(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 553 267**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007** **E 07727790 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2018180**

(54) Título: **Timosina alfa 1 para uso en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped**

(30) Prioridad:

19.05.2006 EP 06010441

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2015

(73) Titular/es:

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. (100.0%)
VIALE SHAKESPEARE, 44
00144 ROME, IT

(72) Inventor/es:

ROMANI, LUIGINA;
BISTONI, FRANCESCO y
GARACI, ENRICO

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 267 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

Timosina alfa 1 para uso en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped

La presente invención se refiere al uso de timosina alfa 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

En el trasplante de médula ósea o transfusión de sangre, o trasplante de órganos de un donante a un receptor que no tiene histocompatibilidad con el donante, los linfocitos del donante migran al receptor. Si el receptor no puede rechazar los linfocitos del donante, los linfocitos del donante se internan y proliferan en los tejidos corporales del receptor y atacan los tejidos induciendo una enfermedad.

En los pacientes con leucemia, enfermedad renal, cardíaca, pulmonar, o hepática en etapa terminal, el trasplante de órganos se utiliza muy comúnmente en el tratamiento. Por ejemplo, actualmente se realizan rutinariamente aloinjertos (injertos de órganos que provienen de donantes que no sean el paciente mismo o el huésped/receptor del injerto) de varios tipos, por ejemplo, de riñón, corazón, pulmón, hígado, médula ósea, páncreas, córnea, intestino delgado y piel (por ejemplo, láminas epidérmicas). Los xenoinjertos (injertos de órganos que provienen de animales no humanos), tales como las válvulas cardíacas de porcino, también están siendo utilizados clínicamente para reemplazar sus contrapartes humanas disfuncionales.

Para asegurar el trasplante de órganos exitoso, es deseable obtener el injerto del gemelo idéntico del paciente o de un miembro de su familia inmediata. Esto es debido a que los trasplantes de órganos evocan una variedad de respuestas inmunes en el huésped, lo que da como resultado el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped (en lo sucesivo, referido como "GVHD").

La respuesta inmune se activa principalmente por las células T a través del reconocimiento de los aloantígenos, y los principales objetivos en el rechazo del trasplante son las formas alélicas no propias de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II. En el rechazo agudo, las células presentadoras de antígenos del donante, como las células dendríticas y los monocitos migran del aloinjerto a los ganglios linfáticos regionales, donde son reconocidas como extraños por las células $CD4^+$ T_H del receptor, estimulando la proliferación de las células T_H. Después de la proliferación de las células T_H, se genera una población de células efectoras (que incluyen las células T $CD8^+$ citotóxicas y las células T $CD4^+$), que migra y se infiltra en el injerto e interviene en el rechazo del injerto (Noelle et al. (1991) FASEB 5 (13): 2770).

Mientras que el rechazo agudo es un proceso dependiente de las células T, en la destrucción del injerto participan una amplia gama de mecanismos efectores. Por medio de la liberación de citocinas y de las interacciones célula a célula, se recluta un conjunto diverso de linfocitos incluyendo las células T $CD4^+$, las células $CD8^+$ T citotóxicas, las células B formadoras de anticuerpos y otros leucocitos proinflamatorios en la respuesta anti-aloinjerto. Las células injerto presentadoras de antígeno son destruidas directamente por las células T $CD8^+$ citotóxicas. Las células T $CD4^+$ activadas producen interleucina-2 (en lo sucesivo, referido como "IL-2"), que es esencial para la activación de ambas células T $CD8^+$ y células B. Además, las células T $CD4^+$ producen otras citoquinas tales como el IFN-γ y la IL-4 que también contribuyen a la destrucción del aloinjerto. Además, el interferón -γ (en lo sucesivo, denominado "IFN-γ ") induce la expresión incrementada de las moléculas MHC de clase I y clase II sobre el tejido del injerto, que es atacado más fácilmente por las células efectoras aloreactivas. El IFN γ aumenta la actividad de los macrófagos y afecta a muchas células inflamatorias llevando a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado y a la inflamación causando daños inespecíficos al injerto. Estas reacciones parecen ser la causa principal del rechazo agudo temprano que puede ocurrir dentro de las primeras semanas después del trasplante. Si no se trata, el rechazo agudo progresa a un proceso rápido y grave que causa la destrucción del trasplante en pocos días.

Por otro lado, cuando un linfocito T del donante reconoce las diferencias basadas en un conjunto de marcadores genéticos, generalmente conocidos como antígenos leucocitarios humanos (HLA), y comienza a atacar el cuerpo nuevo, es decir, el cuerpo del paciente. Aunque la mayoría de los pacientes y donantes se compatibilizan lo mejor posible para los marcadores de HLA. Muchos marcadores de menor importancia, sin embargo, difieren entre los donantes y los pacientes, excepto cuando el paciente y el donante son gemelos idénticos. Antes de un trasplante, se realiza una amplia tipificación del donante y del receptor para asegurarse de que el donante y el receptor están muy cerca inmunológicamente. A pesar de esta tipificación hay diferencias inmunológicas que no pueden ser detectadas y que los linfocitos T en el injerto del donante son capaces de detectar. Como resultado, los linfocitos T del donante comienzan a atacar el cuerpo del paciente y causan GVHD.

Hay dos formas de GVHD: la GVHD aguda y la crónica. La GVHD aguda generalmente ocurre en los primeros tres meses después de un trasplante. Las células T presentes en la médula ósea del donante en el momento del trasplante atacan la piel, el hígado, el estómago y/o los intestinos del paciente. Los primeros signos de la GVHD aguda suelen ser una erupción cutánea que aparece en la mano, los pies y la cara. Aparte de ampollas en la piel, los pacientes con GVHD grave también presentan grandes cantidades de diarrea acuosa o sanguinolenta con cólicos debido al ataque de las T-células del donante al estómago y los intestinos. La ictericia (coloración amarillenta de la piel y los ojos) es la indicación habitual de que la enfermedad GVHD implica al hígado. Cuantos más órganos involucrados y peores síntomas, peor es la enfermedad de GVHD.

En el caso de trasplante de médula ósea, en particular, la GVHD es otro obstáculo para la supervivencia de los pacientes trasplantados. Storb (1984)"Pathophysiology and prevention of graft -versus-host disease." En Advances in Immunobiology: Blood cell antigens and bone marrow transplantation, McCullogh and Sandier, editors, Alan, Inc., N. Y., p.337. Una gran proporción de individuos afectados con GVHD muere como consecuencia de la GVHD. Weiden et al. (1980) "Graft -versus-host disease in allogeneic marrow transplantation", en Biology of Bone-Marrow Transplantation, Gale and Fox, editors, Academic Press, N.Y., p.37.

La timosina alfa 1 es un compuesto bien conocido en el campo médico.

Este compuesto es un péptido ácido presente en el extracto de timo que muestra propiedades inmunorreguladoras en varios ensayos *in vitro* e *in vivo* (1972; Proc Natl Acad Sci EE.UU. 69, 1800-1803).

Los usos previos de timosina alfa 1 son ya conocidos.

WO2004087067 se refiere al uso de timosina alfa 1 para prevenir la infección por Aspergillus fumigatus en un huésped inmunocomprometido que está siendo tratado con un trasplante de médula ósea.

La administración subcutánea de timosina alfa 1 a ratones desnudos inoculados previamente con células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano ("NSCLC") disminuyó significativamente el volumen del tumor.

Las metástasis pulmonares en ratones con fibrosarcoma inducido por metilcolantreno-también se redujeron con timosina alfa 1, y el crecimiento del sarcoma local, así como las metástasis hepáticas y pulmonares de las células del linfosarcoma se redujeron significativamente en ratones BALB/c tratados con timosina alfa 1 .

El uso de timosina alfa 1 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la GVHD no es conocido en la técnica.

Para proteger a los pacientes contra la GVHD, se han empleado diversos agentes inmunosupresores. Actualmente, el rechazo de aloinjertos se controla usando agentes inmunosupresores tales como la ciclosporina A, la azatioprina, los corticosteroides, incluyendo la prednisona, y la metilprednisolona, la ciclofosfamida y FK506. La ciclosporina A, el inmunosupresor más potente y el utilizado con más frecuencia, revolucionó el campo de la cirugía de trasplante de órganos. Otros agentes inmunosupresores tales como el FK506, la rapamicina, el ácido micofenólico, la 15-desoxiespergualina, mimoribine, misoprostol, OKT3 y los anticuerpos receptores anti IL-2, se han utilizado en el tratamiento y/o prevención del rechazo de trasplantes de órganos. Briggs, Immunology letters, 29(1-2), 89-94, 1991; FASEB 3:341 1, 1989.

Aunque el desarrollo de nuevos fármacos inmunosupresores ha llevado a una mejora sustancial en la supervivencia de los pacientes, estos medicamentos están asociados con una alta incidencia de efectos secundarios tales como la nefrotoxicidad y/o la hepatotoxicidad.

Por ejemplo, la ciclosporina A se ha asociado a toxicidades y efectos secundarios cuando se utiliza incluso a dosis terapéuticas. Aunque FK506 es aproximadamente de 10 a 100 veces más potente que la ciclosporina A en la inhibición de la transcripción de IL-2 inducida por activación *in vitro* y en el rechazo del injerto *in vivo*, también muestra efectos secundarios tales como la neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un tratamiento y profilaxis de GVHD con perfiles de toxicidad mejorados.

US61197751 describe que la timosina alfa 1 (Tα1) acelera la cicatrización y estimula la angiogénesis aumentando la diferenciación morfológica de las células endoteliales y actuando como un quimiotáctico para las células endoteliales y los monocitos.

WO98/35696 se refiere al uso de Tα1 para promover el desarrollo de las células madre.

WO95/12405 se refiere al uso de Tα1para convertir a los pacientes de Hepatitis B que tienen una enfermedad hepática descompensada en seronegativos para el ADN virus de la Hepatitis B.

Ahora se ha encontrado que la Timosina alfa 1 es un agente útil para inhibir o tratar la enfermedad de injerto contra huésped o reacciones de rechazo de injertos en el trasplante de órganos en un sujeto mamífero.

La invención es por lo tanto la timosina alfa 1 para uso en la preparación de un medicamento útil para la prevención o tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de órganos en un mamífero, que puede ser un paciente humano. El paciente puede estar en un régimen de acondicionamiento mieloablativo o en un régimen de acondicionamiento no mieloablativo.

La timosina alfa 1 se puede administrar en un sujeto que se encuentra en un régimen de acondicionamiento mieloablativo o en un régimen de acondicionamiento no mieloablativo.

