivas o mueren. El análisis del ciclo celular reveló una acumulación significativa en la fase G0/G1 de los linfocitos T coincubados con las MMC-BC (Fig. 3). Este hallazgo argumenta la inducción de la arreactividad de los linfocitos T.

(d) La mitomicina C no inhibe la expresión de MHC-II y CD80/86 en las BC

La MMC podría haber cambiado la expresión de MHC II o CD80/86. El análisis de FACS mostró que MHC II y CD80/86 no están regulados de forma negativa después de incubación con MMC (canal medio de las BC tratadas con MMC/sin tratar: MHC II = 757/745; CD80 = 759/728; CD86 = 751/744); por lo tanto, la disminución de la presentación del antígeno con una densidad menor de MHC II, o menos coestimulación mediante la expresión de C80/CD86 menor, no puede servir como una explicación para la proliferación de linfocitos T inhibidos.

(e) La mitomicina C modula la expresión de genes apoptóticos e inmunorreguladores de las BC

Un barrido genético completo de 47.000 transcritos y variantes adicionales se realizó mediante análisis de micromatriz de Affymetrix. Se analizaron adicionalmente genes cuya expresión cambió más de 3 veces después del tratamiento de las BC con MMC en 3 experimentos independientes. Basándose en este criterio, se identifican 116 genes. Entre los genes afectados, se encuentran dos grupos principales: uno implicado en la apoptosis y el otro que media la inmunosupresión. Entre los genes relacionados con la apoptosis, 6 genes proapoptóticos se regulan de forma positiva (LRDD, TNFRSF 10b, PERP, FDXR, TRAF4, DDIT3) y 5 genes antiapoptóticos se regulan de forma negativa (NRG2, CFLAR, I-FLICE, Usurpin, FLAME-1), lo que apunta a la inducción de la muerte celular mediante apoptosis. Se ha especulado que las células apoptóticas son tolerogénicas (12, 13). Por lo tanto, era importante verificar mediante FACS si el cambio de expresión de estos genes tenía repercusiones en la viabilidad celular. Como se muestra en la Fig. 4, las BC tratadas con MMC entran en apoptosis antes que las BC sin tratar. De forma interesante, en paralelo a los genes apoptóticos, algunos genes inmunosupresores bien conocidos (ADM, TSC22D3, LILRB4) (14-16) se regulan de forma positiva junto con una serie de genes potencialmente inhibidores (MAFB, CSF2RA, MAP4K4, GAB2) (17-21). Tomados en conjunto, estos hallazgos indican inducción de la apoptosis y aumento de la expresión de genes inmunosupresores en las BC tratadas con MMC.

(f) Las MMC-BC cargadas con proteína básica de mielina inhiben los linfocitos T específicos de ratón in vitro

Los inventores abordaron la cuestión de si el efecto supresor mediado por las MMC-BC *in vitro* también funcionaba *in vivo*. Para aclarar este punto, se elige un modelo de EAE de ratón - un contexto en el que los linfocitos T específicos de MBP provocan una enfermedad inflamatoria, similar a la inflamación de MS en seres humanos. Un requisito previo para su eficacia *in vivo* es que, del mismo modo a las BC humanas, las BC de ratón tratadas con MMC son supresoras de linfocitos T *in vitro*. Algunos estudios en cultivo celular mostraban que las BC de ratón cargadas con MBP y tratadas con MMC suprimían de forma significativa los linfocitos T singeneicos específicos de los ratones Tg4 (MBP-MMC-BC + linfocitos T = 12.653 ± 923 con respecto a MBP-BC + linfocitos T = 24.727 ± 3197 ; BC sin tratamiento previo + linfocitos T = 7007 ± 1591) (media de cpm $\pm$ ETM) ($p = 0,022$).

Las observaciones previas de Liu *et al.* (13) mostraban que, cuando se inyectan en ratones, algunas células tolerogénicas cargadas con antígeno conducen primero a los linfocitos T específicos de antígeno en el ciclo celular, y posteriormente los linfocitos T se inactivan. Este hallazgo llevó a los inventores a trazar el destino de los linfocitos T autorreactivos perjudiciales en animales tratados con las BC inhibitorias. Los linfocitos T específicos de MBP se marcan *ex vivo* con CFSE y se inyectan en ratones singeneicos. A partir de ese momento, los animales se inyectan i.v. con las BC cargadas con MBP tratadas con MMC, y los linfocitos T se aíslan y se analizan con FACS. Los linfocitos específicos T de MBP presentaban un grado de proliferación significativo (MBP-MMC-BC = 25 % con respecto a MBP-BC = 22 %). Evidentemente, a pesar de la estimulación inicial, los linfocitos T se deben haber inactivado posteriormente porque, como se muestra en el siguiente experimento *in vivo*, no son capaces de provocar la EAE. Este hallazgo está en línea con la observación que se describe en Liu *et al.* (13).

(g) La vacunación con las MMC-BC cargadas con proteína básica de mielina protege a los ratones de la encefalitis autoinmune experimental

Las BC sin tratar cargadas con MBP se inyectan en animales y, como se esperaba, se produce una EAE grave en 2-3 semanas (Fig. 5A). Sin embargo, si las BC cargadas con MBP se tratan previamente con MMC y a continuación se inyectan, los animales permanecen totalmente libres de síntomas, lo que muestra que los linfocitos T específicos de MBP no se activan. Una cuestión interesante es si los animales libres de síntomas llegaban a ser resistentes a la EAE. Con este fin, los animales tratados se vuelven someter a exposición inmune con las MBP-BC. Se debe tener en cuenta que los ratones Tg4 transgénicos usados en el estudio de los inventores portan > 90 % de linfocitos T específicos de MBP, como contraste con solamente < 0,0001 % en roedores normales (9, 22). Los inventores sospechan que podría ser difícil inactivar un número tan grande de linfocitos T solamente con una inyección. Por lo tanto, en un experimento posterior, los animales se tratan 5x con las MBP-MMC-BC y a continuación se vuelven a someter a exposición inmune (Fig. 6A). Como se muestra en la Fig. 6B, en esta ocasión el resultado es positivo: mientras que los controles, que no se habían vacunado con las MBP-MMC-BC, desarrollaban EAE grave con resultado letal, los ratones vacunados previamente se recuperaban después de un episodio leve de la enfermedad.

