

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 861**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/IL2009/001014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO2010049935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09764302 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2365823**

54 Título: **Células T de memoria central anti-terceros, métodos de producción de las mismas y uso de las mismas en trasplante y tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

30.10.2008 US 193137 P
12.06.2009 US 213482 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LTD. (100.0%)
At The Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;
OPHIR, ERAN;
EIDELSTEIN, YAKI y
BACHAR-LUSTIG, ESTHER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 615 861 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 T de memoria central anti-terceros, métodos de producción de las mismas y uso de las mismas en trasplante y tratamiento de enfermedades

5 Campo y antecedentes de la invención

10 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células anti-terceros que no inducen EICH que comprenden fenotipo de linfocitos T de memoria central y, más particularmente, pero no exclusivamente, a la generación de las mismas y al uso de las mismas en trasplante y en el tratamiento de enfermedades.

15 El trasplante de médula ósea (MO) ofrece un tratamiento curativo para muchos pacientes con neoplasias hematológicas y otros trastornos hematológicos. Sin embargo, el injerto de MO contiene células T del donante que responden a los antígenos del huésped (Ag) y causan enfermedad de injerto contra huésped (EICH) multisistémica. A principios de los años 80, el trasplante de médula ósea (TMO), sin el efecto perjudicial de EICH, se demostró en los entornos haploidénticos (tres loci de ALH emparejados erróneamente), en pacientes de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG). El problema de EICH, que es letal de forma casi uniforme en dichos entornos, se impidió completamente mediante disminución de células T.

20 Sin embargo, en pacientes de leucemia, el desenlace clínico de MO empobrecida en células T fue decepcionante, dado que el beneficio de la prevención de EICH estaba compensado por una tasa de rechazo de injerto incrementada marcadamente. Se demostró que el rechazo estaba mediado por células T derivadas del huésped resistentes a radioquimioterapia [Reisner et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. (1986) 83: 4012-4015]. Una manera de superar este problema es realizar TMO después de acondicionamiento supra-letal e inactivación funcional de células T del huésped usando fármacos inmunosupresores. No obstante, esta estrategia está lastrada por infecciones oportunistas debido a la lenta reconstitución inmunitaria y las considerables toxicidades de los inmunosupresores.

25 Aunque en pacientes de leucemia de alto riesgo dicha mortalidad asociada a trasplante puede ser aceptable, sería intolerable si se aplicara a pacientes con una esperanza de vida larga. Por lo tanto, el uso de acondicionamiento de intensidad reducida, con ablación inmunitaria menos severa, para permitir el prendimiento de injerto de MO empobrecida en células T (MOET), que está asociado con un riesgo reducido de EICH, está justificado. El establecimiento que quimerismo de tipo donante en dicho acondicionamiento reducido representa el objetivo más deseable en biología de trasplante, dado que está asociado, en general, con tolerancia duradera hacia células o tejidos del donante original. No obstante, los marcados niveles de células inmunitarias del huésped que sobreviven a los regímenes preparatorios moderados, representan una barrera difícil para el prendimiento de células del donante.

30 Un enfoque para superar el rechazo de células madre hematopoyéticas alogénicas utilizó grandes dosis de células de MO. En primer lugar se demostró en modelos en roedor que una "megadosis" de trasplante de MOET puede superar el rechazo de injerto mediado por células T [Lapidot et al., Blood (1989) 73: 2025-2032; Bachar-Lustig et al., Nat Med. (1995) 1: 1268-1273; Uharek et al., Blood (1992) 79: 1612-1621]. Sin embargo, un incremento significativo en el inóculo de MO ha sido difícil de conseguir en seres humanos. Para superar este problema se ha usado el factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G), que facilita la movilización de células madre hematopoyéticas (CMH, células CD34+ en seres humanos) desde la MO, para incrementar la producción de CMH recogidas de la sangre y estas CMH se suplementaron a la MOET convencional [Aversa et al., N Engl J Med. (1998) 339: 1186-1193; Aversa et al., J Clin Oncol. (2005) 23: 3447-3454; Reisner y Martelli, Immunol Today (1999) 20: 343-347; Handgretinger et al., Bone Marrow Transplant. (2001) 27: 777-783].

35 Los trasplantes con "megadosis" de CD34 generaron preguntas interesantes sobre cómo estas células superan la barrera presentada por precursores de linfocitos T citotóxicos del huésped (LTC-p). Esta pregunta fue respondida, en parte, por el descubrimiento de que células dentro de la fracción de CD34 están dotadas de potente actividad de veto [Gur et al., Blood (2005) 105: 2585-2593; Gur et al., Blood (2002) 99: 4174-4181; Rachamim et al., Transplantation (1998) 65: 1386-1393]. Otros tipos de células también han demostrado mediar en la actividad de veto, incluyendo linfocitos T (por ejemplo LTC CD8⁺), linfocitos citolíticos naturales y células dendríticas. La comparación directa de la reactividad de veto de diversos tipos celulares reveló que los LTC comprenden el efecto de veto más potente [Reich-Zeliger et al., J Immunol. (2004) 173: 6654-6659].

40 Un enfoque desarrollado para generar LTC de veto sin reactividad de ICH fue descrito por Reisner y colaboradores, en el que se estimularon LTC contra estimuladores de terceros en ausencia de IL-2 exógena. Este enfoque se basaba en la observación de que solamente LCTp fueron capaces de sobrevivir al empobrecimiento de IL-2 en el cultivo primario. Este método se demostró in vitro e in vivo para reducir la reactividad de ICH a partir de los LTC de veto anti-terceros [publicación PCT N.º WO 2001/049243, Bachar-Lustig et al., Blood. 2003; 102: 1943-1950; Aviner et al., Hum Immunol. (2005) 66: 644-652]. La introducción de estos LTC de veto anti-terceros en un receptor (junto con un trasplante) impedía el rechazo de injerto sin inducir EICH (publicación PCT N.º WO 2001/049243).

65 Se han contemplado diversos enfoques para trasplante de injerto sin rechazo de injerto y/o enfermedad de injerto contra huésped, algunos se resumen a continuación.

5 La publicación PCT N.º WO 2007/023491 desvela el uso de células tolerogénicas para reducir o prevenir el rechazo de injerto de un injerto no singénico en un sujeto. Las células tolerogénicas desveladas (por ejemplo células CD4⁺CD25⁺) pueden derivarse de cualquier donante que es no singénico tanto con el sujeto como con el injerto (células tolerogénicas "de terceros"). El injerto (por ejemplo médula ósea) puede derivarse de cualquier donante de injerto que es alogénico o xenogénico con el sujeto.

10 La publicación PCT N.º WO 2002/102971 desvela el uso de células progenitoras hematopoyéticas cultivadas (CPH) que comprenden actividad de veto potenciada para inducir tolerancia a un trasplante trasplantado a partir de un donante en un receptor. Las células tolerogénicas desveladas expresan preferentemente CD33 y se administran antes de, conjuntamente con o después del trasplante del trasplante (por ejemplo trasplante de células u órganos).

15 La publicación PCT N.º WO 2002/043651 desvela el uso de una población no inductora de EICH de células efectoras inmunitarias para el tratamiento de enfermedades. Con el fin de llegar a la población no inductora de EICH de células efectoras inmunitarias, una primera población de células (por ejemplo linfocitos T) se cocultivan con una segunda población de células que no son singénicas con el sujeto y no son singénicas con la primera población de células (por ejemplo linfocitos B infectados con VEB) en condiciones que incluyen carencia de IL-2 seguida por suplementación con IL-2. Las células efectoras inmunitarias resultantes pueden usarse para tratar enfermedades tales como enfermedades malignas, enfermedades víricas y enfermedades autoinmunitarias.

20 La patente de Estados Unidos N.º 6.759.035 desvela métodos de inhibición del rechazo de injerto e inducción de tolerancia a células T en una recepción de trasplante de órgano sólido. Los métodos desvelados comprenden retirar células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de un donante y un receptor, cultivar las células del donante y el receptor juntas en presencia de un compuesto que induce actividad supresora de células T (por ejemplo TGF- β , IL-15 e IL-2), y administrar las células T supresoras del receptor al receptor junto con el trasplante para impedir que las células T del receptor destruyan células del donante, induciendo de este modo tolerancia y supervivencia a largo plazo del trasplante.

30 La patente de Estados Unidos N.º 6.803.036 desvela métodos para tratar células de donante para mejorar enfermedad de injerto contra huésped en un paciente receptor. Los métodos desvelados comprenden retirar CMSP de un donante y tratar las células con una composición supresora (por ejemplo IL-10, IL-2, IL-4, IL-15 y TGF- β) durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia a células T. Las células se introducen a continuación en un paciente receptor. Las células tratadas pueden añadirse a células madre del donante antes de la introducción en el paciente.

35 Sumario de la invención

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen EICH que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células que inducen tolerancia y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de un trasplante.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de la población de células aislada de la reivindicación 1, para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita.

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de la población de células aislada de la reivindicación 1, como un tratamiento adyuvante para un trasplante de células o de tejido en un sujeto, en el que el sujeto necesita un trasplante de células o de tejido.

50 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un sujeto que necesita un trasplante de células o de tejido, comprendiendo el método: (a) trasplantar un trasplante de células o de órganos en el sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células aislada de la reivindicación 1, tratando de este modo al sujeto.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además acondicionar al sujeto en condiciones subletales, letales o supraletales antes del trasplante.

60 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de generación de la población de células aislada de la reivindicación 1, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros en condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH; y (b) cultivar las células que resultan de la etapa (a) en presencia de IL-15 en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden un cultivo derivado de citocinas.

- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden al menos 2 días de cultivo.
- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden IL-7 y/o IL-21.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden un entorno libre de antígenos.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden al menos 14 días del cultivo.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el antígeno o antígenos de terceros se seleccionan entre el grupo que consiste en células de terceros, un antígeno celular, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un extracto de proteína, una proteína purificada y un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas o no autólogas.
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células de terceros son células alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto y/o donante.
- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células alogénicas son células estimuladoras seleccionadas entre el grupo que consiste en células purificadas a partir de linfocitos de la sangre periférica, bazo o ganglios linfáticos, LSP movilizados por citocinas y células dendríticas presentadoras de antígenos expandidas in vitro (CPA).
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas son alogénicas con respecto al sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas son xenogénicas con respecto al sujeto.
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad maligna, una enfermedad vírica y una enfermedad autoinmunitaria.
- 35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población de células aislada se administra antes de, conjuntamente con o después del trasplante de células o de tejido.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprende un distintivo CD8⁺, CD62L⁺, CD45RA⁻, CD45 RO⁺.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprende CD8⁺/CD62L⁺/CD45RO⁺/L-selectina⁺/CD45RA⁻.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos el 50 % de la población de células aislada tienen el distintivo.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los ganglios linfáticos comprenden ganglios linfáticos periféricos.
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los ganglios linfáticos comprenden ganglios linfáticos mesentéricos.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un sujeto humano.
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante de células o de tejido se deriva de un donante seleccionado entre el grupo que consiste en un donante alogénico ALH idéntico, un donante alogénico no ALH idéntico y un donante xenogénico.
- 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el sujeto y el donante son ambos seres humanos.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen EICH que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) se genera: (a) poniendo en contacto células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros en condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH; y (b) cultivando las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).
- 65

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden un cultivo derivado de citocinas.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden al menos 2 días de cultivo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden IL-7 y/o IL-21.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden al menos 14 días del cultivo.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden un entorno libre de antígenos.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el antígeno o antígenos de terceros se selecciona entre el grupo que consiste en células de terceros, un antígeno celular, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un extracto de proteína, una proteína purificada y un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas o no autólogas.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células de terceros son células alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto y/o donante.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células alogénicas o xenogénicas son células estimuladoras seleccionadas entre el grupo que consiste en células purificadas a partir de linfocitos de la sangre periférica, bazo o ganglios linfáticos, LSP movilizados por citocinas y células dendríticas presentadoras de antígenos expandidas in vitro (CPA).

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas son alogénicas con respecto al sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas son xenogénicas con respecto al sujeto.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población de células aislada se genera: (a) poniendo en contacto células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros durante al menos dos días en un cultivo derivado de citocinas en condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH; y (b) cultivando las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 durante al menos 14 días en un entorno libre de antígenos en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo de las células resultantes de la etapa (a) comprende IL-7 y/o IL-21.

45 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayos de realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, que incluye definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

55 En el presente documento se describen algunas realizaciones de la invención, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y con fines de descripción ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica realizaciones de la invención.

60 En los dibujos:

65 Las figuras 1A-D son fotografías que representan patrones de anidamiento de LTC de veto anti-terceros en comparación con células T indiferenciadas singénicas y alogénicas, 36 horas después de la inoculación. Ratones FVB (H-2^d) irradiados letalmente recibieron un aloinjerto de médula ósea de BALB/C (H-2^b) empobrecido en células T, 5×10^6 , (figura 1A) y 10^4 células T singénicas (figuras 1C-D). Además, los ratones receptores

recibieron 2×10^6 CTH indiferenciadas marcadas con DIR singénicas (figura 1B), 7×10^6 células T marcadas con DIR alogénicas indiferenciadas (figura 1C) o 7×10^6 LTC de veto activadas anti-terceros alogénicos marcados con DIR (figura 1D).