La timosina alfa 1 se puede administrar al paciente en una cantidad farmacéuticamente eficaz dentro de un intervalo de tiempo predeterminado antes y/o después del trasplante, opcionalmente en combinación con un agente

inmunosupresor seleccionado de entre el grupo que comprende prednisona, metilprednisolona, ciclofosfamida , ciclosporina A, FK506, talidomida, azatioprina, Daclizumab, Infliximab, MEDI-205, abx-cbl o ATG.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Introducción

La timosina alfa 1 es un péptido tímico de origen natural (Expert Opin. Biol. Ther. 2004; 4:559-573) que promueve la maduración y la producción de citoquinas en DC humanas y murinas por señalización a través de receptores de tipo Toll (TLR), incluyendo TLR9 (Blood. 2004; 103:4232-4239). Al influir en el equilibrio de producción de IL-12 y IL-10 de las DC, la timosina alfa 1 actúa como un regulador inmune capaz de inducir inmunidad protectora frente a *Aspergillus fumigatus* (Blood 2004; 103:4232- 4239). La estimulación de TLR9 también puede conducir a la activación de IDO a través de mecanismos que incluyen la señalización de IFN de tipo 1 autocrino (J. Immunol. 2005; 175:5601-5605; Eur. J. Immunol. 2005; 36:8-11) y puede promover la generación por medio de DCp de células $CD4^{+}CD25^{+}$ (J. Immunol. 2004; 173: 4433-4442), que son un componente esencial de la inmunidad protectora dependiente de IDO para los hongos (J. Immunol. 2005; 174: 2910-2918; J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723). De acuerdo con la presente invención se evaluó la actividad de timosina alfa 1 en el equilibrio de la inmunidad y la tolerancia por DC y la generación de células T reg. Las DC derivaban de precursores de médula ósea (murina) o de sangre periférica (humana) utilizando GM-CSF/IL-4 (DC-GM) o el ligando FLT3 (DC-FL), conocido por expandir DC convencionales y DCp (J. Immunol 2005; 174: 6592-6597) con o sin timosina alfa 1. Se analizaron DC para la expresión de IDO y la capacidad para mediar en la activación reguladora de Th 1/T in vitro e in vivo contra *A. funigatus* y los aloantígenos. Se descubrió la especialización y la complementariedad de activación y tolerización de las diferentes poblaciones de DC. Sin embargo, mediante la activación de un programa tolerogénico dependiente de IDO a través de TLR9 y señalización de IFNR de tipo I, la timosina alfa 1 actuó durante la diferenciación de DC alterando el equilibrio de inflamación y tolerancia.

Materiales y métodos

Ratones

Se obtuvieron ratones hembras, de 8 a 10 semanas de edad endogámicas BALB/c y C57BL6 de Charles River/Harlan Breeding Laboratories (Calco, Italia). Ratones TLR9 -/- o IFN-aβ R - / - homocigóticos con fondo C57BL6 fueron criados bajo condiciones específicas libres de patógenos en el Animalario de la Universidad de Perugia, Perugia. Los procedimientos con animales y su cuidado se llevaron a cabo de conformidad con las leyes y políticas nacionales.

Donantes y pacientes

Las células mononucleares de sangre periférica humana se obtuvieron de donantes sanos y siete receptores células T con disminución del número de HSCT haploidénticas con el consentimiento informado por escrito. La tipificación de los donantes, el injerto y la GVHD se evaluaron como se describe (Blood. 2005; 106: 4397-4406). Ratones C57BL6 modelo experimental de HSCT irradiados letalmente (8 Gy) fueron infundidos con células de médula ósea con disminución del número de células T de ratones BALB/c (Blood 2003; 102: 3807-3814).

Para GVHD, se añadieron al injerto esplenocitos T CD3+ donantes purificados. (Science 2002; 295: 2097- 2100). Los ratones individuales se calificaron semanalmente de 0-2 para cada criterio de GVHD (ver leyenda de la Figura 3) sin conocimiento del grupo de tratamiento.

A. infección de fumigatus

La cepa de A. fumigatus, las condiciones de cultivo y la infección fueron como se describe en Blood 2004; 103: 4232-4239. Los ratones fueron anestesiados con avertina al 2,5% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). La cuantificación del crecimiento fúngico en los pulmones se llevó a cabo mediante el ensayo de quitina y los resultados se expresan como microgramos de glucosamina por par de pulmones, y la tinción PAS se llevó a cabo como se describe en Blood. 2004; 103: 4232-4239.

Reactivos

La timosina alfa 1 y el péptido mezclado (stimosina alfa 1) (ambos de SciClone Pharmaceuticals, Inc. de San Mateo, CA) fueron suministrados como polipéptidos acetilados purificados, liofilizados estériles libres de endotoxinas (Blood.2004; 103: 4232- 4239). Los polvos liofilizados se reconstituyeron en agua estéril.

Cultivos y generación del subconjunto de DC

Se obtuvieron DC-GM o DC-FL a partir de monocitos CD14+ purificados de donantes sanos o de pacientes trasplantados (1 mes después de HSCT) cultivados en un medio de Iscove modificado durante 7-9 días, en presencia de GMr- CSF (Schering-Plough, Milán, Italia) y rIL-4 (Peprotech, Inalco, Milán, Italia) o FLT3-L (Immunex Corporation, Seattle, WA) (Blood. 2004; 103: 4232-4239). La recuperación de DC se redujo entre 20-30% en los cultivos de los pacientes trasplantados. Se obtuvieron DC-GM- o DC-FL murinas a partir de células de la médula

ósea durante 7-9 días, como se describe (Blood 2004; 103: 4232-4239). Se añadieron a los cultivos 20 ng/mL de timosina alfa 1 y de stimosina alfa 1. Se purificaron DC (> 99% CD11c+ que consiste en 90-95% de células CD8-, 5-10% CD8 +, y 1-5% B220+) a partir de bazos (DCsp) por la clasificación activada por campo magnético usando MicroBeads de CD11c y MidiMacs (Miltenyi Biotech). Las poblaciones de DC se separaron además en CD8-, CD8 + y fracciones de B220+ por medio de CD8 o MicroBeads de B220 (Miltenyi Biotech). Las DC se pulsaron en medio Iscove libre de suero durante 24 horas con conidios de Aspergillus no opsonizados vivos o Zymosan de Saccharomyces cerevisiae (Sigma) o CpG-ODN 2006 como se describe. Se realizaron 7 fagocitosis tal como se describe (Blood. 2004; 103: 4232-4239). Se tomaron fotografías con una alta resolución de Cámara de Color de Microscopía de alta Resolución AxioCam, utilizando el Software Rel. 3.1 de AxioVision (Carl Zeiss, Milán, Italia).

Citometría de flujo

Se analizaron las DC para la expresión del antígeno con un citofluorómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipado con el software CELLQuestTM y utilizando mAbs conjugados de PharMingen (Blood. 2004; 103: 4232-4239).

Expresión de IDO y análisis funcional

La expresión de IDO y la actividad funcional se evaluaron como se describe en Nat. Immunol. 2002; 3: 1097-1101. Generación, la purificación y la actividad de las células T CD4+ esplénicas células T reg se cultivaron simultáneamente con DC pulsadas con conidios durante 5 días 7 después de la citometría de flujo o ensayo ELISPOT. Se utilizó 1-MT (Sigma-Aldrich) a 2 μM. Las células CD4+CD25+ y CD4+CD25- (> 90% de pureza en el análisis FACS) se separaron por clasificación celular magnética a partir de pulmón y de los TLN (J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723). Para la inhibición de las células T reg, se añadieron 5 x 10^4 células T reg de los TLN a 3 x 10^5 células CD4+CD25-, tanto a partir de ratones trasplantados, estimulados con 3 x 10^4 DCsp autólogas pulsadas con conidios de Aspergillus o con o 1,5 x 10^5 DCsp alogénicas de ratones donantes no tratados durante cinco días antes del etiquetado con timidina H^3. PMN purificados peritoneales CD11bGr- 1+ (> 98% de pureza en el análisis de FACS) (2 x 10^6) fueron expuestos a los conidios restantes en presencia de 4 x 10^5 CD4+CD25+ durante 60 min para la producción de oxidantes o 24 horas para la producción de citoquinas (J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723).

Citoquinas y Ensayo de ELISPOT

El contenido de citoquinas se evaluó mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Endogen Human Elisa Kits, R & D Systems and EuroClone, Milán, Italia). Se utilizaron los kits de ensayo AID EliSpot (Amplimedical, Buttigliera Alta, Turín, Italia) en células T CD4+ esplénicas purificadas cultivadas simultáneamente con DC pulsadas con conidios durante 5 días para enumerar las células productoras de citoquinas (Blood. 2003; 102: 3807-3814). Se utilizó 1-MT a 2μ M.

Transferencia adoptiva, provocación de hongos, y evaluación de la protección

Los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales de DC, a intervalos semanales, comenzando un día después de HSCT e se infectaron una semana después de la última administración de DC. Tres días más tarde, los homogeneizados de pulmón, las células T CD4+ (> 98% en el análisis de FACS), CD4+CD25- (>98%) o CD4+CD25+ (> 82%) purificadas con los kits específicos de aislamiento Miltenyi Biotec se evaluaron para el patrón de pro y antiinflamatorio (TNF-a/IL-10 en homogeneizado de pulmón), Th1 (IFN-.) o Th2 (IL-4) producción de citoquinas por las células CD4 + estimuladas con DC pulsadas con Aspergillus (Blood 2003; 102: 3807-3814) frecuencia de células T reg CD25+ IL-10+ TGF-β+, linfoproliferación y la expresión génica por RT-PCR. Para la proliferación, se sembraron linfocitos T CD4+ de los TLN (10^5 células/pocillo) con 10^5 células/pocillo esplenocitos alogénicos irradiados o de DCsp autólogas pulsadas con conidios o 10μg/ml de Con A durante cinco días antes del etiquetado con timidina H^3.

Generación de clones de células T humanas específicos de Aspergillus y linfoproliferación

Se generaron clones de células T CD4+ humanas específicas de Aspergillus a partir células T CD4+CD45RA+ de sangre periférica añadidas en concentraciones de dilución limitante a células de sangre periférica autólogas alimentadoras irradiadas (20 Gy) y se estimularon con DC pulsadas con conidios o DC alogénicas (Blood. 2005; 106: 4397-4406). Se evaluaron los clones en crecimiento para la especificidad contra las DC pulsadas con hongos, DC alogénicas, células irradiadas autólogas (como control negativo) y 0,5% de fitohemoaglutinina (como control positivo) por etiquetado con timidina H^3 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) o contenido de citoquina en los sobrenadantes 2 días más tarde (Blood. 2005; 106: 4397 hasta 4406 mil).

(RT)PCR-Transcriptasa inversa

Se llevó a cabo la extracción del RNA, la síntesis y PCR del ADNc, los cebadores específicos de secuencias de genes, las temperaturas de anillamiento y los ciclos de amplificación como se describe en J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723). La eficiencia de amplificación fue validada y se normalizó respecto a GAPDH.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student apareada para determinar la importancia de los valores en los grupos experimentales (la significación se define como P<0,05). Los datos de supervivencia se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los grupos in vivo estaban compuestos por 6 animales.