EJEMPLO 3: DISCUSIÓN

Recientemente se han descrito intentos para generar células sanguíneas reguladoras, en particular células dendríticas (DC) para el control de reacciones autoinmunes. El grupo de Enk generaba las DC supresoras mediante la incubación de las células *in vitro* con IL-10 e inhibía las respuestas de los linfocitos CD4 T específicos de ovoalbúmina en ratones sin tratamiento previo y sensibilizados (23). Huang *et al.* (24) observaron que una subpoblación de las DC derivadas de médula ósea inmaduras, usaban con MBP y se inyectaban en ratas singeneicas, se protegían de la EAE clínica. Otros mostraban que, al contrario, las DC maduras pero no las inmaduras inyectadas en ratones con EAE reducían la gravedad de los signos clínicos e inflamación en el SNC (25). Estos hallazgos contradictorios hacen énfasis en la plasticidad funcional, desde la inmunoestimulación a la supresión, de las DC en diversas condiciones. Los signos clínicos de enfermedad también se podrían reducir si las ratas o ratones con EAE incipiente se inyectan con las DC tratadas con interferón- γ (26). En ninguno de los dos últimos estudios se usan las DC específicas de antígeno. Por el contrario, Menges *et al.* (27) usaron las DC pulsadas maduras con factor α de necrosis tumoral competido autoantigénico y observaron protección de la EAE si los ratones se inyectan antes de inducir la inmunización. Otro estudio experimental sugiere que la inhibición de NF- κ B mediante agentes farmacológicos aumentaba la capacidad de las DC inmaduras para inducir supresión específica de antígeno a autoantígenos en ratones (28). Cuando las DC se transducen con el gen para supresión de la señalización de citoquina (SOCS)-3, estas presentaban un fenotipo DC2 que estimulaba la diferenciación de las células Th2 e influenciará débilmente las reacciones autoinmunes *in vivo* (29). La gravedad de la EAE en ratones también se podría reducir con las DC cargadas con autoantígeno que expresan los transgenes TRAIL o PDL1 (30).

Diferentes comportamientos funcionales de las DC que pertenecen a la misma etapa de maduración (5, 6), la dificultad para estandarizar la generación de las DC supresoras mediante agentes biológicos, y las modificaciones reversibles inducidas por citoquinas u otros agentes biológicos, todos son obstáculos para el uso de las DC supresoras en ensayos clínicos, lo que implica el riesgo de estimulación en lugar de inhibición de la respuesta inmune. Idealmente, las DC inhibitorias para aplicación clínica se deberían generar con facilidad y de manera reproducible, ser estables en su acción supresora, y ser capaces de inactivar irreversiblemente los linfocitos T autorreactivos.

Basándose en la experiencia previa de los inventores en ratas (8), en la que el rechazo del aloinjerto se controló con éxito mediante las MMC-BC, las DC inhibitorias de forma estable para control de la autoinmunidad se generan en el presente estudio mediante tratamiento de las células con MMC y cargando con autoantígeno. Estas células protegían a los animales de la EAE letal, mostrando que, en principio, es posible una vacunación profiláctica eficaz frente a la autoagresión mediada por linfocitos. MMC es un agente de alquilación usado en terapia para el cáncer que se une fuertemente a distintos sitios del ADN, une de forma cruzada las hebras de la doble hélice, inhibe la síntesis del ADN, y en consecuencia suprime la proliferación celular. Además, MMC inhibe el ARN y la síntesis de proteínas. De forma interesante, algunos agentes de alquilación no solamente inhiben sino que también activan algunas rutas normalmente accionadas por agentes estimulantes (31). Por lo tanto, no es sorprendente que en el modelo de los inventores, la expresión de ciertos genes de DC estuviera regulada de forma positiva y no de forma negativa. Debido a la interacción irreversible de MMC con compuestos intracelulares, algunas células no liberan MMC después de incubación con esta sustancia. Esto se confirmó con el hallazgo de los inventores de que los sobrenadantes de las DC tratadas con MMC no suprimen reacciones de los linfocitos T. Lo más importante, al contrario que las manipulaciones de las DC con agentes biológicos (por ejemplo citoquinas), el tratamiento con MMC induce de forma irreversible las DC supresoras mediante inducción de apoptosis, una característica que ofrece un potencial de desarrollo de una herramienta terapéutica estable. Otra ventaja de este modelo es el uso de dosis no tóxicas de un fármaco clínicamente aprobado. La dosis terapéutica de MMC es de 10-20 mg/m², la concentración de MMC usada en este estudio para incubación de las células fue de 0,05-0,100 mg/ml. Los análisis de los inventores mostraron que después de un lavado minucioso, la suspensión celular contenía, en todo caso, trazas no activas de MMC. No se esperan efectos secundarios clínicos a estas cantidades mínimas de MMC libre en la solución inyectada.

Los hallazgos de los inventores demuestran que las MMC-BC son eficaces para controlar linfocitos T autorreactivos tanto de ratón como del ser humano. Algunos estudios previos en el laboratorio de los inventores mostraron que las MMC-BC son fuertemente inhibitorias en ratas (8). A diferencia con otros modelos, la herramienta terapéutica que se describe en el presente documento funciona entre especies. Además, en el presente estudio, el efecto *in vivo* se sometió a ensayo en condiciones agravantes. Los proveedores normales portan menos de 10⁻⁶ linfocitos T reactivos para MBP en su repertorio (22). Los inventores usaron ratones transgénicos TG4 con > 90 % de linfocitos T reactivos para MBP y en consecuencia con una tendencia extrema hacia la EAE (9). Si este número muy elevado de linfocitos T "peligrosos" se pueden mantener bajo control, los inventores pueden esperar un efecto fiable cuando están implicados bajos números de linfocitos T autorreactivos.

con respecto al mecanismo de supresión de los linfocitos T autorreactivos derivados de pacientes con MS, los inventores estaban preocupados con que las MMC-BC simplemente podrían "perder" su capacidad estimulada debido a la muerte celular. Los hallazgos de los inventores, sin embargo, muestran que los linfocitos T suprimidos no se pueden reactivar. Además, algunos animales vacunados con las DC inhibitorias cargadas con autoantígeno

llegan a ser arreactivas para reestimulación con el mismo antígeno. Estos son signos de suspensión activa en lugar de una falta de respuesta inmune.