Las figuras 2A-B son gráficos que representan que la privación de citocinas breve *in vitro* favorece la inducción de células T de memoria central (Tcm) mediante IL-15. Se estimularon esplenocitos de BALB/C o CB6 con esplenocitos de FVB irradiados durante 60 horas (2 días) o 6 días en ausencia de citocinas y se evaluaron para la expresión de CD62L por células T CD8+ usando análisis FACS (figura 2A). Posteriormente, células T CD8+ se seleccionaron positivamente y se cultivaron adicionalmente con rIL-2 (40 UI/ml) y se reactivaron con esplenocitos de FVB, con rIL-2 (40 UI/ml), o con rIL-15 (20 ng/ml) en entorno libre de Ag. Se añadieron medio fresco y citocinas cada dos días. El día 15 del cultivo, las células se evaluaron para porcentaje de células Tcm (CD44⁺CD62L⁺) usando análisis FACS (figura 2B).

La figura 2C es un diagrama de flujo que representa las etapas emprendidas para inducir el fenotipo Tcm de las células de la presente invención. Se estimularon esplenocitos de ratón con estimuladores de terceros irradiados durante 60 horas sin la adición de citocinas. Posteriormente, células T CD8+ supervivientes se seleccionaron positivamente y se cultivaron adicionalmente con rIL-15 (20 ng/ml) en un entorno libre de antígenos durante 14 días. Después de 14 días, el cultivo comprende aproximadamente un 70 % de células Tcm, tal como se indica en la figura 2B.

Las figuras 3A-B son fotografías que representan la presencia de células Tcm CD8⁺ CD62L⁺ en los ganglios linfáticos del huésped y en números más elevados en comparación con células LTC de veto (60 horas después de trasplante adoptivo). Ratones BALB/C (H-2^d) irradiados letalmente recibieron 5×10^6 células de aloinjerto (H-2^b) de médula ósea de C57BL/6 y 10^4 células T singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 10×10^6 células Tcm CD8⁺ marcadas con DIR (figura 3A) o células LTC de veto (H-2^{bd}, figura 3B). 60 horas después, se sacrificaron receptores seleccionados. Se tomaron imágenes ex-vivo usando IVIS.

Las figuras 4A-D son gráficos que representan la detección de células T_{CM} CD8⁺ CD62L⁺ en ganglios linfáticos tanto periféricos como mesentéricos y en mayores números en comparación con células LTC de veto (60 horas después de trasplante adoptivo). Ratones BALB/C (H-2^d) irradiados letalmente recibieron 5×10^6 células de aloinjerto (H-2^b) de médula ósea de C57BL/6 desnudos y 10^4 células singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 10×10^6 células T_{CM} CD8⁺ marcadas con DIR (figuras 4A-B) o células LTC de veto (H-2^{bd}, figura 4C-D). Dos días después, se sacrificaron receptores seleccionados y los ganglios linfáticos periféricos (figuras 4A y 4C) y los ganglios linfáticos mesentéricos (figuras 4B y 4D) se extrajeron y se machacaron. Las suspensiones celulares se analizaron mediante FACS y se seleccionaron tomando como base CD8.

Las figuras 5A-C son fotografías que representan la presencia de células T_{cm} CD62L⁺ en todos los órganos linfoides secundarios (OLS) y en números de células elevados, en contraste con células LTC de veto CD8⁺, que se concentran principalmente en el hígado y el bazo (6,5 días después de trasplante adoptivo). Ratones BALB/C (H-2^d) irradiados letalmente recibieron 5×10^6 células de aloinjerto (H-2^b) de médula ósea de C57BL/6 desnudos y 10^4 células T singénicas (control, figura 5A). A los ratones se les trasplantaron a continuación 10×10^6 células T_{CM} CD8⁺ marcadas con DIR (figura 5B) o células LTC de veto (H-2^{bd}, figura 5C). 6,5 días después, se sacrificaron los receptores seleccionados y se tomaron imágenes ex-vivo usando IVIS.

Las figuras 6A-K son gráficos que representan la presencia de células T_{cm} CD62L⁺ en todos los OLS y en cantidades de células elevadas, en contraste con células LTC de veto CD8+ (6,5 días después de trasplante adoptivo). Ratones BALB/C (H-2^d) irradiados letalmente recibieron 5×10^6 células de aloinjerto (H-2^b) de médula ósea de C57BL/6 desnudos y 10^4 células T singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 10×10^6 T_{CM} CD8⁺ marcadas con DIR (figuras 6A-E) o células LTC de veto (H-2^{bd}, figuras 6F-J). 6,5 días después, se sacrificaron los receptores seleccionados, los órganos internos se extrajeron y las células purificadas se analizaron mediante FACS. Los números representan las células H-2^{bd} totales, con selección basándose en CD8, recogidas en un tiempo constante. El número total de Tcm o LTC recogidas de todos los órganos ensayados, a los 2 días (barras negras) o a los 6,5 días (barras grises) post-trasplante se muestra en la figura 6K.

La figura 7 es un gráfico que representa el uso de transferencia adoptiva a células Tcm para superar el rechazo de aloinjertos (MOET) de médula ósea empobrecida en células T. ratones C3H (H-2^k) irradiados letalmente recibieron $1,25 \times 10^4$ células T singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 3×10^6 células de MO (H-2^d) de BALB/C desnudos con o sin la adición de 10^7 células T_{CM} CD8⁺ (C3H*BALB/C)F1 (H-2^{kd}).

La figura 8 es un gráfico que representa porcentaje de quimerismo del donante (80 días post-trasplante de MO). A ratones C3H (H-2^k) irradiados letalmente se les trasplantaron 3×10^6 células de aloinjerto de MO (H-2^d) de BALB/C desnudos (columna A), o recibieron además $1,25 \times 10^4$ células T singénicas y 10^7 T_{CM} CD8⁺ de (C3H*BALB/C)F1 (H-2^{kd}) (columna B). 80 días post-trasplante, el porcentaje de quimerismo del donante en sangre periférica de ratones se analizó mediante FACS.

Las figuras 9A-B son gráficos que representan niveles en sangre periférica de células Tcm infundidas a los 80 días post-trasplante de MO. A ratones C3H (H-2^k) irradiados letalmente se les trasplantaron 3×10^6 células de MO de BALB/C desnudos (H-2^d) (figura 9A), o recibieron además $1,25 \times 10^4$ células T singénicas y 10^7 células T_{CM} CD8⁺ de (C3H*BALB/C)F1 (H-2^{kd}) (figura 9B). Los niveles en sangre periférica de células Tcm se analizaron mediante análisis FACS midiendo células doble positivas H2K^kH2D^d en el punto de selección basada en CD8⁺. Las figuras muestran ratones representativos desde cada grupo.

Las figuras 10A-C son gráficos que muestran que Tcm' están dotadas de marcadas capacidades de inducción de tolerancia, y persisten in-vivo al menos 1 año post-TMO. Figura 10A - Ratones C3H (H-2^k) irradiados letalmente

(10 Gy) recibieron $1,25 \times 10^4$ CTH singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 3×10^6 células de MO BALB/c-DESNUDOS (H-2^d, "BA-NU MO") en presencia o ausencia de diferentes dosis de "Tcm" de CD8⁺ purificadas de (C3HXBALB/c)F1 (H-2^{Kd}, "C3BF1"). Los datos representan n = 22 animales para el grupo de irradiación solamente, 30 para el grupo de irradiación+MO, 59 para el grupo de irradiación+MO+CTH, y n = 16, 23 o 18 para los siguientes grupos de ratones respectivamente: irradiación+MO+CTH+(2×10^6) o (5×10^6) o (10^7) Tcm'. Se combinaron los datos de seis experimentos independientes. Figura 10B - El modelo de rechazo de injerto se estableció como en 9C. A los ratones se les trasplantaron 3×10^6 células de MO de BALB/c-DESNUDOS (H-2^d, "BA-NU MO") en presencia o ausencia de 5×10^6 "Tcm" de (C3H**BALB/c*)F1 (H-2^{Kd}, "C3BF1") purificadas o 10^7 "LTC" de (C3H**BALB/c*)F1. Los datos representan n = 14 animales para el grupo de irradiación solamente, 12 para el grupo de irradiación+MO, 21 para el grupo de irradiación+MO+CTH y n = 23 o 16 para los grupos de ratones que recibieron irradiación+MO+CTH+(5×10^6) 'Tcm' o (10^7) 'LTC', respectivamente. Se combinaron los datos de cinco experimentos independientes. Figura 10C - Los niveles en sangre periférica de 'Tcm' 1 año post-TMO mediante FACS midiendo células doble positivas H2K^HH2D^d en el punto de selección basada en CD8+. La figura muestra ratones representativos de siete ratones trasplantados con MO solamente ("MO en solitario") o siete ratones trasplantados con MO+CTH+ 5×10^6 "Tcm" CD8⁺ de (C3H**BALB/c*)F1 ("MO+Tcm").

Las figuras 11A-C son gráficos que ilustran que "Tcm" anti-terceros completamente alogénicas están empobrecidas en reactividad de ICH y apoyan el prendimiento de aloinjertos de MOET. Figuras 11A-B - Ratones C3H irradiados supra-letalmente (11 Gy) se protegieron contra radiación con 5×10^6 células de MO de BALB/c-DESNUDOS en presencia o ausencia de 5×10^6 o 2×10^6 "Tcm" purificadas CD8+ derivadas de BLAB/c ("MO + Tcm 5" o "MO + Tcm 2", respectivamente) o células indiferenciadas ("MO + indiferenciadas 5" o "MO + indiferenciadas 2", respectivamente). La reactividad de ICH de las células 'Tcm' o indiferenciadas se reflejó mediante el porcentaje de supervivencia (figura 11A) o mediante el cambio de peso promedio (figura 11B) durante 100 días post-trasplante. Los datos representan promedios de tres experimentos independientes, con al menos cinco ratones para cada grupo, en cada experimento. (**) Representa el valor p <0,01, en comparación con el grupo de ratones que recibieron solamente MO. Figura 11C - Ratones C3H irradiados letalmente (10 Gy) recibieron $1,25 \times 10^4$ CTH singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 3×10^6 células de MO de BALB/c-DESNUDOS ("BA-NU MO") en presencia o ausencia de 5×10^6 'Tcm' purificadas CD8+ de BALB/c o 10^7 'LTC' de BALB/c. Los datos representan n = 17 ratones para el grupo de irradiación solamente, 11 para el grupo de irradiación+MO, 24 para el grupo de irradiación+MO+CTH, y n = 27 o 25 para los grupos de ratones que recibieron irradiación+MO+CTH+ 10^7 'LTC' o 5×10^6 'Tcm', respectivamente. Se combinaron los datos de tres experimentos independientes.

Las figuras 12A-E son gráficos que muestran que Tcm' presentan baja actividad de veto in vitro, pero tras la reactivación adquieren un fenotipo efector, que está asociado con actividad de veto potente y específica. Figura 12A- se estimularon esplenocitos 2c con esplenocitos (H-2^d) de BALB/c irradiados en presencia o ausencia de "Tcm" purificadas derivadas de CB6 (H-2^{bd}), "LTC" o "Tcm" purificadas reactivadas in-vitro con sus estimuladores de terceros consanguíneos durante 60 horas ("R' Tcm"). Las células de veto se añadieron a las proporciones veto/efector indicadas. La actividad de veto se analizó mediante análisis FACS 3 días después del inicio de la RLM, para monitorizar la inhibición de la expansión de células 2c CD8⁺1B2⁺. Los resultados se presentan como media \pm SD del porcentaje de inhibición de cinco experimentos independientes. Figura 12B, análisis FACS de niveles de Anexina V en células 2c (7AAD⁻) CD8⁺1B2⁺ vivas, al final de la RLM, sembradas en placas con o sin células de veto a una proporción de veto/efector de 0,02. Los resultados se presentan como media \pm SD del porcentaje de Anexina V en siete experimentos independientes. Figura 12C, la RLM se estableció como en A. La inhibición de la expansión de células 2c se evaluó cuando se añadieron células de veto derivadas de ratones C3B6F1 "específicos" de CB6 (H-2^{bd}, "espec") o "no específicos" (H-2^{bk}, "no espec") a una proporción de veto/efector de 0,02. Los resultados se presentan como media \pm SD del porcentaje de inhibición de cuatro experimentos independientes. Las células 2c también se analizaron para niveles de Anexina V (figura 12D). Figura 12E ratones BALB/c irradiados letalmente (8 Gy) recibieron 4×10^6 células de MO de C57BL/6-DESNUDOS y $1,25 \times 10^4$ células T singénicas. A los ratones se les trasplantaron a continuación 2×10^6 'Tcm' de CB6 CD8⁺ purificadas, que se analizaron para el fenotipo CD62L antes de la transferencia adoptiva (panel izquierdo, "Tcm"). Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la transferencia adoptiva, y los GL se recogieron y se machacaron; la expresión de CD62L en células T CD8+ de CB6, aisladas a partir de los GL, se analizó mediante FACS (panel derecho, "Tcm de GL"). Se presenta un resultado representativo de 'Tcm' aisladas a partir de GL de un ratón de 20 ratones ensayados en cuatro experimentos independientes. En las figuras 12A-F, (***) representa valor p<0,001, (**) representa valor p<0,01 y (*) representa valor p<0,05.