Ejemplo 1

La timosina alfa 1 expande las DCp a partir de precursores de la médula ósea y activa el catabolismo del triptófano.

Para evaluar cómo la timosina alfa 1 afectaría a las propiedades fenotípicas y funcionales de las DC murinas, se cultivaron células de médula ósea durante 7-9 días en un medio que contiene GM-CSF/IL4 o FLT3L, en presencia de timosina alfa 1 o un control, péptidos mezclados. Después de la maduración, las células fueron analizadas por citometría de flujo y microscopía de luz (Figura 1A). Contrariamente a FLT3L, el tratamiento GM-CSF/IL-4 por sí solo no permitiría la aparición de una fracción alta de DCp, según revela el porcentaje de células DC B220+CD11c+ en el análisis FACS y por el examen de morfología mediante microscopía de luz. (Figura 1A). Sin embargo, la timosina alfa 1, que no afectó el rendimiento total de las células aumenta en gran medida la aparición de DCp en DC-GM, según revela un mayor número de DC B220+CD11c+ y la recuperación disminuida ligeramente de las células CD11b+CD11c+ convencionales. Aunque se sabe que la timosina alfa 1 afecta a la hematopoyesis, la expansión de las células B220+CD11c+ no se observó con la timosina alfa 1 sola. Las células B220+CD11c+ no se incrementaron en DC-FL tratadas con timosina alfa 1 ni en DC-GM tratadas con el péptido control. La expansión de DCp por timosina alfa 1 no se observó en DC-GM de ratones TLR9-/- o IFN-aβR-/-, lo que indica la dependencia de los efectos de la timosina alfa 1 en la señalización de TLR9 e IFNR de tipo I.

Ejemplo 2

La timosina alfa 1 promueve la inducción de IL-12 por DC mieloides y de IL-10 por DCp.16

La timosina alfa 1 induce la liberación de IL-12 e IL-10 por DC-GM en respuesta a los conidios de Aspergillus y de IL-10, más que IL-12, por DC-FL (Figura IB). La producción de IL-10 por las DC en respuesta a los hongos está regulada por una ruta dependiente de IDO (J. Immunol 2005; 174: 2910-2918); En la configuración actual, la producción de IL-10 por cualquier población en respuesta a la timosina alfa 1 no ocurrió con células de ratones TLR9-/- o IFN-aβR-/-, y fue igualmente bloqueado por la adición de por triptófano 1-metil-DL (1-MT) inhibidor de IDO a los cultivos (Figura IB). La inducción de la proteína IDO funcional por timosina alfa 1 en DC-FL y DC-GM se confirmó por análisis de inmunotransferencia y por la evaluación de la actividad enzimática en términos de la conversión de DC de triptófano a quinurenina. Una vez más, la inducción de la proteína IDO y la función de la timosina alfa 1 no se observó en DC de ratones TLR9-/- o IFN-aβR-/- (Figura 1C).

Ejemplo 3

Células reguladoras T in vitro activadas por DC IDO+ inducidas por timosina alfa 1

Para correlacionar la expresión de IDO y la producción de IL-10 por DC con posibles actividades de regulación, se analizó la capacidad relativa de las células DC inducidas por timosina alfa 1 para inducir la actividad reguladora de Th1/T específica de antígeno in vitro por los linfocitos T CD4+ esplénicos en respuesta a los conidios de Aspergillus. La Figura 2A muestra que la timosina alfa 1 aumentó de actividad para las células T CD4+ productoras de IFN-.-/IL10 por medio de DC-GM y para las células productoras de IL-10 por medio de DC-FL. De forma similar al bloqueo de IDO, el agotamiento de B220+CD11c+ de timosina alfa 1 de DC-GM abolió la activación de células T reg (datos no mostrados). El bloqueo de IDO por 1-MT impidió la activación de las células CD4+ productoras de IL-10 pero no tuvo efecto sobre las células productoras de IFN-.-, lo que sugiere que IDO está causal y selectivamente vinculada a la activación de ñas células T productoras deIL-10. Debido a que la estimulación de TLR9 activa IDO (J. Immunol 2005; 175: 5601-5605) y también promueve la generación por medio de DCp de las células T reg CD4+CD25+ (J. Immunol 2004; 173:4433-4442) la aparición de células T CD4+CD25+ que expresan marcadores de la actividad de las células T reg, tales como el factor de transcripción Foxp3 “cabeza de tenedor” y el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4). El análisis citofluorimétrico revela que las células T CD4+CD25+ se expandieron por cultivo simultaneo con DC (Figura 2B). Sin embargo, una proporción significativa de las células T CD4+CD25+ dieron resultado positivo en la tinción para Foxp3 intracelular y CTLA-4 de superficie cuando se cultivan en presencia de DC inducidas con timosina alfa 1. El efecto fue anulado por el bloqueo de IDO. DC-FL también indujo a las células T reg Foxp3 +, aunque en menor grado. De acuerdo con los datos de la Figura 1C que sugieren que el catabolismo del triptófano se ve aumentado por FLT3L, 1-MT parecía interferir con la expansión de células T Foxp3+CTLA4+CD25+ cultivadas simultáneamente con DC-FL. Por lo tanto, el desarrollo de células T reg CD4+CD25+ in vitro aparentemente se produce a través de un mecanismo que implica el catabolismo del triptófano de DC y es promovido por timosina alfa 1.

Ejemplo 4

DC-GM condicionadas con timosina alfa 1 proteger a los huéspedes de la aspergilosis en HSCT.

Las DC en pulsadas con hongos actúan como una vacuna potente contra los hongos en HSCT.7 experimental. Debido a que la regulación es absolutamente necesaria para equilibrar la inflamación y la tolerancia en HSCT24, 25, así como en la inmunidad antifúngica (J. Immunol 2005; 174: 2910-2918).

Se examinó si las DC tratadas con timosina alfa 1 afectarían a la activación y tolerización in vivo en un entorno experimental de HSCT. Los ratones trasplantados fueron infundidos con DC pulsadas con hongos, infectados con conidios de Aspergillus y se hizo un seguimiento de su supervivencia, del crecimiento de los hongos y de la patología inflamatoria en los pulmones. De manera similar a las DC esplénicas, las DC FL 7 pero no las DC-GM confieren resistencia a la infección de manera dependiente de la dosis, ya que los ratones sobrevivieron a la infección y se controla el crecimiento de los hongos tras la transferencia de 5 x 10^5 DC (Figura 3A), pero no de 5 x 10^4 DC. Se observó un efecto paradójico en los ratones tratados con DC-GM en donde los ratones fallaron el desafío de sobrevivir a pesar del control efectivo del crecimiento fúngico. Sin embargo, el tratamiento con timosina alfa 1, que no afectaría el potencial de vacunación de DC-FL, aumentó dramáticamente el de las DC-GM, como se muestra por la completa protección proporcionada por transferencia de las DC-GM tratadas con timosina alfa 1 (Figura 3A). Las DC-FL abarcan poblaciones equivalentes a mezclas de CD8+ esplénicas recién recolectadas, CD8- y B220+LyC6+DCp.20. Para analizar las contribuciones de los diferentes subconjuntos al potencial vacunación de las DC, fueron examinadas las fracciones purificadas de DC-FL o de las poblaciones esplénicas, solo o de manera combinada, para la capacidad de inducir protección a la aspergilosis en HSCT. Los resultados mostraron que ni las DC CD8- ni CD8+ solas confieren resistencia a la infección, como se aprecia por el crecimiento extensivo y la difusión de los hongos. Sin embargo, la protección se observó en la combinación de los dos subconjuntos y fue similar a la observada con las DCp purificadas a partir de ya sea el bazo o de cultivos DC-FL (datos no mostrados). Por lo tanto, la combinación de actividades funcionalmente distintas fue probable la responsable de la acción protectora in vivo de las DC-FL y de las DC-GM tratadas con timosina alfa I en el entorno experimental de la aspergilosis en HSCT.

Ejemplo 5

El acondicionamiento de DC-GM a timosina alfa 1 genera un componente inmune que mitiga la inmunotoxicidad

La histopatología reveló que el reclutamiento y la reacción de células inflamatorias locales y fueron elevados en los pulmones de los ratones tratados con DC-GM pero bajos en ratones infundidos con DC-GM tratadas con timosina alfa 1 o con DC-FL (Figura 3B). Estos hallazgos sugieren que una toxicidad inflamatoria severa estaba probablemente asociada a la transferencia de DC-GM, un efecto mitigado por el pre-acondicionamiento a la timosina alfa 1 de las DC-GM. Para descubrir directamente el potencial de inmunotoxicidad de las DC y su control por la timosina alfa 1, las diferentes poblaciones de DC fueron infundidas en ratones que recibieron diferentes números de células T del donante junto con el injerto.

Los ratones se dejaron sin infectar para evaluar GVHD o se infectaron para evaluar la susceptibilidad a la infección. Aunque el inicio de la GVHD después de un trasplante de células madre depende de la presentación de antígenos directa por las APC del huésped (Science. 1999; 285: 412-415; Nat Med. 2004; 10: 510-517) también ha sido descrita la presentación de antígenos indirecta por las APC del donante (Nat Med. 2004; 10: 987-992). En línea con los hallazgos anteriores (Science. 2002; 295: 2097-2100) la gravedad de GVHD era dependiente del número de células T infundidas, siendo observados signos de GVHD 10 y 30 días después de la infusión respectiva de $5x10^5$ o $1x10^5$células T. La administración conjunta de DC-GM aceleró enormemente la inducción de GVHD por 10^5 células T pero, de forma similar a DC-FL, DC-GM tratadas con timosina alfa 1 impidieron el efecto totalmente (Figura 3C). En términos de susceptibilidad a la infección, la supervivencia no se modificó después de la infusión de las células T del donante, ya sea solas o junto con DC-GM. Por el contrario, al igual que los ratones que recibieron DC-FL, los ratones infundidos con DC-GM tratadas con timosina alfa 1 sobrevivieron a la infección (Figura 3D). En conjunto, estos resultados sugieren que, al igual que las DCsp, las DC-FL son plenamente competentes en la inducción de protección antifúngica después de la transferencia adoptiva en receptores con HSCT. Por el contrario, DC-GM están dotadas de inmunotoxicidad, incluyendo la promoción de la inflamación y la GVHD, una actividad en el huésped susceptible a los efectos reguladores iniciados por la timosina alfa 1 in vitro.