Un estudio previo mostró que la exposición a células tumorales necróticas, al contrario que la exposición a células apoptóticas, induce la inmuoestimulación (12). Esto, así como otras observaciones (13), condujo a la hipótesis de que la muerte celular necrótica es inmunogénica, mientras que la muerte celular apoptótica es escasamente inmunogénica o incluso tolerogénica. Desde un punto de vista fisiológico esto tiene sentido, porque la apoptosis es el proceso normal de la muerte celular en nuestros tejidos. Si la apoptosis indujera respuestas inmunes, esto conduciría a inflamación y autoinmunidad. Liu *et al.* (13) usaron este fenómeno para inducir tolerancia de forma activa. Los esplenocitos apoptóticos en fase de muerte se cargan con ovoalbúmina y se inyectan en ratones singeneicos. Después de una fase inicial de estimulación de linfocitos T, los receptores llegaron a ser tolerantes a la ovoalbúmina (13). Es interesante indicar que los informes muestran que la esperanza de vida de DC tiene consecuencias importantes para la interacción de DC-linfocitos T, y de este modo determina el resultado inmunológico. Hugues *et al.* concluyeron que las interacciones estables favorecen el cebado de linfocitos T, mientras que breves contactos entre las DC y linfocitos T pueden contribuir a la inducción de tolerancia de linfocitos T (32). En la presente serie de experimentos, MMC aceleraba el proceso natural de la apoptosis, acortando la esperanza de vida de las DC inyectadas y por lo tanto su contacto con los linfocitos T. Esto proporciona una posible explicación para el efecto tolerogénico observado. Obeid *et al.* (33) analizaron recientemente el potencial inmunogénico de células tumorales convertidas en apoptóticas mediante diversos fármacos quimioterapéuticos y observaron que las antraciclinas generan células estimuladoras mientras que otros fármacos, tales como la mitomicina C, no lo hacen. Si se usan antraciclinas, la proteína de chaperón, calreticulina, estaba regulada de forma positiva y era responsable de la acción estimuladora. Este hallazgo es importante para terapia tumoral, que se dirige a la eliminación de células malignas y a la estimulación de forma simultánea de la respuesta inmune frente al tumor. Los hallazgos de los inventores son interesantes en este contexto al demostrar que el tratamiento con MMC convierta a las células en apoptóticas pero - como se muestra mediante micromatriz de Affymetrix - no regula de forma positiva la calreticulina; en su lugar, regula de forma positiva algunas moléculas inmunosupresoras. Aunque la observación de Obeid *et al.* (33) se puede usar para mejorar la terapia en cáncer, la observación de los inventores tiene un potencial terapéutico para controlar enfermedad autoinmune o rechazo al injerto.

En el presente estudio, la regulación positiva de genes proapoptóticos, incluyendo LRDD (que codifica PIDD), TNFRSF10b (que codifica TRAIL-R2), PERP, FDXR, TRAF4, y DDIT3 sugería la inducción de apoptosis. Adicionalmente, los inventores observaron regulación negativa de genes que protegen de la apoptosis, tales como NRG2 y CFLAR (que codifica cFLIP y sus variantes I-FLICE, usurpina, FLAME-1). De la forma más importante, la apoptosis de las DC tratadas con MMC se demostró con FACS.

El análisis de expresión genética mostraba que, de forma simultánea a la inducción de la apoptosis, una serie de genes fuertemente inmunosupresores se regulan de forma positiva. La ADM (adrenomedulina), cuya expresión aumentó 10 veces, es un péptido que previene la mortalidad inducida por sepsis, anula la colitis, y proporciona una terapia altamente eficaz para la artritis mediante la disminución de la presencia de células Th1 autorreactivas, induciendo la regulación de los linfocitos T e inhibiendo las respuestas autoinmunes e inflamatorias (14). Otro gen cuya expresión estaba regulada de forma positiva por MMC era TSC22D3 (que codifica GILZ). De forma interesante, el mismo gen está regulado de forma positiva después de la exposición de las DC a glucocorticoides, IL-10, o TGF- β , todos inhibidores inmunológicos bien conocidos (15). GILZ confiere un fenotipo supresor a las DC y las previene de la activación de los linfocitos T (15). Una molécula inducida por GILZ es LILRB4 (que codifica ILT3), una proteína que hace que los monocitos y las DC se hagan tolerogénicos y tiene importancia clínica (16). Algunos receptores humanos de trasplante de corazón con injertos estables tienen linfocitos T supresores en circulación que regulan de forma positiva ILT3 en células de presentación de antígeno al donante (16). Estos hallazgos demuestran una función inmunorreguladora importante de ILT3. Los inventores encontraron un aumento significativo de la expresión de ILT3 en las MMC-BC. Otros genes funcionalmente importantes cuya expresión estaba modulada por MMC son MAFB - que dirigen la diferenciación más allá de las DC hacia los monocitos (17), CSF2RA - que transduce señales de GM-CSF (18), MAP4K4 - que media la señalización y la migración celular de TNF- α (19, 20), y GAB2 - que transmite señales repartidas por receptores de citoquina, factor de crecimiento, y antígeno (21). Todos ellos podrían desempeñar un papel en la inmunosupresión inducida por las DC tratadas con MMC.

Tomadas en conjunto, las observaciones de Obeid *et al.* (33) y las de los inventores sugieren que la inducción de la apoptosis con regulación positiva simultánea de moléculas activadoras convierte a las células en inmunogénicas, mientras que la apoptosis y la regulación positiva de las moléculas inhibidoras convierte a las células en inmunosupresoras.