Las figuras 13A-D son gráficos que muestran que las Tcm eliminan específicamente células T anti-donante in vivo. Figuras 13A-B - Ratones C57BL/6 irradiados letalmente (10 Gy) recibieron 1×10^5 células 2c CD8⁺ purificadas y 5×10^5 esplenocitos de BALB/c irradiados. Al día siguiente, a los ratones se les trasplantaron 1×10^6 células de MO de C57BL/6-DESNUDOS o recibieron, además, 5×10^6 "Tcm" "específicas", derivadas de CB6 (barras negras), o "no específicas", derivadas de C57BL/6 (barras grises) purificadas. Los receptores fueron sacrificados 8 días post-trasplante, se recogieron sus bazos, y la eliminación de células T 2c se monitorizó mediante FACS. (A) Resultado representativo que demuestra el nivel de células 2c (7AAD-) supervivientes en ausencia (panel izquierdo, "2c en solitario") o presencia de 'Tcm' "específicas" (panel derecho "2c+Tcm específicas"). (B) Cuantificación de resultados que miden la inhibición de las células 2c mediante "Tcm" "específicas" y "no específicas". Los datos representan promedio \pm SD del porcentaje de inhibición de al menos 10 animales en cada grupo, combinados de dos experimentos independientes. Figuras 13C-D - El modelo de

TMO singénico se estableció como en A-B, pero se administraron 5×10^5 células 2c CD8⁺ purificadas y $2,5 \times 10^6$ esplenocitos de BALB/c irradiados. Los receptores fueron sacarificados 8 días post-trasplante, se recogieron sus bazo y se llevó a cabo análisis FACS de los niveles de Anexina V en células 2c (7AAD⁻) CD8⁺ 1B2⁺ vivas. Figura 13C - Resultado representativo que demuestra los niveles de Anexina V en células 2c en ausencia (panel izquierdo, "2c en solitario") o presencia de "Tcm" "específicas" (panel derecho "2c+Tcm específicas"). Figura 13D - Cuantificación de resultados que miden los niveles de Anexina V en las células 2c después de las interacciones con "Tcm" "específicas" o "no específicas". Los datos presentan promedio \pm SD del porcentaje de niveles de Anexina V en al menos cuatro animales de cada grupo, en un experimento representativo, de los tres realizados. (***) Representa valor $p < 0,01$ (***) Representa valor $p < 0,001$.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células anti-terceros que no inducen EICH que comprenden fenotipo de linfocitos T de memoria central y, más particularmente, aunque no exclusivamente, a la generación de las mismas y el uso de las mismas en trasplante y en tratamiento de enfermedades.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su solicitud a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada mediante los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleada en el presente documento son con el fin de descripción y no deben considerarse como limitantes.

Mientras se reduce la presente invención a la práctica, el inventor de la presente invención ha descubierto una nueva población de células T de memoria central (Tcm) anti-terceros que anida en los ganglios linfáticos después del trasplante e induce tolerancia sin inducir una reacción de injerto contra huésped (ICH).

Tal como se muestra a continuación en el presente documento y en la sección de ejemplos que sigue, el inventor de la presente invención ha generado una nueva población de células Tcm que inducen tolerancia exponiendo en primer lugar a células T CD8⁺ a un estímulo anti-terceros en ausencia de citocinas durante 2 días y a continuación cultivando las células resultantes en presencia de IL-15 en un entorno libre de antígenos durante 2 semanas (véase la figura 2C). Las células Tcm generadas por el inventor de la presente invención comprendían un fenotipo de Tcm (por ejemplo células que expresan CD44⁺CD62L⁺, figura 2B) y anidaban en los ganglios linfáticos después del trasplante (figuras 3A-B). Además, estas células eran claramente visibles en los ganglios linfáticos varios días después del trasplante (figuras 5B y 6A-E). El destacable efecto de tolerancia de las células Tcm de la presente invención era evidente después de cotrasplante de médula ósea empobrecida en células T (MOET) junto con las células Tcm anti-terceros en receptores sin ningún tratamiento adicional (figuras 7, 10 y 11). Estas células Tcm presentaban fuerte proliferación y prolongada persistencia en receptores de trasplante de MO (figura 6K y figuras 9C-E). El uso de las células Tcm anti-terceros permitió la aceptación de injerto sin enfermedad de injerto contra huésped (EICH), tal como se muestra en las figuras 12 y 13. Tomados conjuntamente, todos estos descubrimientos corroboran el uso de células Tcm anti-terceros como células que facilitan el injerto para uso en la supervivencia a largo plazo de trasplantes.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen EICH que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células que inducen tolerancia y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de un trasplante.

La frase "población de células aislada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a células que han sido aisladas de su entorno natural (por ejemplo, el cuerpo humano).

La expresión "sin EICH", tal como se usa en el presente documento, se refiere que no tiene sustancialmente ninguna reactividad de inducción de injerto contra huésped. Por lo tanto, las células de la presente invención se generan para no causar significativamente enfermedad de injerto contra huésped (EICH) tal como se pone de manifiesto mediante supervivencia, peso y aspecto global de los ratones trasplantados 100 días después del trasplante.

La frase "células anti-terceros", tal como se usa en el presente documento, se refiere un linfocitos (por ejemplo linfocitos T) que están dirigidos (por ejemplo mediante reconocimiento de células T) contra un antígeno o antígenos de terceros.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "antígeno o antígenos de terceros" se refiere a un antígeno o antígenos solubles o insolubles (tales como asociados a membrana) que no están presentes en el donador o el receptor, tal como se representa en detalle a continuación.

Por ejemplo, antígenos de terceros pueden ser células de terceros, antígenos de virus, tales como por ejemplo, virus Epstein-Barr (VEB) o citomegalovirus (CMV) o antígenos de bacterias, tales como flagelina. Los antígenos virales o bacterianos pueden ser presentados por células (por ejemplo, línea celular) infectadas con ellos o a las que se hizo de otro modo expresar proteínas virales/bacterianas. Pueden usarse células que presentan antígenos autólogos o no autólogos para presentar péptidos sintéticos cortos fusionados o cargados en ellos. Dichos péptidos cortos pueden ser péptidos derivados de virus o péptidos que representan cualquier otro antígeno.

Puede usarse software dedicado para analizar secuencias virales u otras para identificar péptidos cortos inmunógenos, es decir, péptidos presentables en el contexto de CMH de clase I o CMH de clase II.

Células de terceros pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al receptor (explicadas con más detalle a continuación en el presente documento). En el caso de células de terceros alogénicas, dichas células tienen antígenos ALH diferentes de los del donador pero que no son reactivos de forma cruzada con los antígenos ALH del receptor, de modo que células anti-terceros generados contra dichas células no son reactivos contra un trasplante o antígenos del receptor.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células de terceros alogénicas o xenogénicas son células estimuladoras seleccionadas entre el grupo que consiste en células purificadas a partir de linfocitos de la sangre periférica (LSP), bazo o ganglios linfáticos, LSP movilizados por citocinas y células dendríticas presentadoras de antígenos expandidas in vitro (CPA).

Antígenos de terceros pueden presentarse en las superficies celulares, virales o bacterianas o derivarse y/o purificarse a partir de ellas. Adicionalmente, un antígeno viral o bacteriano puede ser presentado en una célula infectada y un antígeno celular puede presentarse en un vehículo artificial tal como un liposoma.

Además, antígenos de terceros pueden ser, por ejemplo, proteínas extraídas o purificadas a partir de diversas fuentes. Un ejemplo de una proteína purificada que puede servir como un antígeno de terceros de acuerdo con la presente invención es ovoalbúmina. Están previstos otros ejemplos.

Utilizar células, virus, bacterias, células infectadas por virus, infectadas por bacterias, que presentan péptidos virales o péptidos bacterianos como antígenos de terceros es particularmente ventajoso, dado que dichos antígenos de terceros incluyen una diversa disposición de determinantes antigénicos y, por lo tanto, dirigen la formación de células anti-terceros de una población diversa, que pueden servir además en la reconstitución más rápida de células T en casos donde se requiere dicha reconstitución, por ejemplo, después de irradiación letal o subletal o un procedimiento de quimioterapia.

Además, cuando células anti-terceros se dirigen contra antígenos de terceros, es plausible obtener al menos alguna actividad de célula de injerto contra enfermedad (por ejemplo célula cancerosa tal como injerto contra leucemia) debido a destrucción independiente de TCR mediada por unión a LFA1-I/CAM1 [Arditti et al., Blood (2005) 105(8): 3365-71. Publicación en línea 6 de julio de 2004].

De acuerdo con algunas realizaciones, las células anti-terceros de la presente invención comprenden a fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

La frase "fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de células T citotóxicas que anidan en los ganglios linfáticos. Las células que tienen el fenotipo Tcm, en seres humanos, normalmente comprenden CD8+/CD62L+/CD45RO+/L-selectina+/CD45RA-. De acuerdo con una realización más específica, el fenotipo Tcm comprende CD8+/CD62L+/CCR7+/CD45RO+/L-selectina+/CD45RA. Se apreciará que las células Tcm pueden expresar todos los marcadores de distintivo en una única célula o pueden expresar solamente parte de los marcadores de distintivo en una única célula.

Se apreciará que al menos al menos el 30 %, al menos el 40 %, el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 % de la población de células aislada comprenden células que tienen el distintivo celular de Tcm.

Tal como se ha mencionado, las células Tcm normalmente anidan en los ganglios linfáticos después del trasplante. De acuerdo con algunas realizaciones, las células Tcm anti-terceros de la presente invención pueden dirigirse a cualquiera de los ganglios linfáticos después del trasplante, como por ejemplo, los ganglios linfáticos periféricos y los ganglios linfáticos mesentéricos (tal como se representa en detalle en el ejemplo 4 de la sección de ejemplos que siguen). La naturaleza migratoria de estas células les permite ejercer su efecto de tolerancia de manera rápida y eficiente.

Por lo tanto, las células Tcm anti-terceros de la presente invención son células que inducen tolerancia.

La frase "células que inducen tolerancia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a células que provocan un menor grado de respuesta de las células del receptor (por ejemplo células T del receptor) cuando entran en contacto con las mismas. Las células que inducen tolerancia incluyen células de veto (es decir, células T que causan apoptosis de células T del huésped tras el contacto con las mismas) tal como se describió anteriormente en las publicaciones PCT N.º WO 2001/049243 y WO 2002/102971.

De acuerdo con algunas realizaciones, las células Tcm de la presente invención pueden ser células indiferenciadas (por ejemplo no modificadas genéticamente) o células modificadas genéticamente (por ejemplo células que han sido manipuladas genéticamente para expresar o no expresar genes, marcadores o péptidos específicos o para secretar o no secretar citocinas específicas). Cualquier método conocido en la técnica puede ser implementado en la manipulación genética de las células, tales como mediante inactivación de los uno o más genes relevantes o mediante inserción de un ARN antisentido que interfiere en la expresión de polipéptidos (véase, por ejemplo el documento WO/2000/039294, que se incorpora por el presente como referencia).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método de generación de la población de células aislada, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros en condiciones que permitan la eliminación de células reactivas en ICH; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

Realizaciones específicas del método descrito anteriormente se proporcionan en detalle en los ejemplos 1 y 3, a continuación en el presente documento. Por lo tanto, de acuerdo con una realización ejemplar de la invención, las células anti-terceros se generan poniendo el contacto en primer lugar células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros en un cultivo derivado de citocinas (por ejemplo sin la adición de citocinas). Esta etapa se lleva a cabo normalmente durante aproximadamente 2 días y permite la eliminación de células reactivas en ICH (por ejemplo, células T). A continuación, las células anti-terceros se cultivan en presencia de IL-15 durante un periodo de aproximadamente 14 días en un entorno libre de antígenos. El cultivo puede efectuarse, además, en presencia de citocinas adicionales tales como IL-7 y/o IL-21. Este proceso permite la proliferación de células anti-terceros que comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) y que están privadas de reactividad de EICH.