Ejemplo 6

Las DC inducidas por timosina alfa 1 preparan las respuestas antifúngicos de Th1/T reg

Para determinar si las DC tratadas con timosina alfa 1 inducían a las células T reg in vivo, se evaluaron los niveles de TNF-a/IL-10 en homogeneizados de pulmón, la producción de IFN.-/IL-4 por las células T CD4+ de los TLN, y la expresión de los genes que codifican IFN-., el factor de transcripción específico de Th2 GATA-3 y Foxp3 en las células T CD4+ de los TLN. También se evaluó la presencia de células T CD4+CD25+ en los pulmones y en los TLN, ya que se encuentran poblaciones T reg funcionalmente distintas en los pulmones y en los TLN de ratones con aspergilosis (J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723). Los resultados mostraron patrones dispares de producción de

TNF-a/IL-10 en los diferentes grupos. TNF-a era alta y la IL-10 era baja en los ratones sin tratar o infundidos con DC-GM, siendo cierto lo contrario en los ratones que recibieron DC-FL y en particular DC-GM tratadas con timosina alfa 1 (Figura 4A). La evaluación de la producción real de IFN-./IL-4 por las células T CD4+ reveló que la cantidad de IFN.- era mayor y la de IL-4 inferior en ratones a los que se suministró DC-GM tratadas con timosina alfa 1 o a los que se suministró DC-FL con independencia del tratamiento (Figura 4A). El análisis de PCR mostró que la expresión del ARNm de ifng estaba siempre presente; se detectó mRNA de Gata3 en los ratones sin tratar o tratados con DC-FL no expuestas a timosina alfa 1 y el mRNA de Foxp3 se expresó en ratones que recibieron DC-FL, independientemente de la exposición a timosina alfa 1, o a los que se suministró DC-GM tratadas con timosina alfa 1 (Figura 4B). Se evaluaron los niveles de expresión del receptor de TNF (GITR) inducible por glucocorticoides y se encontró que se expresa en términos generales, sin diferencias significativas entre los grupos experimentales. El análisis citofluorimétrico reveló que el número de células T CD4+CD25+ aumento en los TLN y en los pulmones de los ratones infundidos con cualquier tipo de DC, tratada o tratada con timosina alfa 1 (Figura 4C). Curiosamente, se observó algún tipo de compartimentación diferencial en las T reg inducidas con DC-GM tratadas con timosina alfa 1 en los pulmones más que en los TLN y lo contrario ocurrió con las DC-FL tratadas con timosina alfa 1. Las células T CD4+CD25+ recuperadas de los ratones que recibieron DC-GM tratadas con timosina alfa 1 o DC-FL no se teñían positivamente para el marcador de activación CD69, como se ha observado con las células recuperadas de ratones que recibieron DC-GM sin tratar (Figura 4C). En consonancia con la idea de que se requiere la migración y la ocupación de ganglios linfáticos de drenaje para la aceptación del injerto, 29 células T CD25 + se recuperaron de los ratones que recibieron DC-FL o timosina alfa 1 tratadas con DC-GM también dieron positivo para el marcador de CD62L. Las células T reg de TLN contenían grandes cantidades de células productoras de IL-10 o de TGF-β (Figura 4A), mientras que las células T reg de pulmón contenían más células productoras de IL-10 que de TGF-β.

En conjunto, estos resultados sugieren que las DC-GM expuestas a timosina alfa 1 convierten un inflamatoria una respuesta protectora/Th 1 en una respuesta a Th1/T reg tras la transferencia adoptiva in vivo. Sin embargo, el hallazgo de que las células T reg inducidas se dirigen a de diferentes compartimentos podría estar relacionado con las posibles diferencias fenotípicas y funcionales entre las diferentes poblaciones de T reg. Esto sería consistente con el hallazgo de que se produce una división del trabajo entre las distintas poblaciones T reg funcionalmente que se activan de forma coordinada en los pulmones y en los TLN de los ratones expuestos a Aspergillus (J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723). Alternativamente, después de un primer nivel de activación y de la activación en los ganglios linfáticos por el reconocimiento entre afines, las células T reg activadas pueden llegar a ser células T efectoras reg capaces de circular a los tejidos infectados donde controlan la respuesta inflamatoria local.

Ejemplo 7

Células T reg antifúngicas inhiben la alorreactividad y la inflamación

Para evaluar la actividad supresora de las células T reg CD25+, las células de los TLN de los ratones que recibieron los diferentes subconjuntos de DC se evaluaron para la respuesta proliferativa a esplenocitos alogénicos, conidios de Aspergillus o mitógeno. Los resultados mostraron que se observa la proliferación alogénica, pero no específica de Aspergillus, en los ratones que recibieron células T solos o junto con DC-GM. En contraste, la alorreactividad disminuyó pero la reactividad específica de un patógeno se recuperó en ratones que recibieron DC-FL o DC-GM tratadas con timosina alfa 1, aunque en un grado menor en comparación con la de los controles de los donantes (Figura 5A). Como la respuesta al mitógeno era comparable entre los ratones tratados con DC, estos resultados sugieren que las células T reg impactan directamente tanto en la reactividad de Th1 alogénica como en la específica de patógeno. Para aclarar esta cuestión, se evaluó la capacidad las células T CD4+CD25+ purificadas a partir de los TLN para bloquear la proliferación de Aspergillus o específica de aloantígeno, y la producción IFN-., por las células CD4+CD25 T correspondientes. Mientras que las células T CD4+CD25+ fueron hiporeactivas a aloantígenos y Aspergillus, la alorreactividad y las respuestas específicas de antígeno se redujeron tanto en presencia de células T CD4+CD25+ de ratones que recibieron DC-FL o DC-GM tratadas con timosina alfa 1 S (Figura 5B). Como las células T reg de pulmón están dotadas de una actividad anti-inflamatoria potente en la aspergilosis pulmonar (J. Immunol. 2006; 176: 1712-1723), la actividad supresora de las células T de pulmón CD4+CD25+ en la actividad efectora antifúngica de los neutrófilos, tales como TNF-a y producción de oxidantes, también se examinó puesto que estas funciones son exquisitamente sensibles a la actividad supresora de las células T reg (J. Immunol. 2006; 176: 1712- 1723). Ambas funciones se inhibieron significativamente por las células T reg de pulmón y, en particular, por la fracción de T reg inducida por DC-GM tratadas con timosina alfa 1 (Figura 5B).

Ejemplo 8

La timosina alfa 1 promueve la movilización y la activación antifúngica de Th1/T de las DC humanas

Para evaluar si la timosina alfa 1 puede afectar la potencial activación de Th1/T reg de las DC humanas, se derivaron GM-DC o FLDC a partir de células periféricas CD 14+ de donantes sanos en presencia de timosina alfa 1. Como en los cultivos de DC murinas, la timosina alfa 1 promovió la movilización de DCp CD123+ mientras que disminuyó la de las DC CD1a+ en cultivos tratados con GM-CSF/IL-4.

No se observaron tales efectos en los cultivos de FLT3-L (Figura 6A). La timosina alfa 1 modificó significativamente la percepción microbiana de DC-GM o DC-FL en cuanto a la fagocitosis (del 30 al 56% de fagocitosis en DC-GM y

del 32 al 58% de fagocitosis en DC-FL). Curiosamente, sin embargo, la timosina alfa 1 también promovió la fagocitosis de GM y de DC-FL derivadas de pacientes un mes después del trasplante (Figura 6B). En términos de actividad funcional, la timosina alfa 1 convirtió DC-GM productoras de IL-12 inflamatoria en DCp tolerogénicas que, de forma similar a DC-FL, produjeron mayores niveles de IL-10 (Figura 6C) y activaron a las células T CD4+ productoras de IL-10 in vitro (Figura 6D). Como se sabe que las DCp productoras de IFN de tipo I participan en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia, así como en los efectos tolerogénicos de la timosina alfa 1, también se comparó la producción de IFN-a en respuesta a los conidios de Aspergillus o Zymosan (destinado a ser un control positivo para DC-GM) o CpG ODN (control positivo para DC-FL). IFN-a se produce principalmente por la DC-FL o por DC-GM tratadas con timosina alfa 1 (Figura 6C). Por último, se examinó si el tratamiento con timosina alfa 1 modificaría la capacidad de DC para activar la reactividad de las células T específicas de aloantígeno o de hongo. La Figura 6E muestra que la timosina alfa 1 no modifica ni las respuestas de las células T específicas de antígeno inducidas por DC ni la capacidad aloestimuladora de cualquier tipo de DC. De hecho, la inducción de la reactividad de las células T específica de hongo estuvo totalmente ausente en las DC de los pacientes trasplantados. Estos datos indican, por lo tanto, que la timosina alfa 1, mediante el empleo de las DC inflamatorias, puede cumplir con los requisitos para una activación antifúngica satisfactoria de las células T reg/Th1 en ausencia de alorreactividad en el trasplante hematopoyético.

Los resultados obtenidos, a los que se refieren los ejemplos anteriormente mencionados, muestran que la timosina alfa 1 expande una fracción de DCp en DC-GM que es competente para función IDO y que IDO+DCp son necesarias y suficientes para mediar en la inmunidad antimicrobiana y en la tolerización del aloantígeno en HSCT experimental.

Esta es la demostración de que la timosina alfa 1 actúa como una hormona natural que contribuye a la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica en estado fisiológico y parafisiológico.

La presente invención contempla un envase terapéutico para dispensar, o para uso en la dispensación a, un paciente que está siendo tratado para la prevención o el tratamiento de las reacciones de la enfermedad injerto contra huésped o del rechazo de injertos en el trasplante de órganos, que comprende una o más dosis unitarias, comprendiendo cada dosis unitaria una cantidad de timosina alfa 1, y opcionalmente una cantidad de agente inmunosupresor.

La presente invención contempla un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y timosina alfa 1, y opcionalmente, un agente inmunosupresor, contenido dentro de dicho material de envasado, en el que la alfa timosina 1 es terapéuticamente eficaz para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped o las reacciones de rechazo de injertos en el trasplante de órganos, y donde el material de envasado comprende una etiqueta que indica que la timosina alfa 1 puede ser utilizada para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped o reacciones de rechazo de injerto en el trasplante de órganos.

De acuerdo con la presente invención la timosina alfa 1 y opcionalmente el agente inmunosupresor pueden ser administrados de forma separada o en forma de dosificación unitaria que comprende los ingredientes activos y, opcionalmente, disolventes o excipientes farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con la presente invención cuando la timosina alfa 1 y el agente inmunosupresor se administran de forma separada (es decir, 2 administraciones diferentes), dichos ingredientes activos se pueden administrar de forma secuencial (es decir, en el mismo momento) o secuencialmente de acuerdo con un horario sugerido en el etiquetado anteriormente mencionado.

En el uso de la invención, los términos "tratar" o "tratamiento" tienen el significado habitual, que incluye prevenir, prohibir, aliviar, inhibir, mejorar, detener, restringir, ralentizar o invertir el progreso, la activación o la reducción de la severidad de la GVHD.