En la década de 1970, un copolímero de aminoácidos aleatorio, denominado acetato de glatiramer, se desarrolló para imitar la composición de MBP. En ensayos clínicos, el glatiramer reducía la evolución de la discapacidad y reducía de forma significativa la tasa de recaída de MS (34). Algunos estudios mostraban que el copolímero se toleraba frente a una diversidad de antígenos de mielina diferentes. Más recientemente, algunos ligandos científicos de MBP alterados y otros autoantígenos formados por sustitución de aminoácidos en los sitios de contacto de estos epítipo con el receptor de linfocitos T mostraban efectos similares en modelos animales (4). Estas y otras observaciones (35) indican que el uso de un solo epítipo puede inhibir una enfermedad causada por la reactividad

hacia múltiples autoepítopos al dirigirlos algunos mecanismos reguladores no específicos hacia un cierto órgano. Aparentemente, al contrario que la "propagación" del epítipo, también es posible la "contención" del epítipo. Basándose en estas observaciones, se puede concebir que las MMC-BC cargadas con MBP, aunque dirigiendo la respuesta inmune a un antígeno, también pueden controlar algunas reacciones para moléculas vecinas. Una variante elegante del modelo de los inventores sería la carga de las DC inhibitorias con acetato de glatiramer u otros péptidos alterados derivados de autoantígenos. Sería de esperar que la acción supresora de los péptidos se amplificara.

Los datos *in vivo* de los inventores se derivan de estudios en el modelo de EAE de murino. Se ha cuestionado hasta que punto este modelo refleja la patogénesis de la MS en seres humanos (1). Por supuesto, ningún dato en ratón, incluyendo los derivados a partir de estudios de EAE, se puede extrapolar de forma automática a seres humanos. Merece la pena mencionar, sin embargo, que a pesar de todas las críticas, los 3 compuestos terapéuticos 3 aprobados para uso en MS - acetato de glatiramer, mitoxantrona y natalizumab - aparecieron directamente a partir de hallazgos en el modelo de EAE (36). Las observaciones de los inventores en ratones ganan relevancia adicional con el hallazgo de que los linfocitos T de los pacientes con MS también se suprimen con las MMC-BC cargadas con MBP.

Referencias

1. Hemmer B, Archelos J-J, Hartung H-P (2002) *Nat Rev Neurosci* 3:291-301.
2. Kamphuis S, Albani S, Prakken B-J (2006) *Expert Opin Biol Ther* 6:579-589.
3. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen I-R (2001) *The Lancet* 358:1749-1753.
4. Steinman L (2004) *Science* 305:212-216.
5. Steinman R-M, Hawiger D, Nussenzweig M-C (2003) *Ann Rev Immunol* 21:685-711.
6. Rutella S, Danese S, Leone G (2006) *Blood* 108:1435-1440.
7. Xiao B, Huang Y, Link H (2006) *J Immunother* 29:465-471.
8. Jiga L, Ehser S, Kleist C, Opelz G, Terness P (2007) *Transplantation* 83:347-350.
9. Wraith D-C, McDevitt H-O, Steinman L, Acha-Orbea H (1989) *Cell* 57:709-715.
10. Lutz M-B, Kukutsch N, Ogilvie A-L-J, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G (1999) *J Immunol Methods* 223:77-92.
11. Terness P, Chuang J-J, Bauer T, Jiga L, Opelz G (2005) *Blood* 105:2480-2486.
12. Sauter B, Albert M-L, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N (2000) *J Exp Med* 191:423-434.
13. Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman R-M (2002) *J Exp Med* 196:1091-1097.
14. Varela N, Chorny A, Gonzalez-Rey E, Delgado M (2007) *Expert Opin Biol Ther* 7:461-78
15. Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot M-C, Pal-lardy M, Godot V, Capel F, Balian A, Naveau S, Galanaud P *et al.*, (2006) *Blood* 107:2037-2044.
16. Chang C-C, Ciubotariu R, Manavalan J-S, Yuan J, Colovai A-I, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R *et al.*, (2002) *Nat Immunol* 3:237-243.
17. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer U-P, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, Sieweke M-H (2005) *Blood* 105:2707-2716.
18. Crosier K, Wong G, Mathey-Prevot B, Nathan D, Sieff C (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7744-7748.
19. Yao Z, Zhou G, Wang X-S, Brown A, Diener K, Gan H, Tan T-H (1999) *J Biol Chem* 274:2118-2125.
20. Collins C, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K, Schultz P, Hampton G (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3775-3780.
21. Nishida K, Yoshida Y, Itoh M, Fukada T, Ohtani T, Shirogane T, Atsumi T, Takahashi-Tezuka M, Ishi-hara K, Hibi M *et al.*, (1999) *Blood* 93:1809-1816.