Se apreciará que puede llevarse a cabo una etapa adicional que permite la selección de células CD8⁺, tal como mediante el uso de perlas MACS, antes de cultivar las células en presencia de IL-15. Dicha etapa puede ser beneficiosa con el fin de incrementar la pureza de las células CD8⁺ dentro del cultivo (es decir eliminar otros linfocitos dentro del cultivo celular, por ejemplo células T CD4⁺) o con el fin de incrementar el número de células T CD8⁺.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las CMSP no singénicas de la presente invención pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto (se explican con más detalle a continuación en el presente documento). La fuente de las CMSP se determinará con respecto al uso pretendido de las células (véase detalles adicionales a continuación en el presente documento) y está bien dentro de la capacidad de un experto en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Se apreciará que también pueden usarse CMSP singénicas (por ejemplo del sujeto) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención (es decir en situaciones cuando células Tcm singénicas pueden ser beneficiosas para el tratamiento, véase detalles a continuación). La generación de dichas células puede llevarse a cabo tal como se ha descrito en detalle para células no singénicas.

El uso de células que inducen tolerancia es especialmente beneficioso en situaciones en las que existe una necesidad de eliminar rechazo de injerto y superar enfermedad de injerto contra huésped (EICH), tal como en el trasplante de células o tejidos alogénicos o xenogénicos.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un sujeto que necesita un trasplante de células o de tejido, comprendiendo el método realizar un trasplante de células o de órganos en el sujeto y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células aislada.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye abolir, sustancialmente inhibir, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorando sustancialmente síntomas clínicos o estéticos de una afección o previniendo sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, masculino o femenino de cualquier edad, que necesita un trasplante de células o de tejido. Normalmente el sujeto necesita un trasplante de células o de tejido (también denominado en el presente documento receptor) debido a un trastorno o una afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o una anomalía física, morfológica o fisiológica que es viable para el tratamiento mediante trasplante de células o de tejido.

A continuación en el presente documento, se proporcionan ejemplos de dichos trastornos.

5 Tal como se usa en el presente documento, la frase “trasplante de células o de tejido” se refiere a una célula corporal (por ejemplo una única célula o un grupo de células) o tejido (por ejemplo tejidos sólidos o tejidos blandos, que pueden ser trasplantados en todo o en parte). Los tejidos ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, tejidos de hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y linfoide/hematopoyético (por ejemplo ganglios linfáticos, placas de Peyer, timo o médula ósea). Las células ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, células hematopoyéticas inmaduras. Además, la presente invención también contempla el trasplante de órganos completos, tales como por ejemplo, riñón, corazón, hígado o piel.

Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse usando una célula o tejido que es singénico o no singénico con el sujeto.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “singénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un individuo que es esencialmente genéticamente idéntico al sujeto. Normalmente, mamíferos esencialmente completamente consanguíneos, clones de mamíferos, o mamíferos gemelos homocigóticos son singénicos.

20 Los ejemplos de células o tejidos singénicos incluyen células o tejidos derivados del sujeto (también denominados en la técnica “autólogos”), un clon del sujeto, o un gemelo homocigótico del sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “no singénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un individuo que es alogénico o xenogénico con los linfocitos del sujeto.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “alogénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un donador que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Normalmente, mamíferos no consanguíneos, gemelos no cigóticos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que un donante alogénico puede ser idéntico a ALH o no idéntico a ALH con respecto al sujeto.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “xenogénico” se refiere a una célula o tejido que sustancialmente expresa antígenos de una especie diferente con respecto a la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Normalmente, mamíferos no consanguíneos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

35 La presente invención prevé que células o tejidos xenogénicos se deriven de diversas especies tales como, aunque sin limitarse a, bovinos (por ejemplo, vaca), équidos (por ejemplo, caballo), porcinos (por ejemplo cerdo), óvidos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, mono Rhesus, macaco, tití).

40 Células o tejidos de origen xenogénico (por ejemplo origen porcino) se obtienen preferentemente de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tal como retrovirus endógenos porcinos. Análogamente, células o tejidos derivados de ser humano se obtienen preferentemente de fuentes sustancialmente libres de patógenos.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, tanto el sujeto como el donante son seres humanos.

50 Dependiendo de la aplicación y las fuentes disponibles, las células o tejidos de la presente invención pueden obtenerse de un organismo prenatal, organismo postnatal, un adulto o un donante cadáver. Además, dependiendo de la aplicación necesaria, las células o tejidos pueden ser indiferenciados o genéticamente modificados. Dichas determinaciones están bien dentro de la capacidad de un experto en la materia.

Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para obtener una célula o tejido (por ejemplo, para trasplante).

55 El trasplante de la célula o tejido en el sujeto puede efectuarse de numerosas maneras, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo de célula o de tejido; el tipo, estadio o gravedad de la enfermedad del receptor (por ejemplo, insuficiencia orgánica); los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto; y/o el desenlace terapéutico deseado.

60 La realización de un trasplante de células o de tejido de la presente invención puede efectuarse trasplantando el trasplante de células o de tejido en una cualquiera de diversas ubicaciones anatómicas, dependiendo de la aplicación. El trasplante de células o de tejido puede trasplantarse en una ubicación anatómica homotópica (una ubicación anatómica normal para el trasplante), o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el trasplante). Dependiendo de la aplicación, el trasplante de células o de tejido puede implantarse ventajosamente bajo la cápsula renal, o en el riñón, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad cardiaca, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, la piel, el páncreas y/o el

espacio intraabdominal.

Por ejemplo, un tejido hepático de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención puede trasplantarse en el hígado, la vena porta, la cápsula renal, el tejido subcutáneo, el omento, el bazo y el espacio intraabdominal. El trasplante de un hígado en diversas ubicaciones anatómicas tales como éstas se realiza comúnmente en la técnica para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante hepático (por ejemplo insuficiencia hepática). Análogamente, el trasplante de un tejido pancreático de acuerdo con la presente invención puede efectuarse ventajosamente trasplantando el tejido en la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, un asa intestinal (la subserosa de un asa en U del intestino delgado) y/o el espacio intraabdominal. El trasplante de tejido pancreático puede usarse para tratar enfermedades susceptibles a tratamiento mediante trasplante pancreático (por ejemplo diabetes). Del mismo modo, el trasplante de tejidos tales como un riñón, un corazón, un pulmón o tejido cutáneo puede llevarse a cabo en cualquier ubicación anatómica descrita anteriormente con el fin de tratar receptores que padecen, por ejemplo, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, insuficiencia pulmonar o daño cutáneo (por ejemplo, quemaduras).

El método de la presente invención también puede usarse, por ejemplo, para tratar a un receptor que padece una enfermedad que requiere trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.

En el último caso, células hematopoyéticas alogénicas o xenogénicas inmaduras (incluyendo células madre) que pueden derivarse, por ejemplo, de médula ósea, sangre periférica movilizada (mediante por ejemplo leucoféresis), hígado fetal, saco vitelino y/o sangre del cordón umbilical del donante y que son preferentemente células hematopoyéticas inmaduras CD34+ empobrecidas en células T, pueden trasplantarse a un receptor que padece una enfermedad. Dicha enfermedad incluye, aunque sin limitarse a, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia no linfoblástica aguda (LNLA), leucemia mielocítica aguda (LMA) o leucemia mielocítica crónica (LMC), síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), incluyendo adenosina desaminasa (ADA), osteopetrosis, anemia aplásica, enfermedad de Gaucher, talasemia y otras anomalías hematopoyéticas congénitas o determinadas genéticamente.

Se apreciará que las células hematopoyéticas alogénicas o xenogénicas inmaduras de la presente invención pueden trasplantarse en un receptor usando cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tal como aunque sin limitarse a, infusión celular (por ejemplo I.V.) o mediante una vía intraperitoneal.

Opcionalmente, cuando se trasplanta un trasplante de células o de tejido de la presente invención en un sujeto que tiene un órgano defectuoso, puede ser ventajoso en primer lugar extirpar, al menos parcialmente, el órgano con insuficiencia del sujeto para permitir el desarrollo óptimo del trasplante, y la integración estructural/funcional del mismo con la anatomía/fisiología del sujeto.

El método de la presente invención también prevé cotrasplante de varios órganos (por ejemplo tejidos cardiacos y pulmonares) en caso de que dicho procedimiento pueda tener efectos beneficiosos para el sujeto.

Después de trasplante del trasplante de células o de tejido en el sujeto de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, es previsible, de acuerdo con la práctica médica estándar, monitorizar la funcionalidad del crecimiento y la inmuno-compatibilidad del órgano de acuerdo con una cualquiera de diversas técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, la funcionalidad de un trasplante de tejido pancreático puede monitorizarse siguiendo el trasplante mediante ensayos estándar de la función pancreática (por ejemplo análisis de los niveles séricos de insulina). Del mismo modo, un trasplante de tejido hepático puede monitorizarse después del trasplante mediante ensayos estándar de la función hepática (por ejemplo análisis de los niveles séricos de albúmina, proteína total, ALT, AST y bilirrubina, y análisis del tiempo de coagulación sanguínea). El desarrollo estructural de las células o tejidos puede monitorizarse mediante tomografía computarizada, o imaginología ultrasónica.

Dependiendo del contexto del trasplante, con el fin de facilitar el prendimiento del trasplante de células o de tejido, el método puede, más ventajosamente, comprender acondicionar el sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, conjuntamente con o después de trasplantar el trasplante de células o de tejido.

Los ejemplos de tipos adecuados de regímenes inmunosupresores incluyen administración de fármacos inmunosupresores, poblaciones de células que inducen tolerancia (tal como se describe en detalle a continuación en el presente documento), y/o irradiación inmunosupresora.

En la bibliografía de la técnica se proporciona amplia orientación para seleccionar y administrar regímenes inmunosupresores para trasplante (por ejemplo, consultar: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. et al., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. et al., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. et al., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. et al., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. et al., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. et al. 1998. Lancet 351, 623).

Preferentemente, el régimen inmunosupresor consiste en administrar al menos un agente inmunosupresor al sujeto.

Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, aunque sin limitarse a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, bloqueantes de TNF-alfa, un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria y antiinflamatorios no esteroides (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, aunque sin limitarse a, ácido acetil salicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, quetoprofeno, quetorolac, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de COX-2, tramadol, rapamicina (sirolimus) y análogos de rapamicina (por ejemplo, CCI-779, RAD001, AP23573). Estos agentes pueden administrarse individualmente o en combinación.

Independientemente del tipo de trasplante, para evitar el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped, el método de la presente invención utiliza las novedosas células Tcm anti-terceros (tal como se ha descrito en detalle anteriormente en el presente documento).

De acuerdo con el método de la presente invención, estas células Tcm anti-terceros se administran conjuntamente con, antes de o después de trasplantar el trasplante de células o de tejido.

Las células Tcm anti-terceros pueden administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tal como aunque sin limitarse a, infusión de células (por ejemplo I.V.) o mediante una vía intraperitoneal.

Sin desear quedar ligados a la teoría, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de células Tcm anti-terceros eficientes para tolerización, efecto anti-tumoral y/o reconstitución inmunitaria sin inducir EICH. Dado que las células Tcm de la presente invención anidan en los ganglios linfáticos después del trasplante, pueden ser necesarias cantidades menores de células (en comparación con la dosis de células usada previamente, véase por ejemplo el documento WO 2001/049243) para conseguir el uno o más efectos beneficiosos de las células (por ejemplo tolerización, efecto anti-tumoral y/o reconstitución inmunitaria). Se apreciará que pueden ser necesarios niveles más bajos de fármacos inmunosupresores, junto con las células Tcm de la presente invención (tal como exclusión de rapamicina del protocolo terapéutico).

La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo in vitro y celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o valor cuantitativo deseado. Dicha información puede usarse para determinar, de forma más precisa, dosis útiles en seres humanos.

Por ejemplo, en el caso de trasplante de tejido, el número de células Tcm anti-terceros infundidas en un receptor debe ser mayor de 1×10^4 /kg de peso corporal. El número de células Tcm anti-terceros infundidas en un receptor normalmente debe estar en el intervalo de 1×10^4 /kg de peso corporal a 1×10^8 /kg de peso corporal.

Por lo tanto, las novedosas células Tcm anti-terceros de la presente invención pueden usarse como terapia adyuvante para un trasplante de células o de tejido (tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento). Además, las novedosas células Tcm de la presente invención también están dotadas de actividad de injerto contra células enfermas (descrita en detalle anteriormente) y, por lo tanto, pueden usarse *per se* para el tratamiento de enfermedades.

De acuerdo con una realización específica, con el fin de obtener una actividad de injerto contra células enfermas (por ejemplo efecto anti-tumoral tal como tratamiento anti-leucemia), pueden usarse células singénicas así como células no singénicas.

Por lo tanto, el método de la presente invención puede aplicarse para tratar cualquier enfermedad tal como, aunque sin limitarse a, una enfermedad maligna, una enfermedad asociada con el trasplante de un injerto, una enfermedad infecciosa tal como una enfermedad vírica o una enfermedad bacteriana, una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad autoinmunitaria.