En el uso de la invención, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto, que es capaz de llevar a cabo el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de timosina alfa 1, y, opcionalmente el agente inmunosupresor se administran en un esfuerzo para tratar la GVHD es aquella cantidad que se requiere para prevenir, prohibir, aliviar, mejorar, detener, restringir, retrasar o revertir la progresión, o reducir la gravedad de GVHD, y la dosis diaria a administrar dependerá, según el juicio del médico de atención primaria, del peso, la edad del sujeto y el estado general del paciente.

La presente invención también incluye métodos que emplean formulaciones farmacéuticas, que contienen, como ingrediente activo, timosina alfa 1, y, opcionalmente, un agente inmunosupresor, en asociación con vehículos farmacéuticos. Esas formulaciones y su fabricación serian conocidas para un experto en la técnica, véase, e. g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (16th ed.1980).

Las formulaciones se pueden preparar en una forma de dosificación unitaria del ingrediente activo. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de timosina alfa 1, y opcionalmente el agente inmunosupresor, calculado para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un adecuado excipiente farmacéutico.

La timosina alfa 1, y opcionalmente el agente inmunosupresor pueden ser administrados en forma de una composición farmacéutica en combinación con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuya proporción y naturaleza se determina por la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto en los vehículos y/o excipientes seleccionados, la ruta de administración elegida, y la práctica farmacéutica estándar.

Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica véase, e. g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (16th ed.1980).

El vehículo o excipiente puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido, que puede servir como vehículo o medio para el ingrediente activo. Los vehículos o excipientes adecuados son bien conocidos en la técnica. La composición farmacéutica puede adaptarse para uso oral, inhalación, parenteral, o tópico y puede administrarse al paciente en forma de comprimidos, cápsulas, aerosoles, inhaladores, supositorios, solución, suspensiones, liposomas o similares.

Discusión de las figuras:

Figura 1

La timosina alfa 1 se expande las DCp a partir de precursores de la médula ósea y activa el catabolismo del triptófano

(A) Expresión en superficie de CD11c, CD11b y B220 en DC derivadas de médula ósea de ratones C57BL6, TLR9-/- o IFN-aβR-/- y cultivadas con GM-CSF/IL-4 (DC-GM) o FLT3L (DC-FL) en presencia de timosina alfa 1 (+) o péptido mezclado (). Se indica porcentaje de células doble positivas.

(B) La producción de citocinas (ELISA) por DC-GM o DC-FL cultivadas en medio libre de suero ($1x10^6$ células/ml) con conidios de Aspergillus no opsonizados ($5x10^5$/ ml) durante 24 horas. Se añadió el inhibidor de IDO 1-MT a 2 µM. Los datos son los resultados agregados de tres experimentos independientes. Los límites de detección (pg/ml) de los ensayos fueron <16 para la IL-12p70 y <12 para la IL-10.

(C) Aumento de la función y expresión de IDO en DC derivadas como en (A). Las células fueron evaluadas para la expresión de proteína IDO por inmunotransferencia y para la producción de quinurenina. Los controles positivos y negativos consistieron en IDO células transfectantes MC24 y que simulan ser transfectantes MC22 respectivamente, que expresan proteínas IDO (no se muestra en la figura).

Los datos son promedios ± DS de muestras por triplicado en un experimento representativo de los tres.

Figura 2

IDO+DC inducidas por timosina alfa 1, activan células T reg in vitro

(A) Frecuencia de las células T CD4+ esplénicas que producen IFN-.-/IL-10 activadas por DC-GM o DC-FL tratadas con timosina alfa 1 pulsadas con Aspergillus. 1-MT estaba presente en los cultivos seleccionados. Las placas se leyeron con el Sistema Reader AID-EliSpot (Amplimedical). Los valores son promedios ± DS por 10^6 células de las muestras de los experimentos 3-5, calculados usando réplicas de diluciones seriadas dobles de las células. (*) P <0.05, células no expuestas frente a las células expuestas a conidios; (**) P <0,05, células no expuestas frente a células expuestas a timosina.

(B) El análisis fenotípico de las células CD4+ cultivadas solas (-) o como en (A). Los números representan el porcentaje de células positivas dobles.

Figura 3

DC tratadas con timosina alfa 1 protegen de aspergilosis en HSCT experimental

Ratones C57BL/6 irradiados letalmente recibieron = 2×10^6 células de médula ósea alogénicas con disminución del número de células T de ratones BALB/c 2 semanas antes de la inyección intratraqueal de 2×10^8/80 µl de disolución salina de conidios de Aspergillus. Uno y siete días después del trasplante, los ratones recibieron GM-DC o GMFL pulsadas con Aspergillus cultivadas en timosina alfa 1, por vía intraperitoneal.

La resistencia a la infección se evaluó en términos de MST (tiempo medio de supervivencia en días) y el crecimiento de hongos en los pulmones (µg/ contenido de glucosamina en órgano, las barras que indican los errores estándar) 3 días después de la infección o en el momento de la muerte (A). También se muestra en la figura la patología inflamatoria pulmonar (B), la aparición de reactividad GVHD (C) y la susceptibilidad a la infección (D) en presencia de las células T del donante. (B) Se preparan secciones teñidas con ácido peryódico de Schiff a partir de pulmones de ratones infectados 3 días antes con conidios de Aspergillus o bien no tratados (Ninguno) o que reciben diferentes tipos de DC. Se observaron signos graves de daño de la pared bronquial y necrosis y escaso reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones de los ratones no tratados o de los tratados con DC-GM, en oposición a los ratones que recibieron DC-GM o DC-FL tratadas con timosina alfa 1 o, cuyos pulmones se caracterizaron por pocos

infiltrados de curación de células inflamatorias sin evidencia de daño de la pared bronquial y respuesta inflamatoria. Ampliación x 200. (*) P <0,05, los ratones que recibieron DC vs ratones no tratados. (C) Las puntuaciones de patología para los ratones representativos que reciben, con el injerto, números diferentes de células T del donante solas o junto con diferentes tipos de DC. El grado de GVHD sistémica se evaluó mediante un sistema de puntuación que contabiliza cambios en cinco parámetros clínicos: la pérdida de peso, la postura (encorvado), la actividad, la textura de la piel, y la integridad de la piel (índice máximo = 10). (*) P <0.05, ratones que recibieron células T + DC-GM timosina alfa 1 frente a las células T + DC-GM sin tratar. (D) La supervivencia a la infección en los ratones tratados como en (C).

Figura 4

DC inducidas por timosina alfa 1 activan las respuestas antifúngicas de Th1/T reg en vivo

Patrones de las respuestas inflamatorias/Th/T reg 3 días después de la infección en los ratones tratados como en leyenda de la Figura 2.

(A) Los niveles de TNF-a/IL-10 fueron evaluados por ELISA específico en homogeneizado de pulmón y IFN-./IL-4 fueron evaluados en células T CD4+ de TLN cultivadas al mismo tiempo con DC pulsadas con Aspergillus. Las barras indican los errores estándar. Las células T CD4+CD25+ de los TLN que producen IL-10 o TGFβ fueron evaluadas por ensayo de ELISPOT. Los resultados se expresan como el promedio del número de células productoras de citoquinas (± DS) por 2 x 10^5 células. * P <0,05, ratones tratados con DC frente a los no tratados. (**) P <0.05, DC tratadas con timosina alfa 1 frente a DC sin tratar.

(B) ARN total extraído a partir de células T CD4+ recién purificadas a partir de los TLN de ratones tratados o no tratados (Ninguno). Las expresiones de los diferentes RNAm en cada población de células se determinaron por RT-PCR. La expresión de un gen constitutivo, RNAm de Gapdh, se utilizó como control interno. Los datos mostrados son resultados representativos de tres experimentos.

(C) Análisis fenotípico de las células aisladas de pulmón o de los TLN de los ratones infundidos o no (Ninguno) con diferentes tipos de DC, (-) indica los ratones no infectados, no tratados. Las células T CD4+ se hicieron reaccionar secuencialmente con mAbs anti-CD25 conjugados con PE (PC61) y mAbs anti-CD69 conjugados con FITC (clonHI.2F3). Los números representan el porcentaje de células positivas sobre el total de células analizadas. Se utilizó un control de tinción de células con Ab irrelevante para obtener los valores de fluorescencia de fondo. Los histogramas son representativos de uno de cada cuatro experimentos independientes.

Figura 5

Las células T reg inducidas por timosina alfa 1 inhiben la alorreactividad

(A) Linfocitos T CD4+ murinos de los TLN de ratones trasplantados fueron estimulados con esplenocitos alogénicos irradiados, DC autólogas esplénicas estimuladas con conidios o Concanavalina A. La proliferación de las células T se evaluó en un ensayo MLR de 5 días y se midió la incorporación de timidina H^3 durante las últimas 8 horas, (*) P <0,05, ratones donantes frente a trasplantados. (**) P <0,05, ratones tratados con células T y/o DC frente a ratones no tratados. (***) P <0.05, DC tratadas con timosina alfa 1 frente a DC sin tratar. (B y C) la actividad proliferativa y producción de IFN-. por células T CD4+CD25- purificadas de ratones receptores frente a DC esplénicas autólogas pulsadas con conidios de Aspergillus (B) o DC esplénicas alogénicas (BALB/c) (C) en presencia de células T CD4+CD25+ de los TLN de ratones receptores que reciben DC-FL (a) o DC-GM timosina alfa 1 (b). Los datos mostrados son resultados representativos de uno de tres experimentos independientes. (*) P <0.05, reactividad específica del aloantígeno o Aspergillus frente a las células no estimuladas. (**) P <0.05, DC tratadas con timosina alfa 1 con frente no tratadas. (D) neutrófilos peritoneales (PMN) expuestos a los conidios en reposo en presencia de las células T CD4+CD25+ de pulmón de DC-FL tratadas (a) o ratones tratados con DC-GM timosina alfa 1 (B) durante 60 min (para la producción de oxidantes, expresada en nanomoles O2-/10^6 células) o 24 horas para la producción de citoquinas (pg/ml mediante ELISA). (*) P <0,05, PMN expuestos conidios frente a no expuestos. (**) P <0,05, PMN expuestos a T reg frente no expuestos. (***) P <0.05, T reg CD25+a) frente a CD25+b)

Figura 6

Timosina alfa 1 promueve la movilización y la activación antifungica de Th1/T reg de DC humanas

(A) Expresión en superficie de DC11c, CD1a y CD123 en DC derivadas de células CD14+ periféricas de diferentes donantes con GM-CSF/IL-4 (DC-GM) o FLT3L (DC-FL) en presencia de timosina alfa 1. Se indica el porcentaje de células positivas.

(B) Fagocitosis de los conidios por DC-GM o DC-FL expuestas (+) o no (-) a

timosina alfa 1 de siete receptores de células T con disminución del número de HSCT haploidénticas. Los datos son las medias ± SE y se expresaron como % internalización (números dentro de las figuras). (*) P <0,05, células tratadas con timosina alfa 1 frente a las células no tratadas.