22. Sun D, Whitaker J, Wilson D (1999) *Int Immunol* 11:307-315.
- 5 23. Müller G, Müller A, Tüting T, Steinbrink K, Saloga J, Szalma C, Knop J, Enk A-H (2002) *J Invest Der-matol* 119:836-841.
24. Huang Y-M, Yang J-S, Xu L-Y, Link H, Xiao B-G (2000) *Clin Exp Immunol* 122:437-444.
- 10 25. Zhang G, Kishi M, Xu H, Rostami A (2002) *Multiple Sclerosis* 8:463-468.
26. Xiao B-G, Wu X-C, Yang J-S, Xu L-Y, Liu X, Huang Y-M, Bjelke B, Link H (2004) *Int Immunol* 16:13-22.
- 15 27. Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch N-A, Bogdan C, Erb K, Schuler G, Lutz M-B 2002 *J Exp Med* 195:15-22.
28. Iruretagoyena M-I, Sepulveda S-E, Lezana J-P, Hermoso M, Bronfman M, Gutierrez M-A, Jacobelli S-H, Kalergis A-M (2006) *J Pharmacol Exp Ther* 318:59-67.
- 20 29. Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang G-X (2006) *J Immunol* 177:1679-1688.
30. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y (2005) *J Immunol* 174:1888-1897.
31. Liu Z-G, Baskaran R, Lea-Chou E-T, Wood L-D, Chen Y, Karin M, Wang J-Y-J (1996) *Nature* 384:273-276.
- 25 32. Hugues S, Fetter L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S (2004) *Nat Immunol* 5:1235-1242.
33. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia G-M, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Pan-aretakis T, Casares N *et al.*, (2007) *Nat Med* 13:54-61.
- 30 34. Johnson K, Brooks B, Cohen J, Ford C, Goldstein J, Lisak R, Myers L-W, Panitch H, Rose J, Schiffer R (1995) *Neurology* 45:1268-1276.
- 35 35. Lo J, Clare-Salzler M-J (2006) *Autoimmun Rev* 5:419-423.
36. Steinman L, Zamvil S (2006) *Ann Neurol* 60:12-21.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, rechazo de injerto de órgano o enfermedad del injerto frente al huésped en un paciente, comprendiendo dicha composición sangre completa aislada o Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) tratada
5
(i) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, o
(ii) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico y un autoantígeno;
10 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en mitomicina C, ceramida C2, tunicamicina, micofenolato mofetilo, metabolitos de triptófano y derivados semisintéticos del mismo, e inhibidores del proteasoma o una combinación de
15 dos o más agentes.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente quimioterapéutico es mitomicina C.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el autoantígeno se selecciona entre el grupo que consiste en antígenos naturales, péptidos sintéticos y péptidos naturales.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el autoantígeno es un péptido sintético de la proteína básica de mielina, preferentemente copaxone.
25
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la enfermedad inflamatoria es una
30 enfermedad autoinmune.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las PBMC comprenden monocitos y linfocitos.
- 35 9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad es rechazo de injerto de órgano o enfermedad del injerto frente al huésped y las células sanguíneas se tratan solamente con un agente quimioterapéutico.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el agente
40 quimioterapéutico es mitomicina C.
11. El uso de una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 45 12. El uso de una composición farmacéutica como se define mediante cualquiera de las reivindicaciones 1, 10 u 11 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
13. Un método de producción de células sanguíneas completas o PBMC inmunosupresoras, que comprende exponer una muestra de sangre completa o PBMC aislada *in vitro* (i) a un agente quimioterapéutico o (ii) a un agente
50 quimioterapéutico y un autoantígeno.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la muestra de sangre completa o PBMC se trata en primer lugar con el autoantígeno y posteriormente con el agente quimioterapéutico.