Enfermedades que pueden tratarse usando los métodos de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, enfermedades malignas tales como leucemia [por ejemplo, linfática aguda, linfoblástica aguda, linfoblástica aguda pre-células B, leucemia de células T linfoblástica aguda, aguda - megacarioblástica, monocítica, mielógena aguda, mielóide aguda, mielóide aguda con eosinofilia, de células B, de basófilos, mielóide crónica, crónica, de células B, eosinofílica, de Friend, granulocítica o mielóide, de células pilosas, linfocítica, megacarioblástica, monocítica, monocítica-de macrófagos, mieloblástica, mielóide, mielomonocítica, de células plasmáticas, pre-células B, promielocítica, subaguda, de células T, neoplasia linfoide, predisposición a neoplasias mieloides, leucemia no

linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda de células T (LLA-T) y leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B)), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, de células B, de Burkitt, de células T cutáneas, histiocítico, linfoblástico, de células T, del timo), carcinoma, blastoma y sarcoma; enfermedades asociadas con el trasplante de un injerto (por ejemplo, rechazo de injertos, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto hiperagudo, rechazo agudo del injerto y enfermedad de injerto contra huésped); enfermedades infecciosas incluyendo, aunque sin limitarse a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas (por ejemplo, VEB, CMV, VIH), enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma y enfermedades priónicas; enfermedades inflamatorias (por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades inflamatorias agudas); y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades renales, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas).

Por lo tanto, el método de la presente invención puede aplicarse, además, ventajosamente al tratamiento de una enfermedad en un sujeto mientras se facilita conjuntamente el prendimiento de un trasplante de células o tejido singénico con las células Tcm anti-terceros (por ejemplo en situaciones en las que el trasplante de células o de tejido and y las células anti-terceros se derivan del mismo donante).

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo aunque sin limitarse a".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

Tal como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

En toda esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible al alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

En cualquier lugar en el que se indica un intervalo numérico en el presente documento, esto significa que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado se usan en el presente documento de forma intercambiable y pretenden incluir los primer y segundo números indicados y todos los números fraccionario y enteros entre ambos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluyendo, aunque sin limitarse a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones independientes, también pueden proporcionarse en combinación con una realización individual. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una realización individual, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización de la invención descrita. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se han perfilado anteriormente en el presente documento y tal como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental

en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 5 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal como se exponen en las patentes de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular); inmunoensayos disponibles se describen exhaustivamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan como referencia tal como se describe en su totalidad en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Se cree que los procedimientos en ellos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector. Toda la información contenida en ellos se incorpora en el presente documento como referencia.

EJEMPLO 1

35 *Materiales y procedimientos experimentales generales*

Animales

40 Ratones hembra de 6-12 semanas de edad BALB/c (H-2^d), CB6 (H-2^{bd}), FVB (H-2^q), SJL (H-2^s), C57BL/6 (H-2^b), C3H (H-2^k), BALB/C desnudos y C57BL/6 desnudos se obtuvieron del Weizmann Institute Animal Center (Rehovot, Israel). Se cruzaron ratones C3H y BALB/C para generar ratones (C3HxBALB/C)F1. Un par de cría de ratones transgénicos (Tg) H-2^b que expresan el TCR del clon 2c de LTC con especificidad por H-2L^d fue proporcionado amablemente por Janko Nikolic-Zugic (Sloan-Kettering, NY). La progenie de estos ratones Tg se crío en el Weizmann Institute Animal Breeding Center. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (cinco animales por jaula) y se les alimentó con alimento estéril y agua ácida.

Preparación de LTC anti-terceros de donante, no reactivos con el huésped

50 Se prepararon LTC anti-terceros, tal como se describió anteriormente por Bachar et al. [Bachar-Lustig et al., Blood. (2003) 102: 1943-1950]. En resumen, se cultivaron esplenocitos del ratón donante contra esplenocitos de ratón FVB irradiados (20 Gy). Los que respondían (4×10^6 /ml) y los estimuladores (4×10^6 /ml) se cultivaron durante 6 días en un medio de cultivo tisular completo RPMI (MC) a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %/aire. Seis días después del inicio del cultivo, las células se fraccionaron sobre Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB) y la fracción linfóide se sometió a selección positiva de células CD8⁺ usando partículas magnéticas BD IMag™ CD8 (BD Pharmingen). Las células aisladas (1×10^6 /ml) se reestimularon con esplenocitos de terceros irradiados (20 Gy) (4×10^6 /ml) y se añadió rIL-2 humana (40 U/ml, Eurocetus) al cultivo de reacción de linfocitos mixto cada dos días. El día 16, los cultivos de RLM se recogieron, se fraccionaron sobre Ficoll-Paque y se analizaron mediante FACS para su pureza de CD8.

60 *Preparación de células Tcm anti-terceros*

65 Se cultivaron esplenocitos de los ratones donantes contra esplenocitos de ratón FVB de terceros irradiados (20 Gy) FVB. Los que respondían (4×10^6 /ml) y los estimuladores (4×10^6 /ml) se cultivaron durante 60 horas en un medio de cultivo tisular completo RPMI (MC) a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %/aire. 60 horas después del inicio del cultivo, las células se fraccionaron sobre Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB) y la fracción linfóide se sometió a selección positiva de células CD8⁺ usando partículas magnéticas BD IMag™ CD8 (BD Pharmingen). Las

células aisladas (1×10^6 /ml) se sembraron en placas con rIL-15 (20 ng/ml, R&D). El medio y las citocinas se sustituyeron cada dos días. El día 16, las células se recogieron, se fraccionaron sobre Ficoll-Paque y se analizaron mediante FACS para su pureza de Tcm (expresión de CD8, CD62L y CD44).

5 *Modelo de rechazo de aloinjerto mediado por células T*

Ratones huésped hembra (13-14 semanas de edad) se expusieron a una única dosis de 10 Gy (acondicionamiento supraletal) de irradiación corporal total el día -2. El día siguiente, los ratones recibieron por vía intravenosa $1,25 \times 10^4$ células T del huésped no separadas. El trasplante de 3×10^6 células de MO desnudas alogénicas se realizó el día 0 junto con las células de veto a evaluar.

10 *Preparación de células T del huésped*

Esplenocitos de ratones huésped se fraccionaron sobre Ficoll/Paque y las células mononucleares aisladas se sometieron a una selección positiva de células T ($CD4^+$ más $CD8^+$) mediante clasificación celular magnética (MACS).

15 *Imaginología in-vivo*

Se incubaron 1×10^7 células diana con el colorante carbocianina lipófila cercana al infrarrojo (DIR, Invitrogen) en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 1,5 μ g/ml de colorante DIR y etanol al 0,5 % durante 60 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con PBS y la viabilidad de las células marcadas se verificó mediante tinción con azul de tripano. Las células marcadas con DIR se trasplantaron a continuación, junto con MO empobrecida en T, en ratones huésped irradiados de forma supraletal a los que se infundió previamente células T del huésped purificadas como inductoras de rechazo del injerto (tal como se ha representado en detalle anteriormente). En el momento especificado después del trasplante, los ratones se monitorizaron mediante el sistema de imaginología de cuerpo entero óptico (IVIS® 100, Xenogen) acoplado con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) Pixelfly QE (PCO, Kelheim, Alemania). El filtro de excitación y emisión instalado en el IVIS era de 710 a 760 nm y de 810 a 860 nm, respectivamente. El procesamiento de imágenes y el análisis de datos se realizaron usando el software Living Image 2.5.

20 *Rastreo in - vivo de células CD8+ usando análisis citofluorimétrico*

Se recogieron ganglios linfáticos, MO, hígados y bazo de ratones huésped sesenta horas y 6,5 días después del trasplante de MO y transferencia adoptiva a las células diana (tal como se ha descrito para el protocolo de imaginología in-vivo anteriormente). Se preparó una única suspensión celular a partir de cada órgano y las células se fraccionaron sobre Ficoll. Las células se tiñeron a continuación con anticuerpos anti-H-2k^b, anti-H-2D^d, anti-CD8 y anti-CD62L (BD Bioscience), y se suspendieron en suspendido un volumen constante de PBS. Se realizó análisis FACS en recuentos temporales fijos de cada muestra.

35 *Ensayo para actividad de veto en el modelo de ratón 2c TCR Tg*

Células esplénicas de ratones 2c Tg H-2^b, que expresan el TCR con especificidad por ratones H-2L^d se usaron en todo el ensayo como células efectoras en el ensayo de veto. Las células esplénicas se recogieron, se lisaron en tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC) (tampón ACK) frío, para retirar glóbulos rojos, y se llevaron a una concentración de 2×10^6 células /ml en medio de cultivo tisular completo RPMI (CTMC). Las células se estimularon a continuación con esplenocitos de BALB/c irradiados (20 Gy) (2×10^6 /ml) en presencia de las células de veto a evaluar (origen de CB6 H-2^{bd}) a las concentraciones especificadas. Los cultivos se incubaron durante 72 horas en placas de 96 pocillos en forma de U. La eliminación de células T efectoras específicas se monitorizó mediante análisis citofluorimétrico que mide el nivel de células, $CD8^+$ 2C vivas living [células negativas para 7-aminoactinomicina-D (7AAD; Invitrogen)], teñidas específicamente mediante el anticuerpo 1B2, dirigido contra el TCR anti-H-2L^d clonotípico. La actividad de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\left(1 - \frac{\text{El número de células } 1B2^+ CD8^+ \text{ en el pocillo valorado}}{\text{El número de células } 1B2^+ CD8^+ \text{ en el pocillo de control}} \right) \times 100$$

40 *Evaluación de apoptosis mediante citometría de flujo usando anexina V*

Se tiñeron células ($1-2 \times 10^5$) con Fitc-anexina V (MBL Medical & Biological Laboratories, Naka-ku Nagoya, Japón) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las células se suspendieron en 100 μ l de tampón de unión (HEPES 10 mM/NaOH, pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM) y se incubaron durante 10 minutos. Las células se lavaron a continuación con tampón de unión y se analizaron mediante citometría de flujo.

Análisis de quimerismo

El quimerismo se determinó mediante citometría. Células de la sangre periférica se fraccionaron sobre Ficoll-Paque plus, y las células mononucleares aisladas de cada ratón se tiñeron doblemente mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpo monoclonal anti-H2^d específico para el donante y anti-H2^k específico para el huésped.

Análisis citométricos de flujo

Se realizó análisis FACS usando un FACScan de Becton Dickinson modificado. Las células se tiñeron con anticuerpos marcados específicos para CD8 α -PE/FITC/CPA, CD3-PE/FITC/CPA, CD62L-PE/FITC/CPA, CD44-PE/FITC/CPA, H2K^b-PE/FITC, H2D^d-PE/FITC, H2K^k-PE/FITC (BD Pharmigen), 1B2 biotiniladas y estreptavidina-CPA (Jackson Laboratories). Las tinciones con Anexina V y 7AAD se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmigen).

Ensayo in-vitro para actividad de veto en el modelo en ratón 2c TCR Tg.

El ensayo in-vitro para actividad de veto se realizó tal como se ha descrito anteriormente³⁰. En resumen, se estimularon esplenocitos 2c con esplenocitos de BALB/c irradiados en presencia de las células de veto a evaluar a las concentraciones especificadas. Los cultivos se incubaron durante 72 h en placas de 96 pocillos. La eliminación de células T efectoras específicas se monitorizó mediante análisis FACS midiendo el nivel de células (7AAD⁻), CD8⁺ 2C supervivientes, teñidas específicamente mediante el anticuerpo 1B2. La actividad inhibitora se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\left(1 - \frac{\text{El número de células } 1B2^+ CD8^+ \text{ en el pocillo valorado}}{\text{El número de células } 1B2^+ CD8^+ \text{ en el pocillo de control}} \right) \times 100$$

Ensayo in-vivo para actividad de veto en el modelo en ratón 2c TCR Tg.

Ratones C57BL/6 irradiados letalmente (10 Gy) recibieron 1x10⁵ células 2c CD8⁺ purificadas (MACS) y 5x10⁵ esplenocitos de BALB/c irradiados (20 Gy). Al día siguiente, a los ratones se les trasplantaron 1x10⁶ células de MO de C57BL/6-DESNUDOS y 5x10⁶ Tcm. Los receptores fueron sacarificados 8 días post-trasplante, se recogieron sus bazo, y la eliminación de las células T 2c se monitorizó mediante FACS, tal como se ha descrito en la sección anterior para el ensayo in-vitro.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de supervivencia se realizó usando curvas de Kaplan-Meier (ensayo de rangos logarítmicos). La comparación de los medios se llevó a cabo usando la prueba de la t de Student.