(C) La producción de citocinas (pg/ml por ELISA) por DC inducidas con timosina alfa 1 de donantes sanos cultivadas en un medio libre de suero (1 x 10^6 células/ml) con conidios de Aspergillus no opsonizados (5 x 10^5/ml) o 10 µg /ml de Zymosan 2 µg / ml de CpG-B ODN 2006 durante 24 horas. Los datos mostrados son resultados agregados de tres experimentos independientes y se presentan en el promedio ± DS. Los límites de detección (pg/ml) de los ensayos fueron: <3 para IL-12p70, <5 para IL-10, y <3 ng/ml para IFN-a.

(D) La producción de citoquinas por los clones de células T CD4+ específicas de Aspergillus de sangre periférica de células de donantes sanas en respuesta a DC tratadas con α1.- pulsadas con Aspergillus. Las barras indican los errores estándar. Los límites de detección (pg/ml) de los ensayos fueron: <0,5 para IL-4 e IFN-.. * P <0,05, células estimuladas por conidios frente a no estimuladas. (**) P <0,05, células expuestas a timosina alfa l frente a las no expuestas.

(E) Frecuencia de clones de células T específicas aloreactivas o específicas de Aspergillus que responden a los diferentes tipos de DC pulsadas por hongos o DC no pulsadas, respectivamente, procedentes de donantes sanos o de pacientes trasplantados. Los clones en crecimiento se evaluaron para la especificidad después de 2 días de estimulación con DC. (*) P <0,05, DC-GM frente a las células de sangre periférica (-). (**) P <0.05, DC-HSCT frente a todas las demás DC. nd, no realizado.

REIVINDICACIONES

1. Timosina alfa 1 para uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de órganos en mamíferos.

2. Timosina alfa 1 para uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero es un paciente humano.

3. Timosina alfa 1 para uso según la reivindicación 1, en donde el paciente está en un régimen de acondicionamiento mieloablativo.

4. Timosina alfa 1 para uso según la reivindicación 1, en donde el paciente está en un régimen de acondicionamiento no mieloablativo.

5. Timosina alfa 1 para uso según la reivindicación 1, en donde la timosina alfa 1 se administra al paciente en una cantidad farmacéuticamente eficaz dentro de un intervalo de tiempo predeterminado antes y/o después del trasplante.

6. Timosina alfa 1 para uso según la reivindicación 1, en donde la timosina alfa 1 se administra en combinación con un agente inmunosupresor seleccionado de entre el grupo que comprende prednisona, metilprednisolona, ciclofosfamida, ciclosporina A, FK506, talidomida, azatioprina, Daclizumab, Infliximab, MEDI-205, abx-cbl o ATG.

Figura 1A

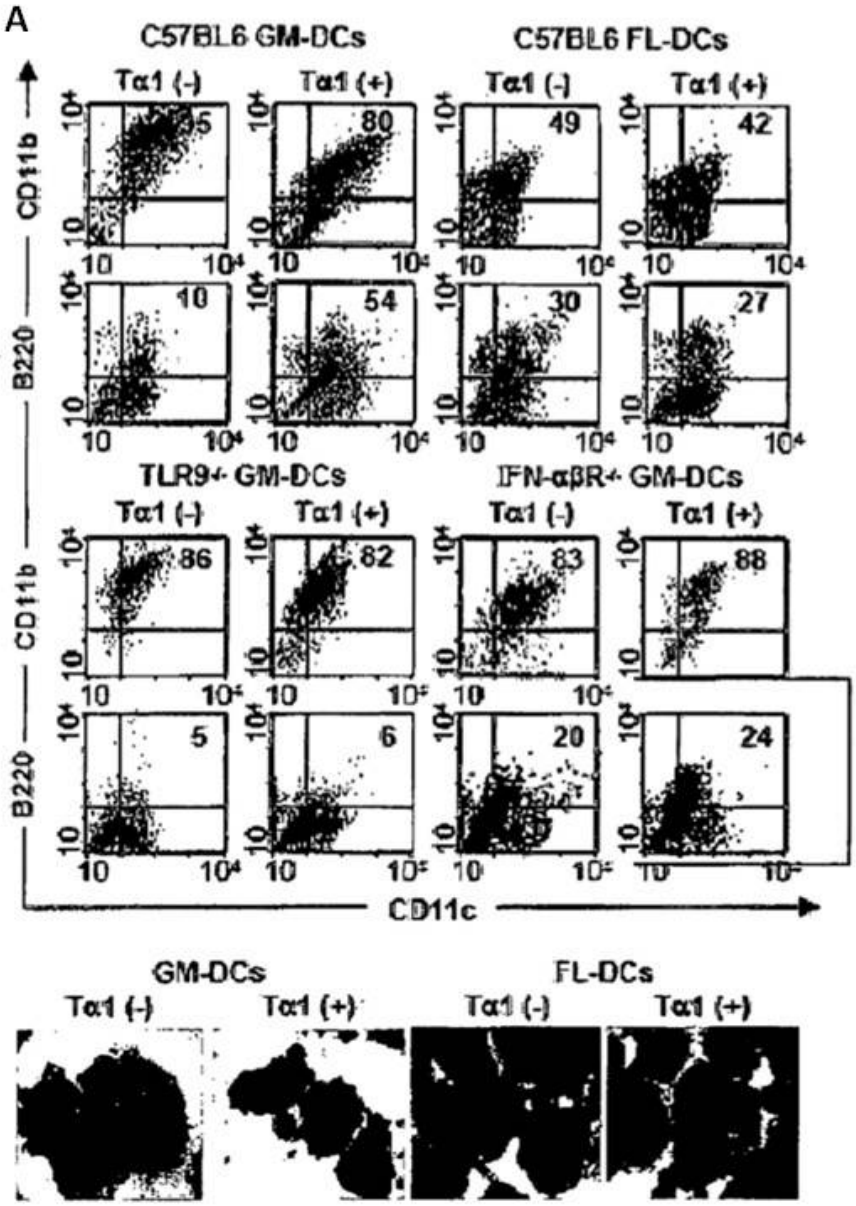

A
C57BL6 GM-DCs
C57BL6 FL-DCs
Tα1 (-)
Tα1 (+)
Tα1 (-)
Tα1 (+)
CD11b
B220
5
80
49
42
10
54
30
27
TLR9-/- GM-DCs
IFN-αβR-/- GM-DCs
Tα1 (-)
Tα1 (+)
Tα1 (-)
Tα1 (+)
CD11b
B220
86
82
83
88
5
6
20
24
CD11c
GM-DCs
FL-DCs
Tα1 (-)
Tα1 (+)
Tα1 (-)
Tα1 (+)

Figura 1B,C

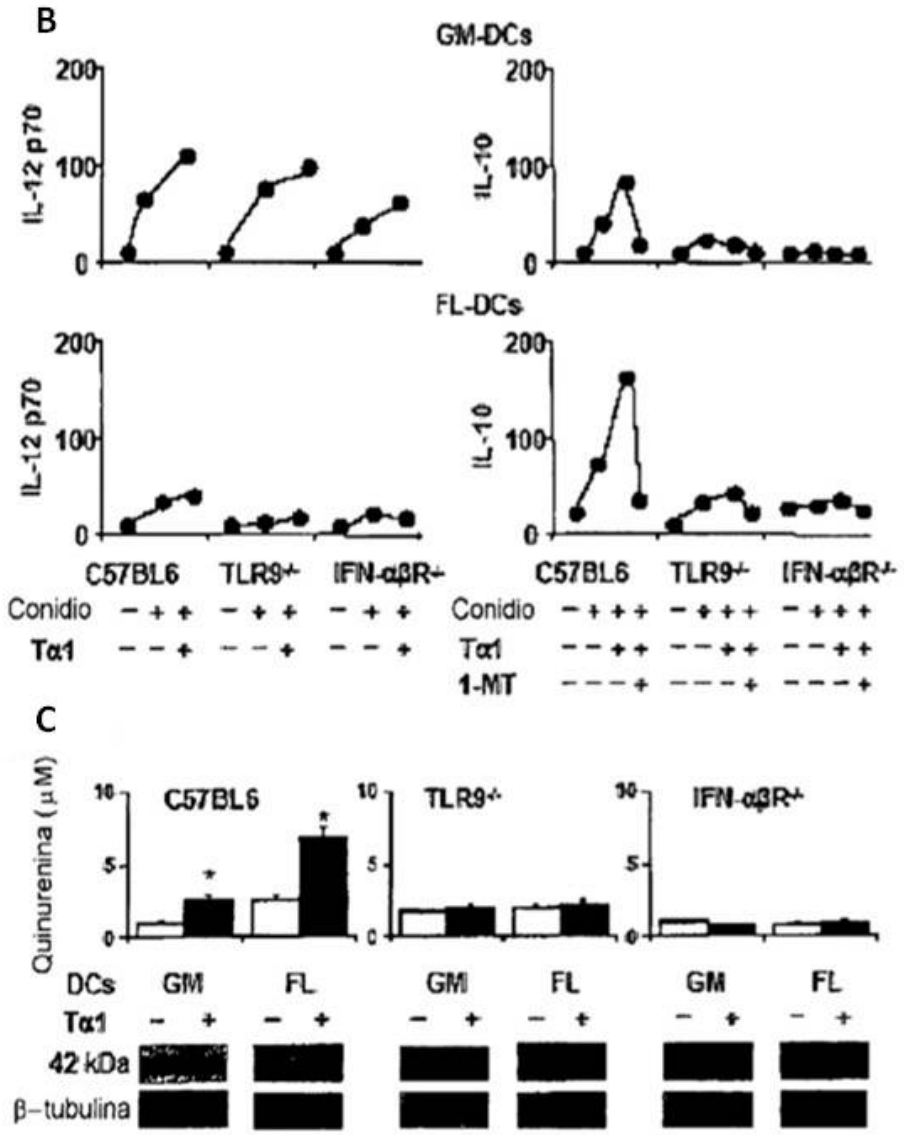

B
GM-DCs
IL-12 p70
IL-10
FL-DCs
C57BL6
TLR9-/-
IFN-αβR-/-
Conidio
Tα1
1-MT
C
Quinurenina (μM)
C57BL6
TLR9-/-
IFN-αβR-/-
DCs
GM
FL
Tα1
42 kDa
β-tubulina