FIGURA 1

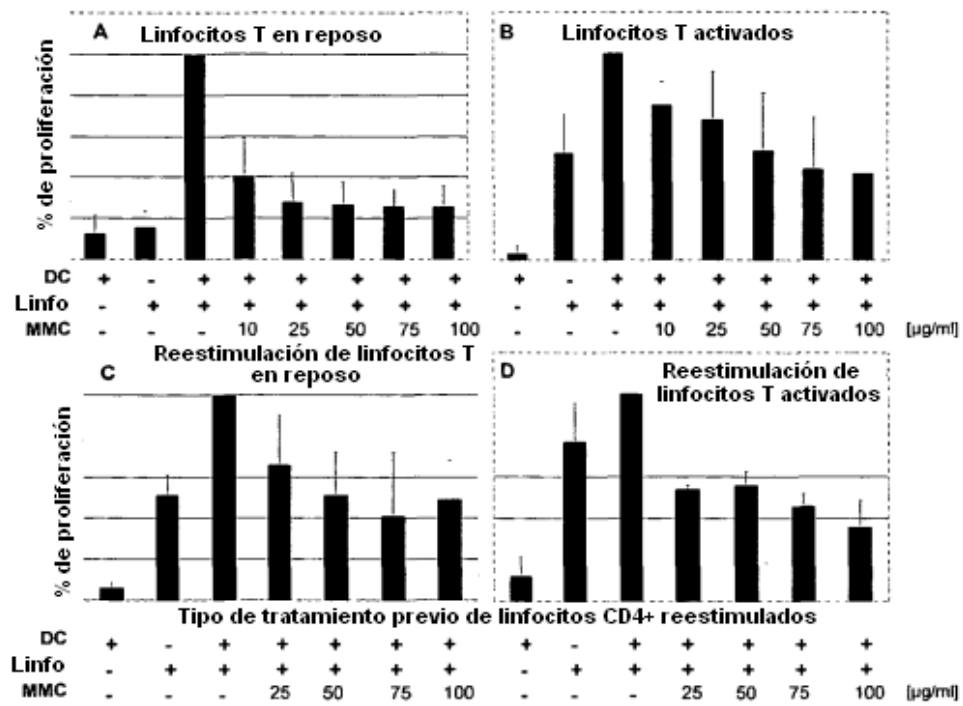
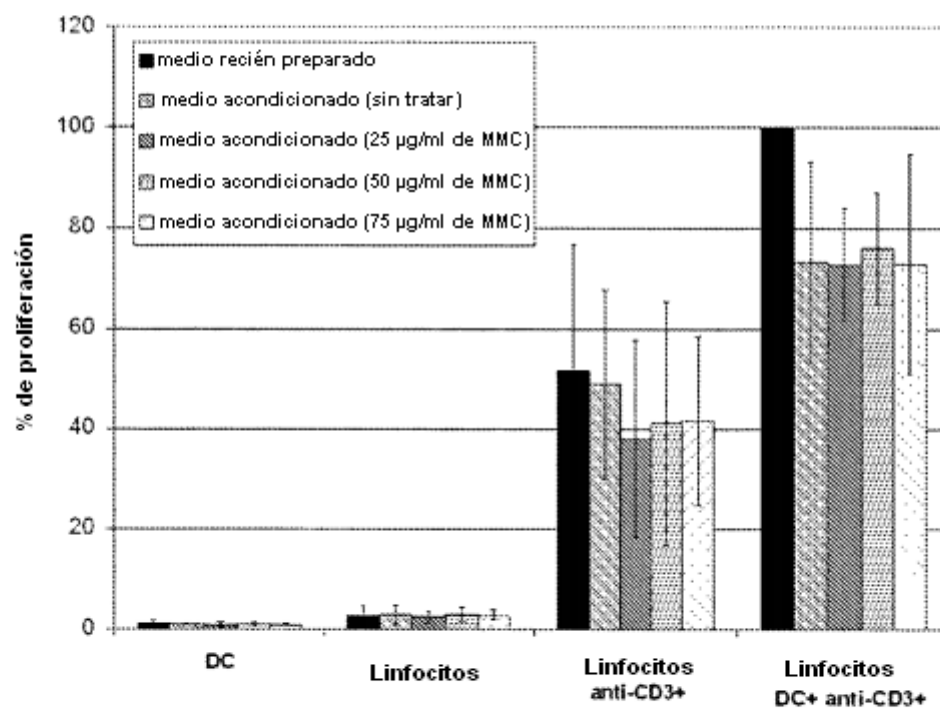
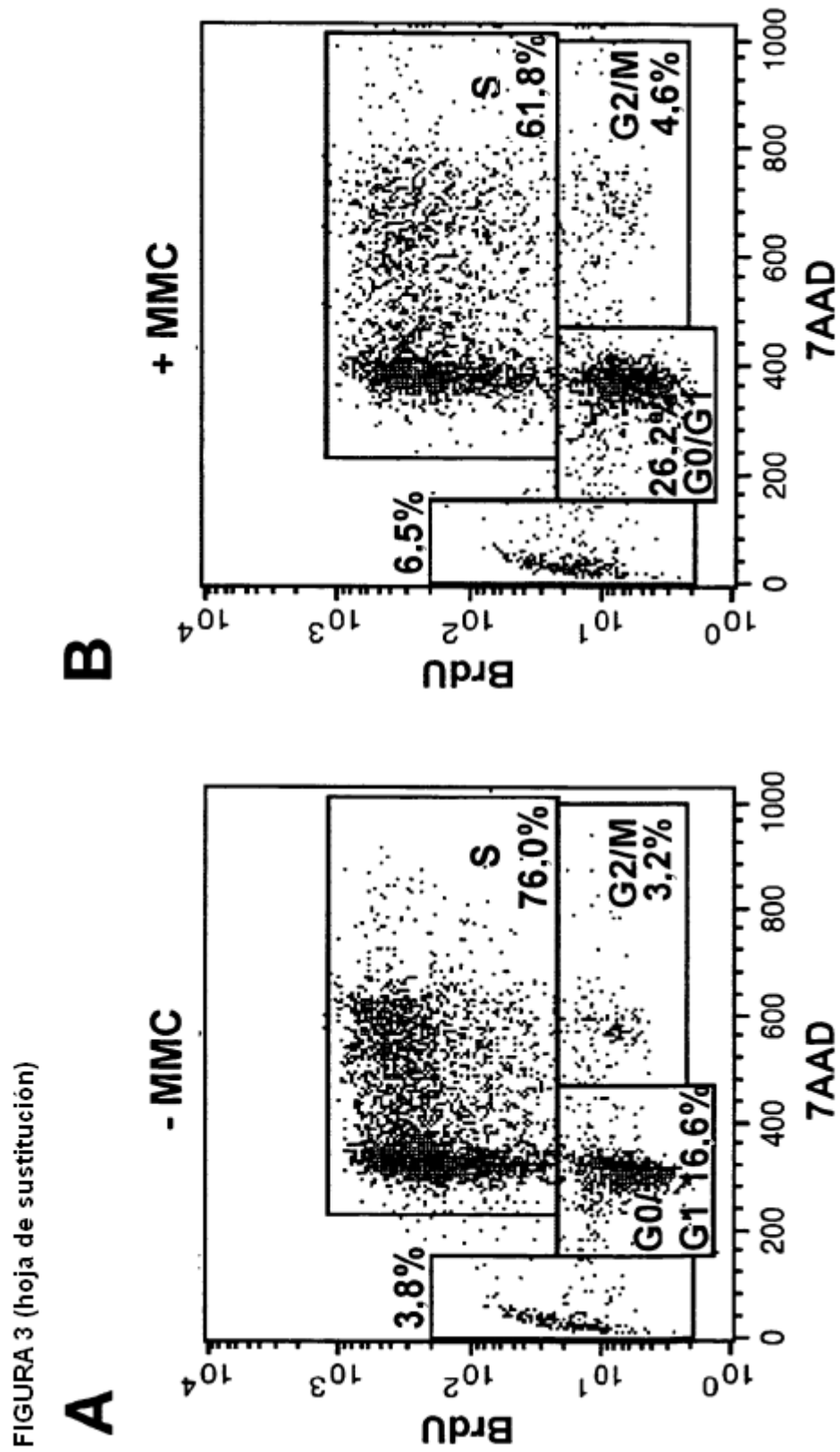