EJEMPLO 2*Patrones de anidamiento de LTC de veto anti-terceros (descritos anteriormente) en comparación con células T nativas singénicas y alogénicas*

Mientras se generaban LTC de veto no reactivos con el huésped, las células se sometieron a activación ex-vivo prolongada contra estimuladores de terceros en presencia de IL-2. Como resultado, las células se han desarrollado probablemente a LTC efectoras, que se demostró previamente que mostraban un fenotipo buscador de inflamación con pérdida de capacidades de anidamiento en los ganglios linfáticos (GL) [Reinhardt et al., Nature (2001) 410: 101-105; Weninger et al., J Exp Med. (2001) 194: 953-966; Masopust et al., Science (2001) 291: 2413-2417]. Dicho patrón migratorio podría ser una de las razones para la discrepancia entre eficiencia de LTC de veto anti-terceros in vitro e in vivo. Para ensayar esta posibilidad, el inventor de la presente invención ha usado un modelo in-vivo para ensayar la eficacia de LTC de veto anti-terceros. Este modelo riguroso comprendía ratones irradiados letalmente que recibieron médula ósea empobrecida en células T alogénica (MOET) en presencia o ausencia de un número graduado de células T del huésped que indujeron rechazo y anemia mortal en la tercera semana después de trasplante de médula ósea (TMO).

En resumen, ratones FVB irradiados de forma supraletal se protegieron de la radiación con MOET alogénica de ratones Balb/c, en presencia o ausencia de células T del huésped purificadas y transferidas de forma adoptiva (CTH), lo que indujo rechazo del aloinjerto. A estos receptores de MO (que experimentaban rechazo de aloinjerto de MO) se les infundieron adicionalmente diferentes tipos de células T marcadas con colorante DIR que podían ser rastreadas mediante un sistema de imagenología in-vivo (IVIS).

Tal como puede verse en las figuras 1A-D, 36 horas después de la infusión de las células marcadas, células T singénicas (CTH) e indiferenciadas alogénicas mostraban anidamiento marcado en los GL, mientras que LTC de

veto anti-terceros alogénicos (descritos anteriormente) se concentraban en el hígado, los pulmones y la MO y estaban excluidas de los GL (figura 1D). La capacidad de las células T indiferenciadas alogénicas de colocalizarse con CTH implica que las células T alogénicas, que muestran el fenotipo apropiado, pueden dirigirse a los GL en el contexto del medio especial del modelo de rechazo del injerto.

5

EJEMPLO 3

Inducción de células Tcm anti terceros in vitro

El inventor de la presente invención ha desarrollado previamente LTC anti-terceros que mostraban actividad de veto marcada (debido a su expresión de FasL) y que están desprovistas de reactividad de EICH en virtud de su prolongada activación contra un tercero [Bachar-Lustig et al., Blood. (2003) 102: 1943-1950]. Sin embargo, tal como se representa en el ejemplo 2 anteriormente, estas células muestran mal anidamiento en los GL. Estos resultados han llevado al inventor de la presente invención a intentar mejorar adicionalmente la reactividad in-vivo de estas células intentando inducir fenotipo de memoria central (Tcm) en estas células tras su activación contra una tercera parte. El fenotipo Tcm ha demostrado previamente estar asociado con células activadas (CD44⁺), que expresan, entre otros antígenos de superficie, CD62L y CCR7 que permiten su anidamiento en los GL [Sallusto et al., Nature (1999) 401: 708-712; Weninger et al, anteriormente; Masopust et al., anteriormente].

Por lo tanto, el inventor de la presente invención ha ensayado la capacidad de IL-2 o IL-15 para su capacidad para inducir fenotipo de Tcm en células T CD8⁺ anti-terceros. Dado que la reducción de reactividad de ICH requería carencia de citocinas antes de la expansión en presencia de las citocinas ensayadas, se realizaron comparaciones entre los diferentes protocolos después de periodos de privación de citocinas de corta duración y de larga duración. Por lo tanto, las células T CD8⁺ experimentaron 2 días o 6 días de estimulación con estimuladores de terceros irradiados, en ausencia de citocinas, y se cultivaron a continuación en presencia de IL-2 o IL-15 y se monitorizaron para expresión de CD62L y CD44 (tal como se ha representado en detalle en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento).

Tal como se muestra en la figura 2A, después de 60 horas de estimulación con estimuladores de terceros, en ausencia de citocinas, las células T CD8⁺ mantenían la expresión de CD62L (el 90 ± 5 % de las células expresaban CD62L), mientras que después de 6 días de estimulación, solamente el 18 ± 6 % de las células T CD8⁺ mantenían la expresión de CD62L (valor p < 0,001). En línea con esta observación, cuando las células T CD8⁺ se cultivaron adicionalmente con IL-15 en entorno libre de Ag, después del periodo de estimulación, significativamente más células con fenotipo Tcm CD44⁺CD62L⁺ fueron inducidas los decimoquintos días del cultivo cuando las células experimentaron 60 horas de estimulación (figuras 2B-C), en contraste con las células que experimentaron 6 días de estimulación (valor p = 0,005). El uso de IL-2 no consiguió apoyar inducción significativa de células Tcm anti-terceros después de corta (2 días) estimulación de las células con terceros (figura 2B, valor p = 0,007).

Además, al final del periodo de cultivo, las LTC anti-terceros que experimentaron 6 días de estimulación con terceros y se cultivaron posteriormente con IL-2 y se reactivaron con su Ag consanguíneo, presentaban en su mayoría un fenotipo efector y solamente el 4 ± 2 % de estas células habían presentado un fenotipo Tcm (figura 2B), estos resultados estaban en línea con el patrón de anidamiento periférica de estas células descritas en el ejemplo 2, anteriormente (figura 1D).

Los resultados presentados indicaban que células T CD8⁺ (que se someten a un lago protocolo de activación, por ejemplo 6 días) son menos propensas a cambiar a un fenotipo Tcm, están en línea con estudios previos que indicaban que hay una ventana temporal en la que células T activadas con Ag pueden ser impulsadas por IL-15 a un fenotipo Tcm [Manjunath et al., J Clin Invest. (2001) 108: 871-878; Carrio et al., J Immunol. (2004) 172: 7315-7323].

EJEMPLO 4

Comparación del anidamiento en los GL de células Tcm con respecto a LTC de veto

Tal como se muestra en el ejemplo 3 anterior, los resultados de la presente invención demostraron claramente que un fenotipo similar a Tcm podía ser inducido mediante aloactivación de corta duración y cultivo de las células en un entorno libre de Ag en presencia de IL-15. Sin embargo, era importante validar, en las condiciones del modelo de rechazo del injerto, que las células que expresan este fenotipo similar a Tcm mostraban anidamiento en los GL superior en comparación con el mostrada por LTC de veto.

Por lo tanto, las células Tcm (descritas en el presente documento) y LTC de veto (presentados anteriormente) se generaron tan como se ha descrito en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento. Después de 2 semanas de expansión in vitro, en presencia de IL-15, las células anteriores se seleccionaron positivamente para expresión de CD62L para crear una población pura de células Tcm (> 96 % de pureza de CD62L⁺) en oposición a los LTC de veto que mostraban baja expresión de CD62L (> 95 % de pureza de CD62L⁻). Las células se marcaron con DIR y se transfirieron de forma adoptiva a huéspedes BALB/C en el contexto del modelo de rechazo del injerto descrito en los ejemplos 1 y 2, anteriormente en el presente documento. Dado que las células Tcm se sometieron

solamente a 60 horas de carencia de IL-2, en lugar del método de carencia de 6 días que demostró previamente in vitro e in vivo reducir la actividad de EICH de LTC de veto [Bachar-Lustig et al., anteriormente], el presente experimento utilizó ratones CB6 [(C57BL/6*BALB/b)F1, H2^{bd}] como fuente para las células transferidas de forma adoptiva. Dos días (figuras 3A-B y figuras 4A-D) o 6,5 días (figuras 5A-C y figuras 6A-J) después de la transferencia adoptiva, los ratones fueron sacrificados y la distribución de células de origen de CB6 en los diferentes órganos se determinó usando imaginología ex-vivo de cuerpo entero (figuras 3A-B y figuras 5A-C) y mediante análisis FACS de la suspensión celular obtenida después del machacado de los órganos (figuras 4A-D y figuras 6A-J).

Tal como queda claro a partir de los resultados, sesenta horas post-trasplante el análisis tanto con IVIS (figuras 3A-B) como el FACS (figuras 4A-D) demostraron indudablemente una diferencia distinta en los patrones de migración entre las dos poblaciones celulares. Mientras que las células Tcm eran claramente visibles en los GL periféricos y mesentéricos (figuras 3A y 4A-B), los LTC de veto apenas fueron detectados en estos órganos y se descubrieron principalmente en los órganos internos (hígado, pulmón, bazo) y la MO (figuras 3B y 4C-D).

También se descubrió un patrón similar después de 6,5 días, dado que las células Tcm, en contraste con LTC de veto, se observaron claramente en los GL (figura 5B). Usando análisis FACS y recuento directo de las células en los órganos machacados (figuras 6A-J) era evidente que LTC de veto están localizados principalmente en el bazo, el hígado y la MO (figuras 6F-J), mientras que se descubrieron 23 veces más células Tcm que LTC de veto en los GL (figuras 6A-E) 6,5 días post-TMO. Se obtuvieron resultados similares ya 2 días post-TMO (no mostrados). Además, se descubrió que el número total de 'Tcm', recogidas de todos los órganos ensayados, se incrementó en 9 veces entre 2 y 6,5 días post-TMO, en claro contraste con los 'LTC', que presentaban proliferación insignificante (figura 6K). Por lo tanto, se concluyó que las 'Tcm' no solamente anidan en los GL de receptores de TMO sino que también proliferan exhaustivamente en el periodo temprano post-trasplante.

EJEMPLO 5

Efecto de transferencia adoptiva a células Tcm sobre la supervivencia de receptores de aloinjerto de MOET

Dado que las células Tcm anidan eficazmente en los GL y muestran un fenotipo asociado a veto (no se muestran los datos) que podría permitir la tolerización de células T del huésped (CTH) colocalizadas, el inventor de la presente invención valoró la capacidad de células Tcm anti-terceros transferidas de forma adoptiva para potenciar la supervivencia de receptores de aloinjerto de MOET, sin ningún tratamiento adicional. Este estudio se llevó a cabo en el modelo de rechazo del injerto descrito anteriormente (véase el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento), que está diseñado específicamente para medir el rechazo del aloinjerto de MOET mediado por células T, sin interferencia a partir de competencia con células madre, que podría producirse en ratones expuestos a acondicionamiento de intensidad reducida.

Por lo tanto, ratones C3H fueron irradiados letalmente y se les infundieron CTH antes del trasplante de aloinjerto de MOET a partir de donantes BALB/C desnudos, en presencia o ausencia de células Tcm anti-terceros purificadas transferidas de forma adoptiva (> 95 % de pureza). Se usaron ratones (C3HxBALB/C)F1 como fuente para las células Tcm para excluir la potenciación potencial de prendimiento o letalidad mediante EICH y/o alorreactividad de las células Tcm.

Tal como puede verse en la figura 7, todos los ratones en el grupo de control de irradiación, no protegidos contra radiación con el injerto de MO, murieron brevemente después del tratamiento de irradiación. En contraste, todos los ratones que recibieron el trasplante de MO sobrevivieron, mientras que la adición de CTH causó rechazo del injerto y letalidad. Sorprendentemente, el rechazo mediado por CTH se superó de forma extraordinaria tras la transferencia adoptiva de 10^7 células Tcm, sin ningún tratamiento adicional (7/8 ratones sobrevivieron).

Para valorar el fallo de CTH en rechazar el injerto de MO cuando se administró junto con células Tcm anti-terceros, el quimerismo en ratones receptores se ensayó a los 80 días post-trasplante mediante análisis FACS de sangre periférica. Tal como se muestra en la figura 8, ratones que recibieron trasplante de MO en solitario, sin ninguna CTH para inducir rechazo (columna A), presentaban niveles comparables de quimerismo con el donador que ratones que recibieron, además de la MO, CTH y 10^7 células Tcm (columna B, > 90 % de quimerismo con el donador). Por lo tanto, las células Tcm permitieron un prendimiento con éxito a pesar de la presencia de CTH alorreactivas.

Además, 80 días post-trasplante, las células Tcm se detectaron fácilmente en la sangre periférica del receptor y comprendían el 44 ± 6 % de las células CD8 totales en la periferia (figuras 9A-B).

Esta elevada persistencia de células Tcm en los receptores de aloinjerto de MOET indicaba que, además de sus marcadas capacidades de inducción de tolerancia, estas células pueden hacer una importante contribución a la reconstitución inmunitaria, después del severo acondicionamiento empleado en receptores de trasplante de MO.

EJEMPLO 6

Comparación directa de capacidades de inducción de tolerancia entre células Tcm y LTC de veto

5 Con el fin de comparar directamente las capacidades de inducción de tolerancia de las células Tcm anti-terceros de la presente invención con los LTC de veto anti-terceros descritos anteriormente, el inventor de la presente invención transfirió de forma adoptiva 10^7 Tcm o LTC de veto derivadas de ratones (C3HxBALB/C)F1 a ratones C3H, receptores de aloinjerto de MOET de BALB/C, en el contexto del modelo de rechazo de injerto descrito anteriormente (véase el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento).