Figura 2

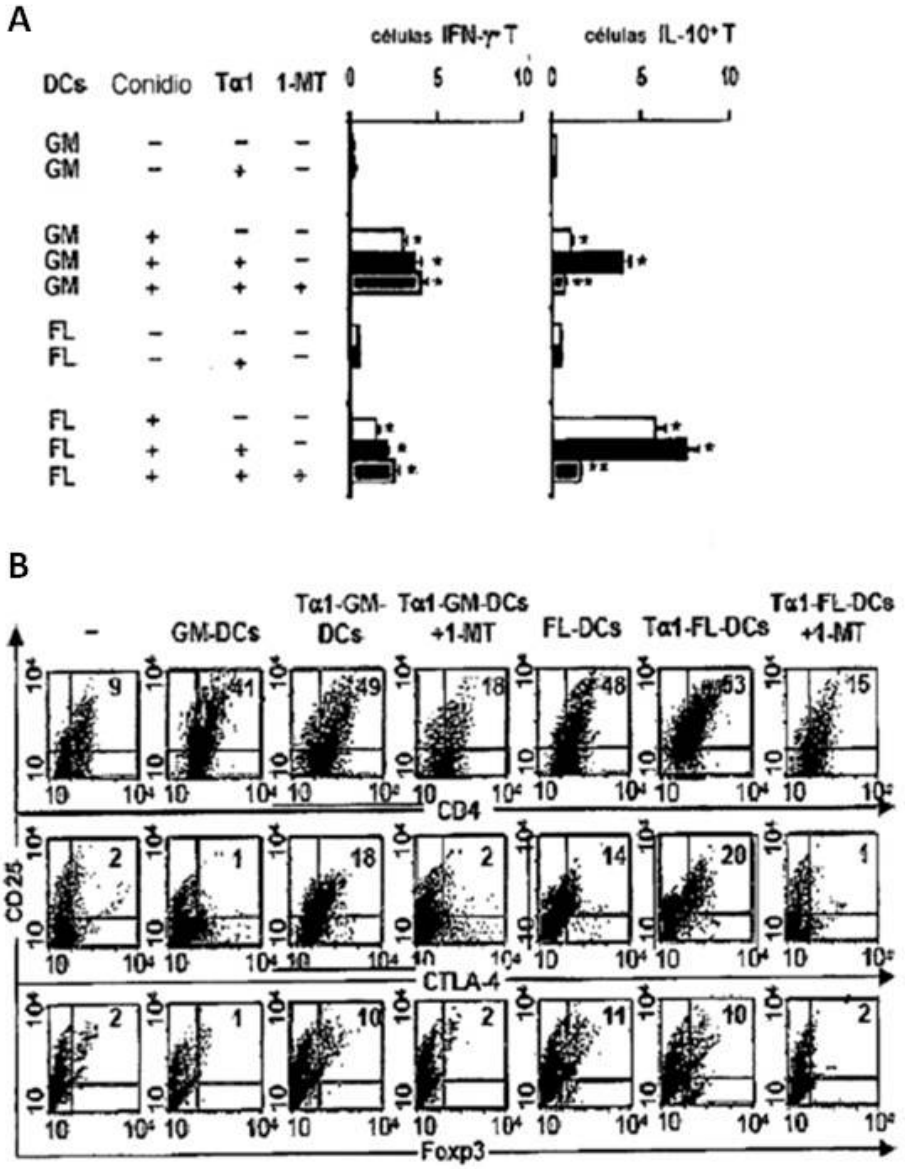

A
células IFN-γ+ T
células IL-10+ T
DCs
Conidio
Tα1
1-MT
GM
FL
B
GM-DCs
Tα1-GM-DCs
Tα1-GM-DCs +1-MT
FL-DCs
Tα1-FL-DCs
Tα1-FL-DCs +1-MT
CD4
CD25
CTLA-4
Foxp3

Figura 3

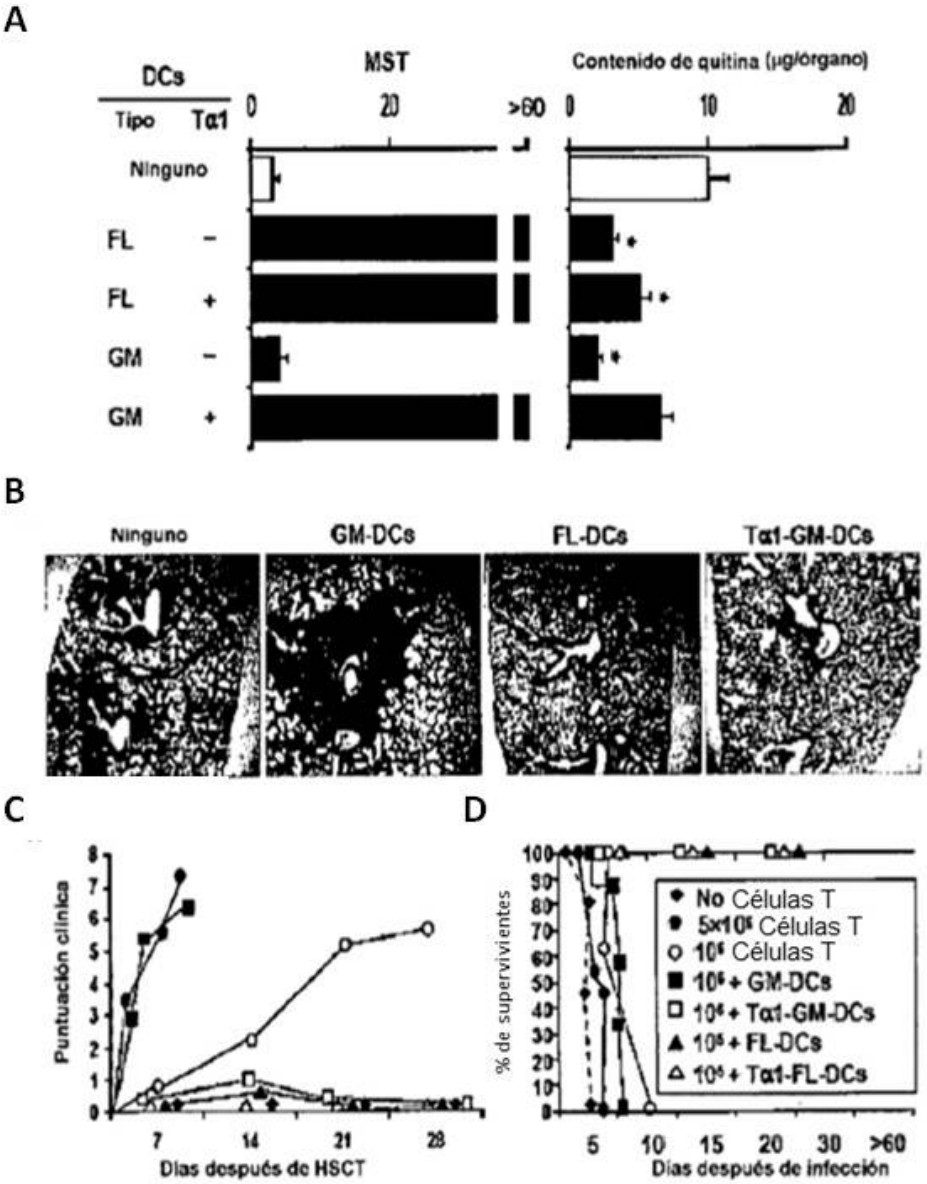

A
DCs
Tipo
Tα1
MST
0
20
>60
Contenido de quitina (µg/órgano)
0
10
20
Ninguno
FL −
FL +
GM −
GM +
B
Ninguno
GM-DCs
FL-DCs
Tα1-GM-DCs
C
Puntuación clínica
Días después de HSCT
D
% de supervivientes
No Células T
5x10⁶ Células T
10⁶ Células T
10⁶ + GM-DCs
10⁶ + Tα1-GM-DCs
10⁶ + FL-DCs
10⁶ + Tα1-FL-DCs
Días después de infección

Figura 4

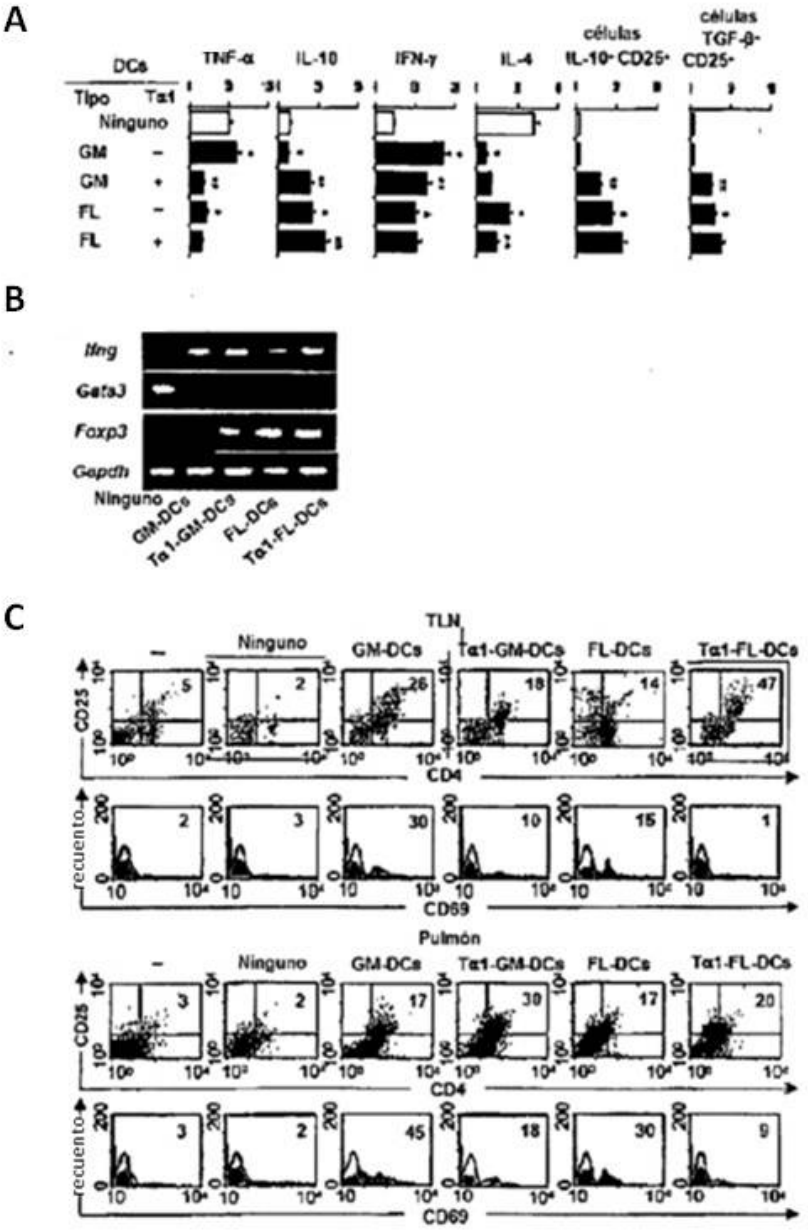
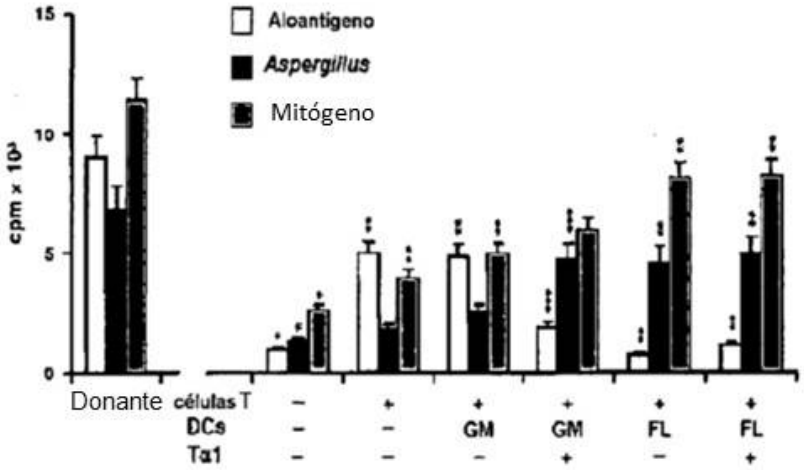