FIGURA 2



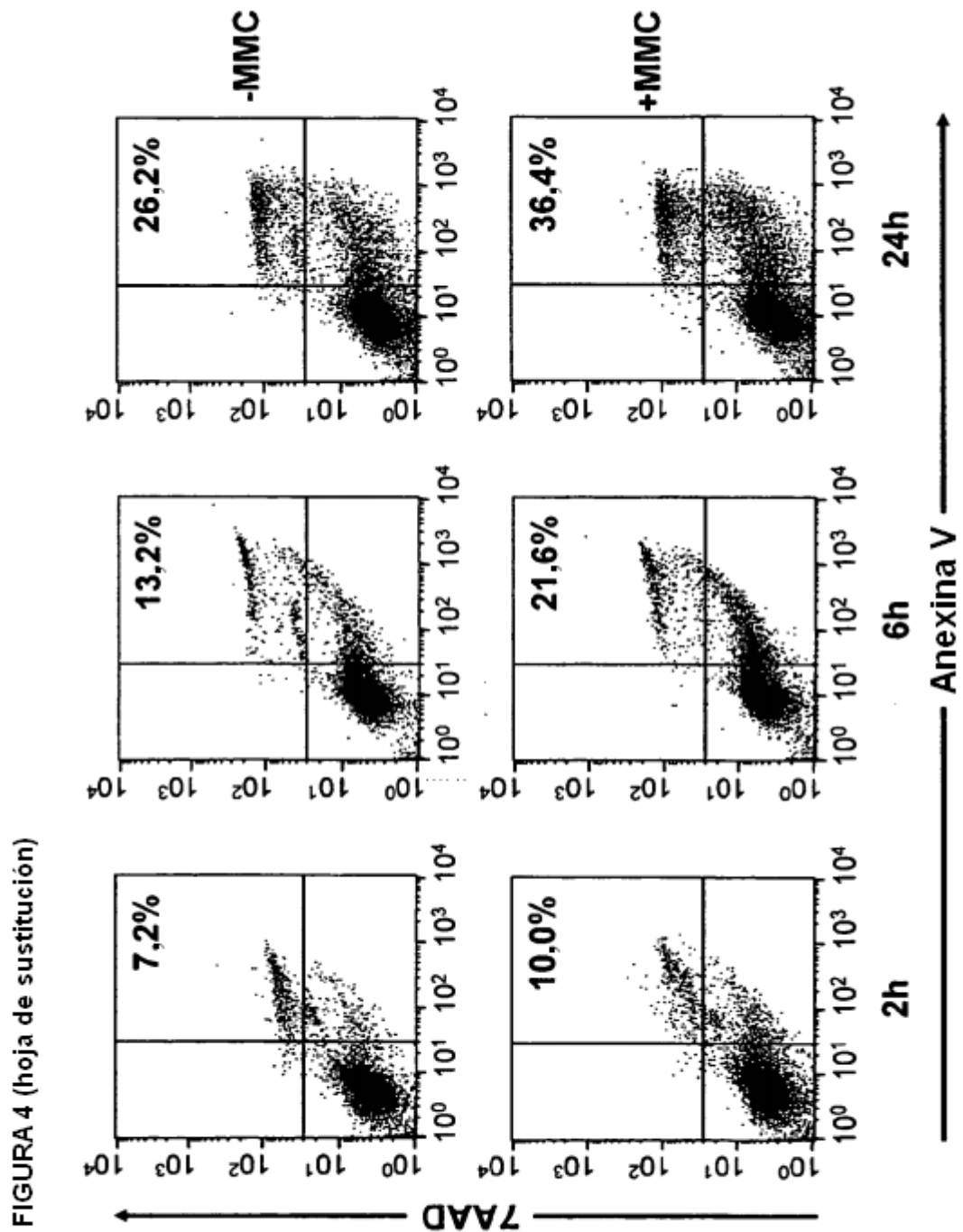


FIGURA 5 (hoja de sustitución)