10 Para valorar la capacidad a largo plazo de 'Tcm' anti-terceros de tipo donante transferidas de forma adoptiva de superar el rechazo de aloinjerto de MO, se usó el modelo de rechazo del injerto descrito anteriormente, que está diseñado específicamente para medir el rechazo de aloinjerto de MOET mediado por células T, sin interferencia de competencia de células madre, que podría producirse en ratones expuestos a RIC. Por lo tanto, a ratones C3H se les irradió letalmente y se les infundieron con CTH antes del trasplante de un aloinjerto de MOET procedente de donadores BALB/c-DESNUDOS, en presencia o ausencia de 'Tcm' purificados. Se usaron ratones (C3HxBALB/c)F1 como fuente de 'Tcm' para excluir potenciación potencial del prendimiento de letalidad mediante EICH y/o mediante alorreactividad residual de las 'Tcm'. Tal como puede verse en la figura 10A, todos los ratones en el grupo de control de irradiación, no protegidos contra radiación con el injerto de MO, murieron brevemente después de la irradiación.

15 En contraste, 29 de 30 ratones que recibieron MOET sobrevivieron, mientras que la adición de CTH causó rechazo del injerto y letalidad de los 59 ratones que recibieron este tratamiento. Sorprendentemente, este rechazo mediado por CTH se superó en 16/18 ratones y en 19/23 ratones tras la transferencia adoptiva a 1×10^7 o 5×10^6 'Tcm', respectivamente, mientras que números inferiores de 'Tcm' fueron menos eficaces (figura 10A). Todos los ratones supervivientes presentaban un quimerismo con el donante duradero (>90 %), que persistía durante más de 1 año (no se muestran los datos, el quimerismo con CD8 se presentan en la figura 10C). De hecho, tal como puede verse en la figura 10B, solamente 3/16 de los ratones receptores, que recibieron 1×10^7 LTC, sin rapamicina, sobrevivieron ($p < 0,0001$). Además, las 'Tcm' presentaron sorprendente persistencia in-vivo y podían detectarse en la sangre periférica de los pacientes durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto, incluso a 1 año post-trasplante, células T CD8 positivas H2^{kd} (es decir progenie de las 'Tcm' infundidas) comprendía 19 ± 6 % del compartimento de células T CD8 T total en la sangre periférica (figura 10C).

EJEMPLO 7

35 *Las "Tcm" anti-terceros completamente alogénicas tienen reactividad de ICH reducida y apoyan el prendimiento de aloinjertos de MOET*

Después de demostrar la capacidad de las 'Tcm' para superar el rechazo de aloinjerto de MO mediado por células T, usando donantes de F1 (HostxDonor), desprovistos de alorreactividad, se llevó a cabo una valoración adicional del potencial completo de estas células usando donantes alogénicos completamente incompatibles con CMH. En particular, considerando que 'Tcm' anti-terceros se generan a través de estimulación alogénica inicial durante solamente 60 horas con privación de citocinas (para evitar la regulación negativa de CD62L), en lugar del método de privación de 6 días convencional¹⁹ para generar 'LTC' anti-terceros, era importante evaluar la reactividad de ICH de 'Tcm' completamente alogénicos.

45 Por lo tanto, 'Tcm' anti-terceros purificadas derivadas de BALB/c en comparación con células CD8⁺ indiferenciadas derivadas de BALB/c para su reactividad de ICH tras la transferencia adoptiva en receptores C3H irradiados de forma supra-letal, trasplantados también con MO de BALB/c-DSNUDOS. Los ratones se monitorizaron para supervivencia y signos de EICH: pelaje encrespado, lomo encorvado y peso corporal reducido. Tal como puede verse en la figura 11A, la infusión de 5×10^6 o 2×10^6 'Tcm' no indujo EICH letal y 14/17 de los ratones en cada uno de los grupos sobrevivieron, similar a los receptores de DESNUDO-TMO sin células T adicionales (18/20 de los ratones sobrevivieron). En claro contraste, solamente 1/15 y 2/22 de los ratones que recibieron 5×10^6 o 2×10^6 células T CD8⁺ indiferenciadas, respectivamente, sobrevivieron. Además, el aspecto global de ratones que recibieron 'Tcm', así como el peso, no fueron significativamente diferentes de los mostrados por ratones de control trasplantados con DESNUDO-MO en solitario (figura 11B). Esto también contrasta con los resultados en ratones que reciben células T indiferenciadas, que presentaban pérdida de peso significativa ($p < 0,05$) y presentaban un aspecto global compatible con EICH.

60 Finalmente, la capacidad de estas "Tcm" anti-terceros completamente alogénicas, con reactividad de ICH reducida, para superar el rechazo mediado por células T se evaluó en el contexto del modelo de rechazo del injerto descrito previamente. Tal como puede verse en la figura 11C, 21/25 de los ratones que recibieron 5×10^6 'Tcm' derivadas de BALB/c, sobrevivieron después del trasplante, y presentaron quimerismo con el donante estable (>95 %). En contraste, la infusión de 1×10^7 'LTC' derivados de BALB/c, solamente pudo rescatar 7/27 de los ratones receptores ($p < 0,0001$), y números inferiores de 'LTC' (5×10^6 o 2×10^6) fueron completamente ineficaces para prevenir este rechazo mediado por CTH (no se muestran los datos).

65

EJEMPLO 8

Las 'Tcm' presentan baja actividad de veto in - vitro, pero tras la reactivación adquieren un fenotipo efector, acompañado por actividad de veto potente y específica

Aunque las 'Tcm' anti-terceros anidan de forma eficiente en los GL, la inducción de tolerancia mediante estas células también requiere que estas células estén dotadas de una potente actividad de veto. En general, células T CD8+ que portan un fenotipo de Tcm demostraron previamente mostrar mecanismos efectores de LTC débiles, pero su actividad de veto no ha sido descrita nunca.

Para evaluar la actividad de veto de 'Tcm', se usó un ensayo con células efectoras CD8⁺ TCR transgénicas (el modelo 2c). Las células 2c CD8⁺ expresan un TCR transgénico contra H-2^d y, por lo tanto, son propensas a eliminación de veto solamente mediante 'LTC' de veto de origen de H-2^d y no mediante 'LTC' específicos de un tipo diferente a H-2, que no son reconocidos por las células 2c¹⁹. Las células 2c pueden identificarse específicamente usando el anticuerpo 1B2 clonotípico. Se usaron ratones CB6 como fuente para células de veto para excluir hipotética alorreactividad residual contra las células 2c. De acuerdo con estudios previos, las 'LTC', que portan un fenotipo efector, mostraban inhibición eficiente de la expansión de células 2c (figura 12A), causada por apoptosis, tal como se indica mediante tinción con Anexina V (figura 12B). En contraste, las 'Tcm' mostraban mala reactividad inhibitoria (figura 12A) y no conseguían inducir apoptosis en las células 2c, tal como se sugería mediante niveles más bajos de tinción con Anexina V (figura 12B).

Sin embargo, la reactivación breve de las 'Tcm', causó la regulación negativa de la expresión de CD62L (no se muestran los datos) y una actividad supresora marcadamente potenciada (figura 12A) mediada probablemente a través de un mecanismo basado en eliminación, tal como se ha indicado mediante tinción con Anexina V (figura 12B). Además, 'Tcm' reactivadas, de forma similar a 'LTC', presentaban actividad de veto específica, tal como se muestra comparando 'Tcm' "específicas" reactivadas o 'LTC' derivados de CB6 (H2^{bd}) o células T CD8+ de (C57xC3H)F1 (H2^{bk}) "no específicas", que no expresan la molécula H-2^d y no son reconocidas por las células T 2c CD8+. Por lo tanto, solamente 'Tcm' reactivadas "específicas" o 'LTC', inhibían eficazmente la expansión de células 2c (figura 12C) y fueron capaces de inducir expresión de Anexina V en las células efectoras 2c (figura 12D). Colectivamente, estos resultados sugieren que las 'Tcm' no poseen actividad de veto intrínseca, pero tras la reactivación, adquieren un fenotipo efector y actividad de veto. Esto es coherente con la rápida inducción del fenotipo y la función efectores descritos anteriormente para células T CD8+ que portan un fenotipo de Tcm tras la reactivación. Colectivamente, los datos descritos anteriormente sugieren que el anidamiento potenciado a los GL y la actividad de veto eficiente in-vitro, son mutuamente excluyentes. No obstante, dado que la reactivación de las 'Tcm' mejoraba drásticamente su actividad de veto, resultaba de interés determinar si las 'Tcm' transferidas de forma adoptiva pueden reactivarse en los GL de receptores de aloinjerto de MO, en los que células T de tipo del huésped, transferidas de forma adoptiva pueden montar respuestas anti-donante. De hecho, 4 días después de la transferencia adoptiva a las 'Tcm' purificadas, un número significativo de las células infundidas recuperadas de los GL mostraban expresión marcadamente reducida de CD62L (figura 12E), indicando que la reactivación podría haberse producido, posiblemente como resultado de estímulos inducidos mediante el acondicionamiento letal y/o la alorreactividad de CTH.

EJEMPLO 9

Las 'Tcm' eliminan específicamente células T anti-donante in-vivo

Considerando que las 'Tcm' anidan de forma eficiente en los GL de ratones receptores y muestran un fenotipo asociado a veto, lo que podría permitir la tolerización de CTH colocalizadas, se valoró la capacidad de 'Tcm' transferidas de forma adoptiva para suprimir células T específicas de Ag in-vivo. Para evaluar exclusivamente la actividad de tolerización de las 'Tcm', sin interferencia de la actividad de veto bien documentada de células de MO y células derivadas de MO^{13,15,18}, se estableció un modelo de TMO singénico en el que ratones huésped C57BL/6 (H2^b) irradiados letalmente se protegieron contra la radiación con células de MO de C57BL/6-DESNUDOS singénicas. Además, los ratones receptores recibieron células T 2C (H2^b) CD8+ y esplenocitos de BALB/c (H2^d) irradiados, lo que induce la expansión de células 2c in-vivo. Después de 1 día tras la transferencia de las células 2c y sus estimuladores, los receptores recibieron "Tcm" purificadas (H2^{bd}) derivadas de CB6 "específicas", o "Tcm" purificadas derivadas de C57BL/6 "no específicas", que no expresan la molécula H-2^d y, por lo tanto, no son reconocidas por las células T 2c CD8+. Se recogieron bazos de los receptores, y se evaluaron 8 días post-trasplante para la presencia de las células 2c. Sorprendentemente, las 'Tcm' "específicas" inhibían de forma eficaz (71 % de inhibición) la expansión de las células 2c (figuras 13A-B), en comparación con 'Tcm' "no específicas", que mostraban solamente el 20 % de inhibición. Además, la tinción con Anexina V indicaba que el mecanismo de inhibición, presentado por las 'Tcm' "específicas", estaba mediado a través de inducción de apoptosis tras reconocer células 2c (figuras 13C-D).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen EICH que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), en la que dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprende un distintivo CD8⁺, CD62L⁺, CD45RA⁻, CD45 RO⁺, y en la que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de un trasplante.
- 10 2. La población de células aislada de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto humano que lo necesita, en el que dicha enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad maligna, una enfermedad asociada con el trasplante de un injerto y una enfermedad autoinmunitaria.
- 15 3. La población de células aislada de la reivindicación 1, para uso como un tratamiento adyuvante para un trasplante de células o de tejido en un sujeto humano, en el que dicho sujeto necesita un trasplante de células o de tejido.
- 20 4. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicha población de células aislada se administra antes de, conjuntamente con, o después de dicho trasplante de células o de tejido.
- 25 5. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicha población de células aislada es singénica con el sujeto.
- 30 6. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicha población de células aislada no es singénica con el sujeto.
- 35 7. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicho trasplante de células o de tejido se deriva de un donante seleccionado entre el grupo que consiste en un donante alogénico ALH idéntico, un donante alogénico no ALH idéntico y un donante xenogénico.
- 40 8. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicho trasplante de células o de tejido es singénico con el sujeto.
- 45 9. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicho trasplante de células o de tejido comprende células hematopoyéticas inmaduras.
- 50 10. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicho trasplante de células o de tejido comprende un cotrasplante de varios órganos.
- 55 11. La población de células aislada para uso de la reivindicación 3, en la que dicho trasplante de células o de tejido y dicha población de células aislada se derivan del mismo donante.
- 60 12. Un método de generación de la población de células aislada de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros en condiciones que permitan la eliminación de células reactivas en ICH, en el que dichas condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden un cultivo derivado de citocinas; y
 - (b) cultivar dichas células que resultan de la etapa (a) en presencia de IL-15 en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), en el que dichas condiciones comprenden un entorno libre de antígenos,
 generando de este modo la población de células aislada de la reivindicación 1.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dichas condiciones que permiten la eliminación de células reactivas en ICH comprenden al menos 2 días de cultivo.
14. El método de la reivindicación 12, en el que dichas condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden la presencia de IL-7 o IL-21.
15. El método de la reivindicación 12, en el que dichas condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden la presencia de IL-7 e IL-21.
16. El método de la reivindicación 12, en el que dichas condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden al menos 14 días de dicho cultivo.