A
DCs
TNF-α
IL-10
IFN-γ
IL-4
células IL-10+ CD25+
células TGF-β+ CD25+
Tipo
Tα1
Ninguno
GM
FL
B
Ifng
Gata3
Foxp3
Gapdh
Ninguno
GM-DCs
Tα1-GM-DCs
FL-DCs
Tα1-FL-DCs
C
TLN
Ninguno
GM-DCs
Tα1-GM-DCs
FL-DCs
Tα1-FL-DCs
CD25
CD4
recuento
CD69
Pulmón

Figura 5

A



B

Figura 5C

Figura 5D

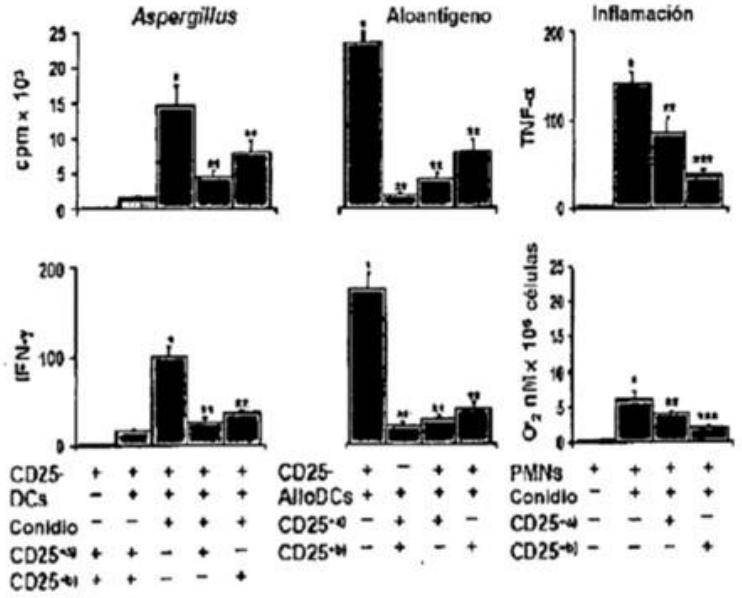


Figura 6A, B

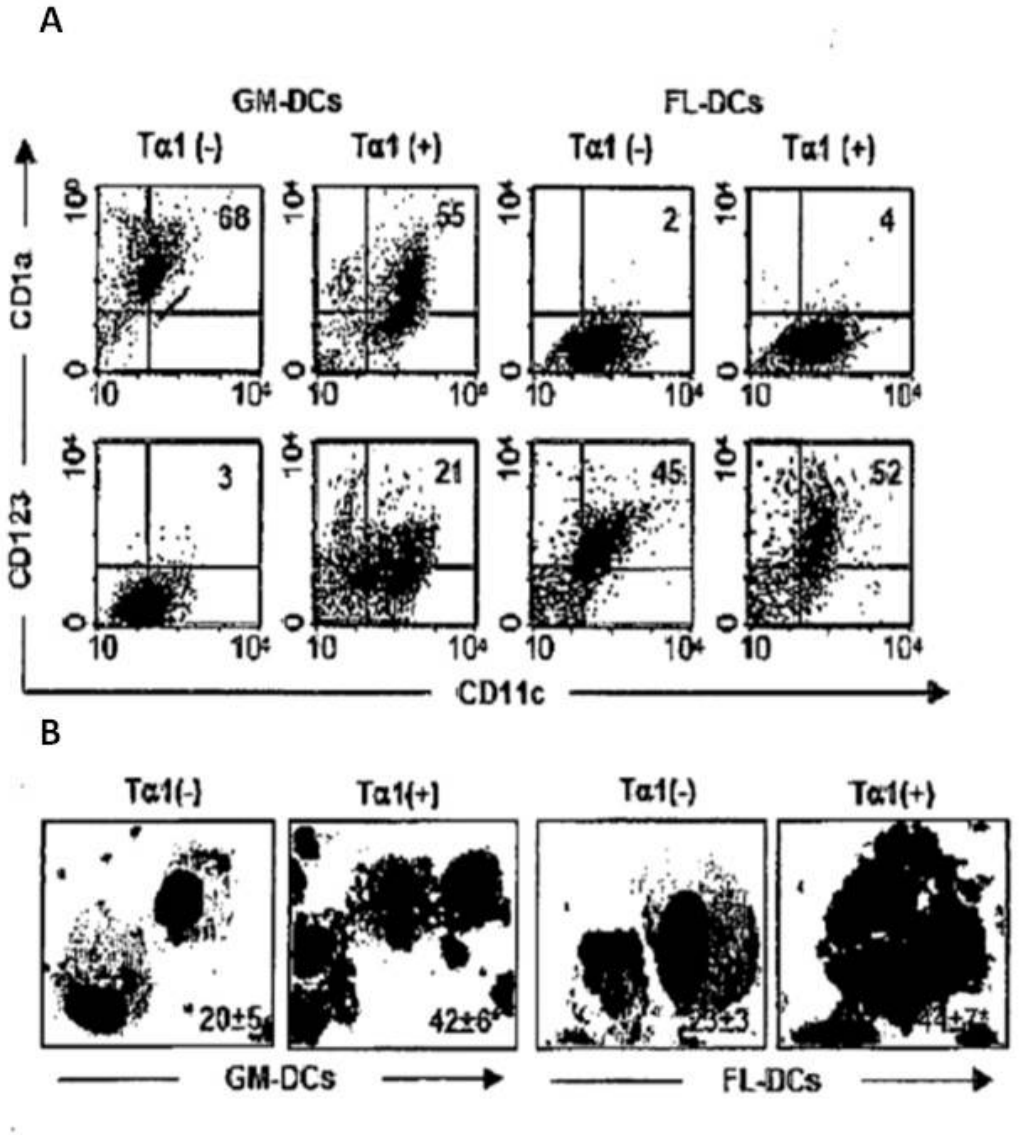
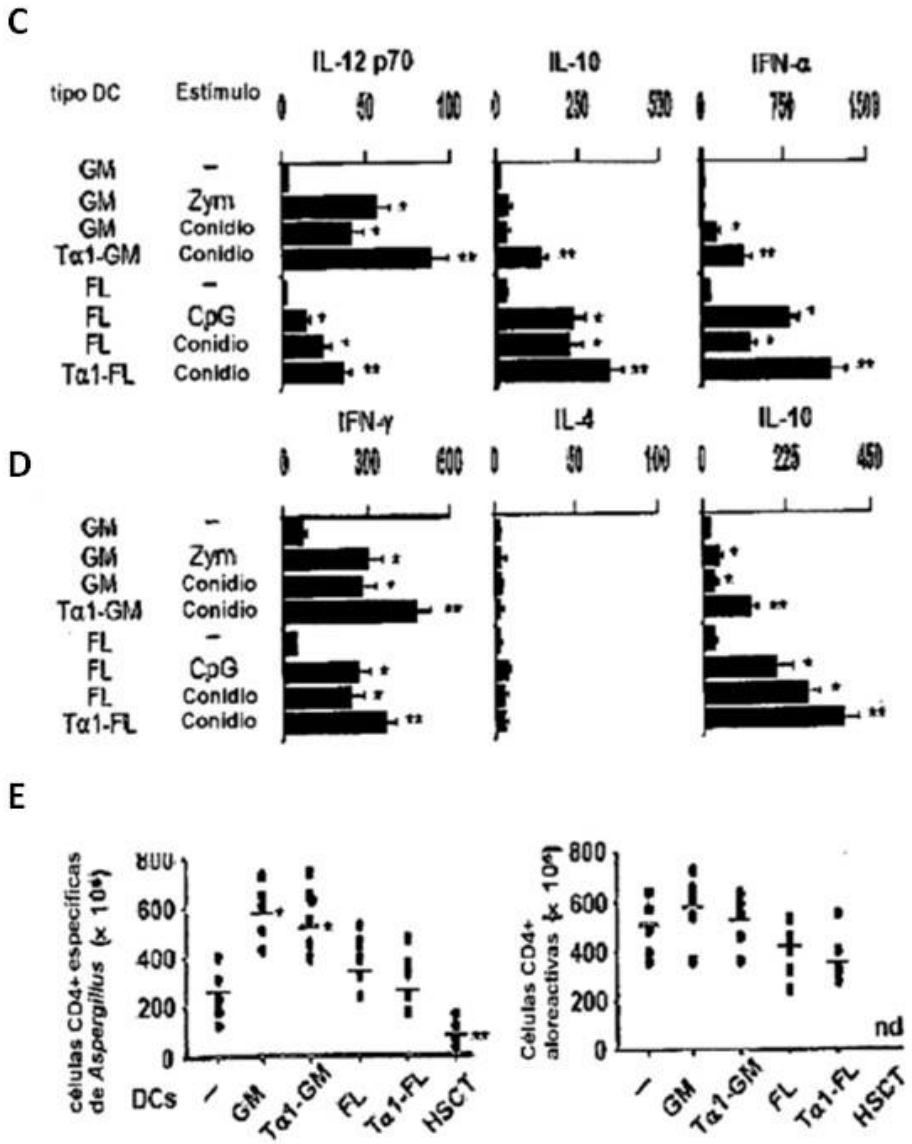

A
GM-DCs
FL-DCs
Tα1 (-)
Tα1 (+)
Tα1 (-)
Tα1 (+)
CD1a
CD123
CD11c
68
55
2
4
3
21
45
52
B
Tα1(-)
Tα1(+)
Tα1(-)
Tα1(+)
20±5
42±6
GM-DCs
FL-DCs

Figura 6C, D, E


C
IL-12 p70
IL-10
IFN-α
tipo DC
Estímulo
GM
GM
GM
Tα1-GM
FL
FL
FL
Tα1-FL
Zym
Conidio
CpG
D
IFN-γ
IL-4
IL-10
E
células CD4+ específicas de Aspergillus (x 10⁴)
Células CD4+ aloreactivas (x 10⁴)
DCs
GM
Tα1-GM
FL
Tα1-FL
HSCT
nd