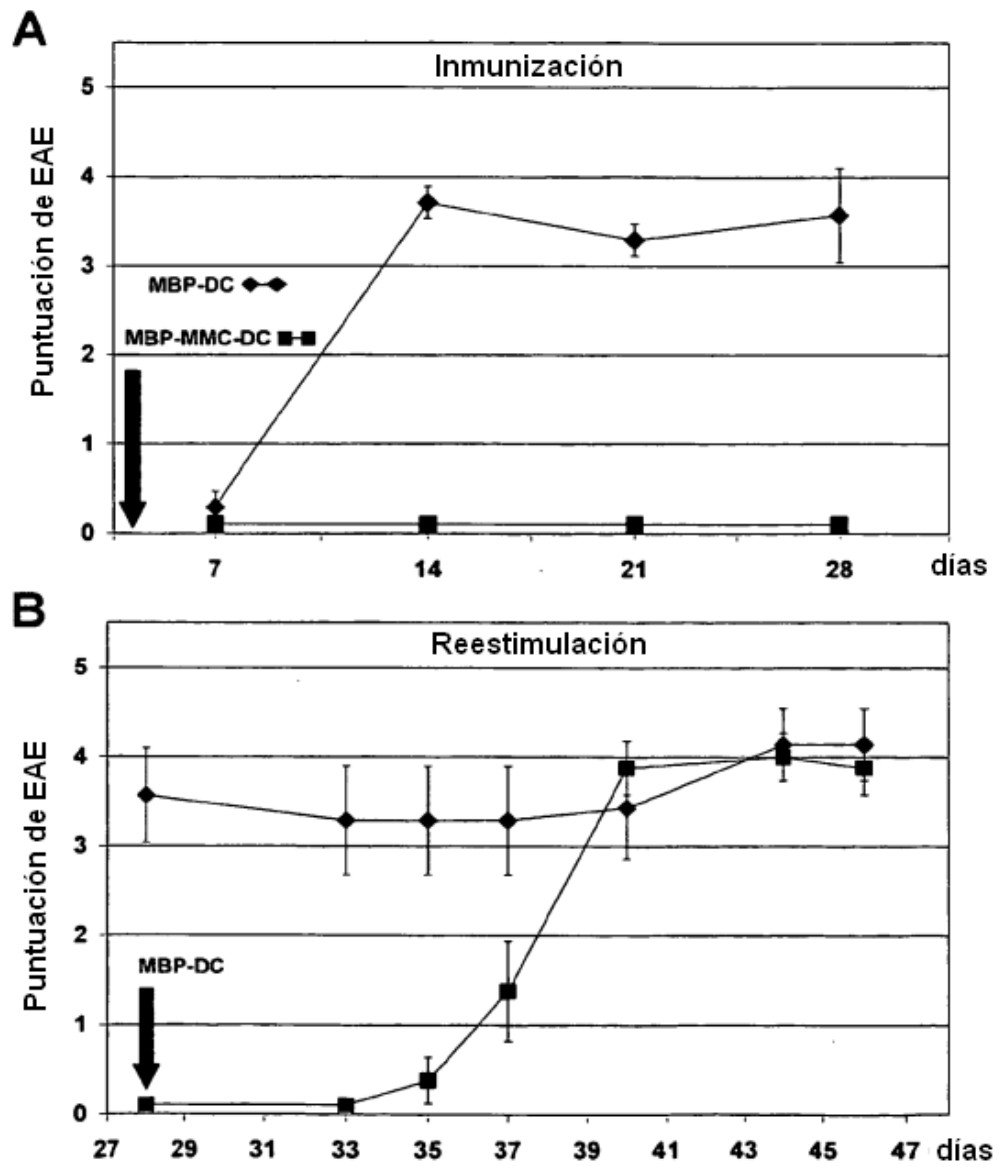


FIGURA 6

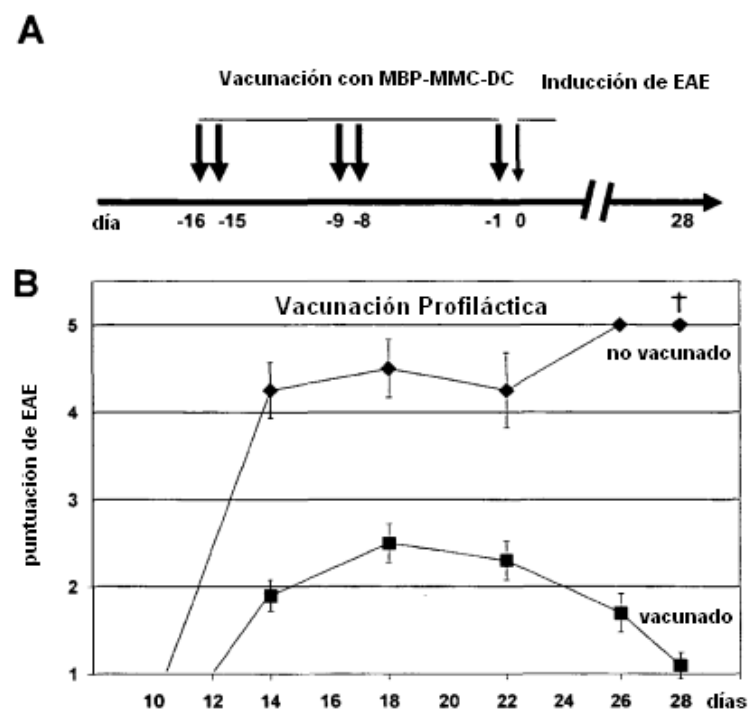


FIGURA 7 (hoja de sustitución)

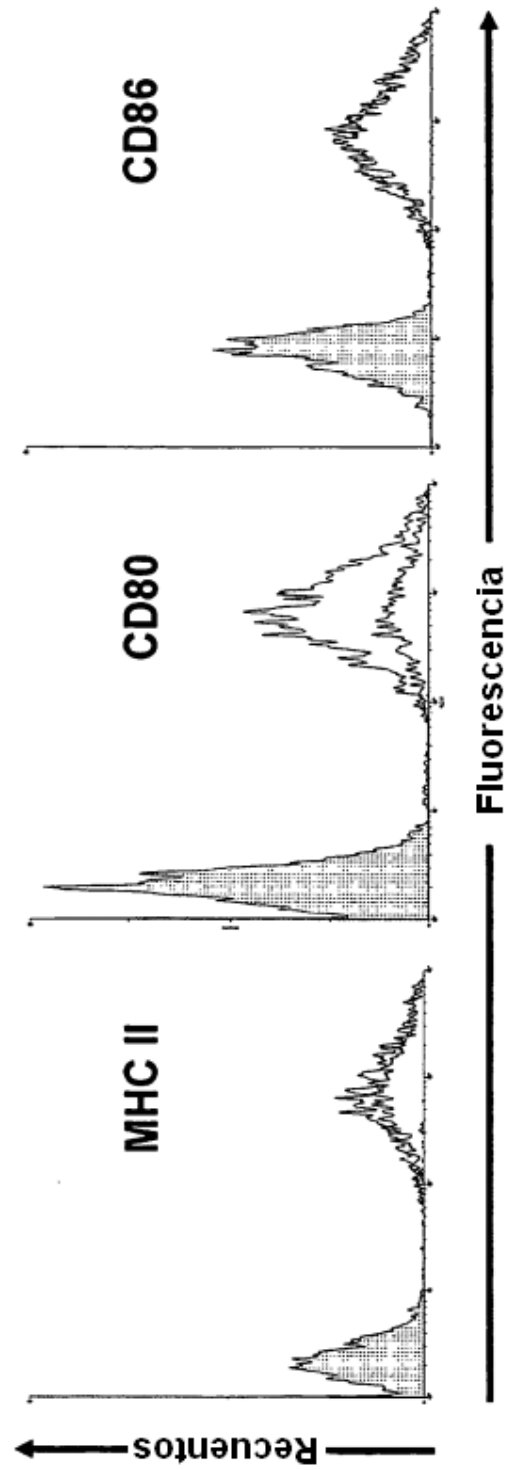


FIGURA 8

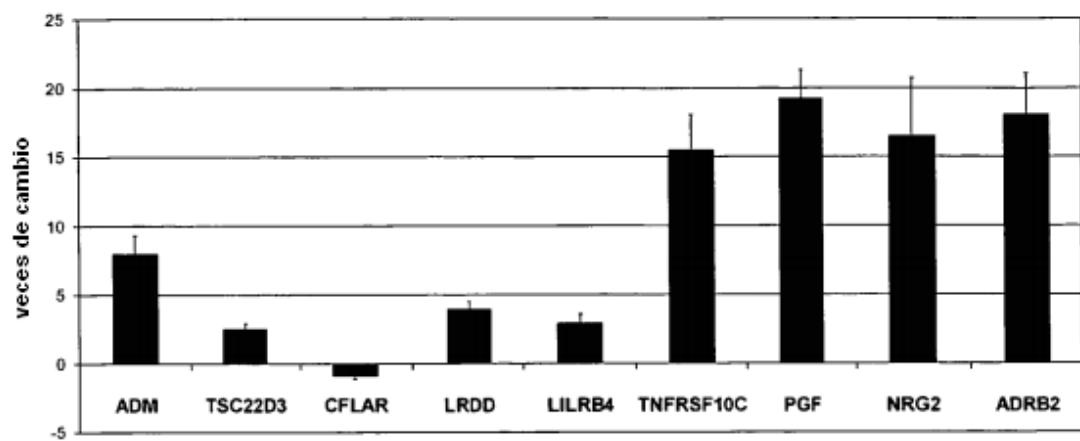


FIGURA 9 (hoja de sustitución)