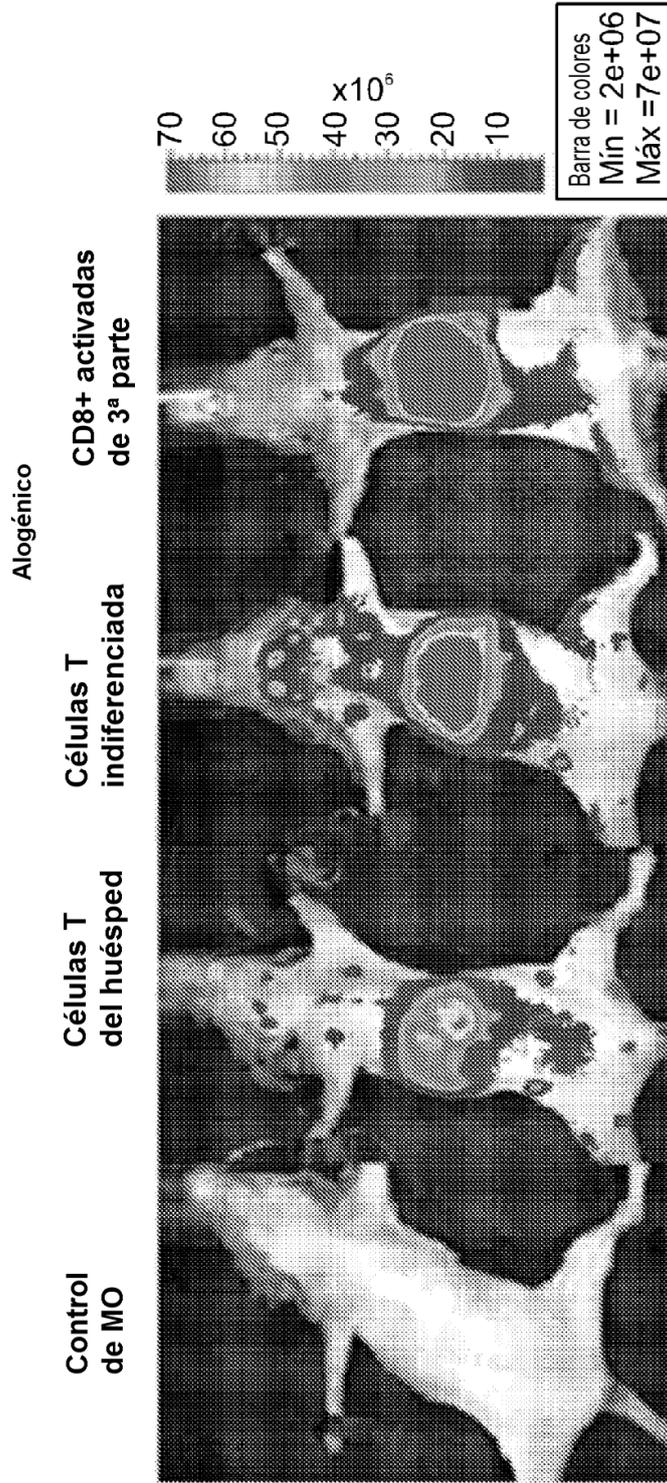


FIG. 1A FIG. 1B FIG. 1C FIG. 1D

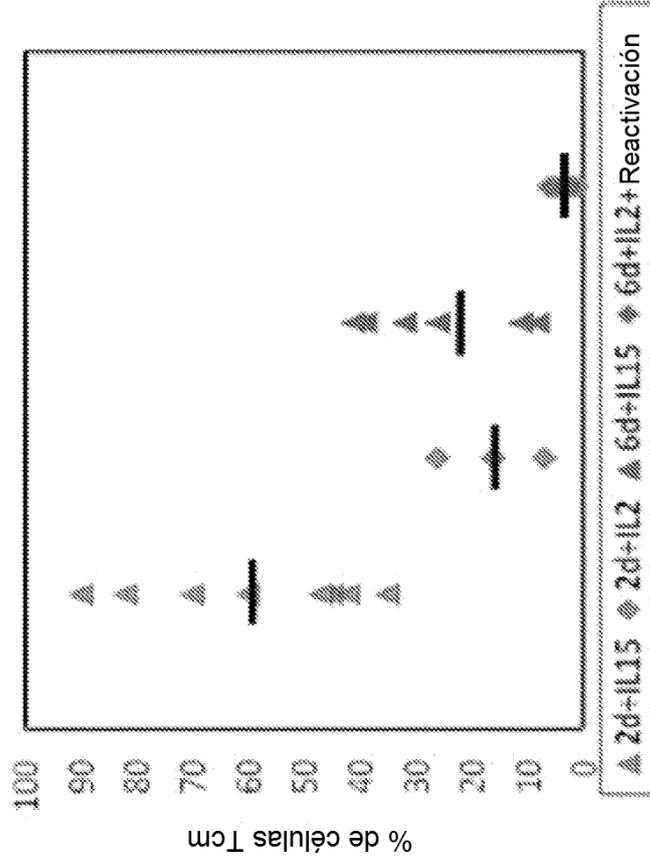


FIG. 2B

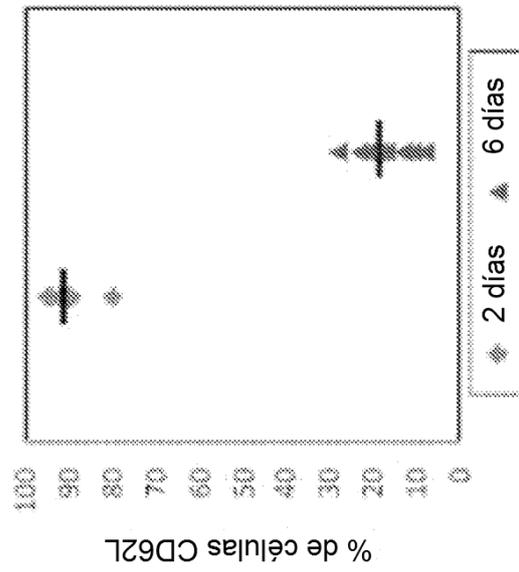


FIG. 2A

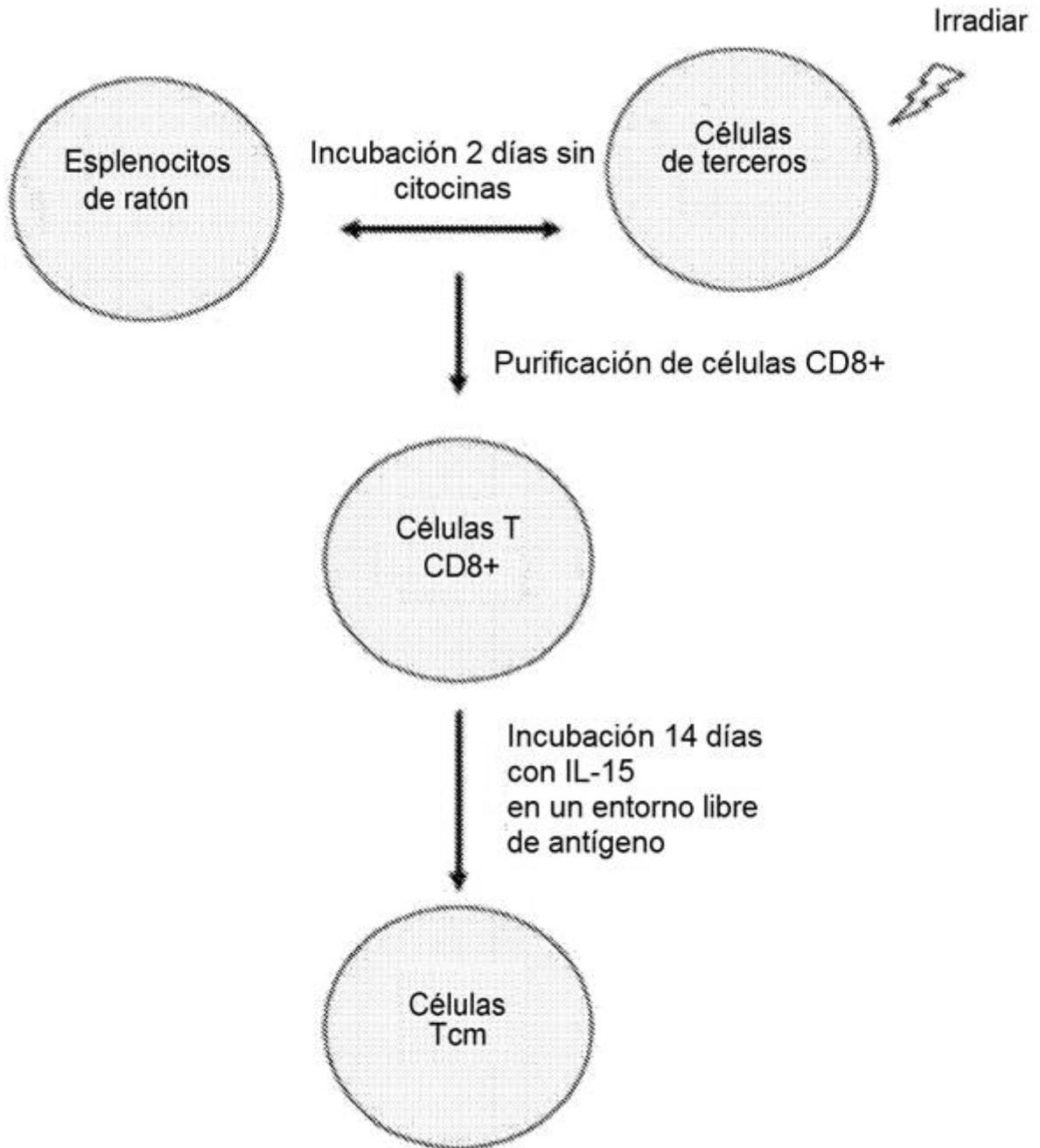


FIG. 2C

Similar a Tcm

LTC de veto

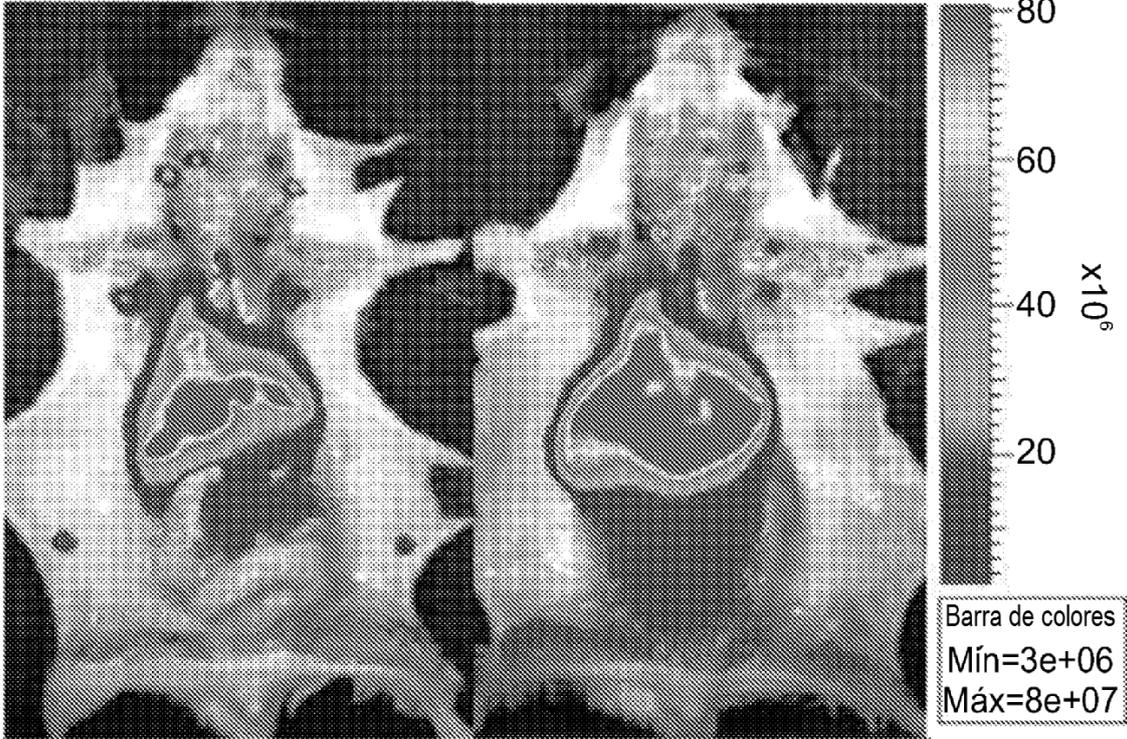


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 4C

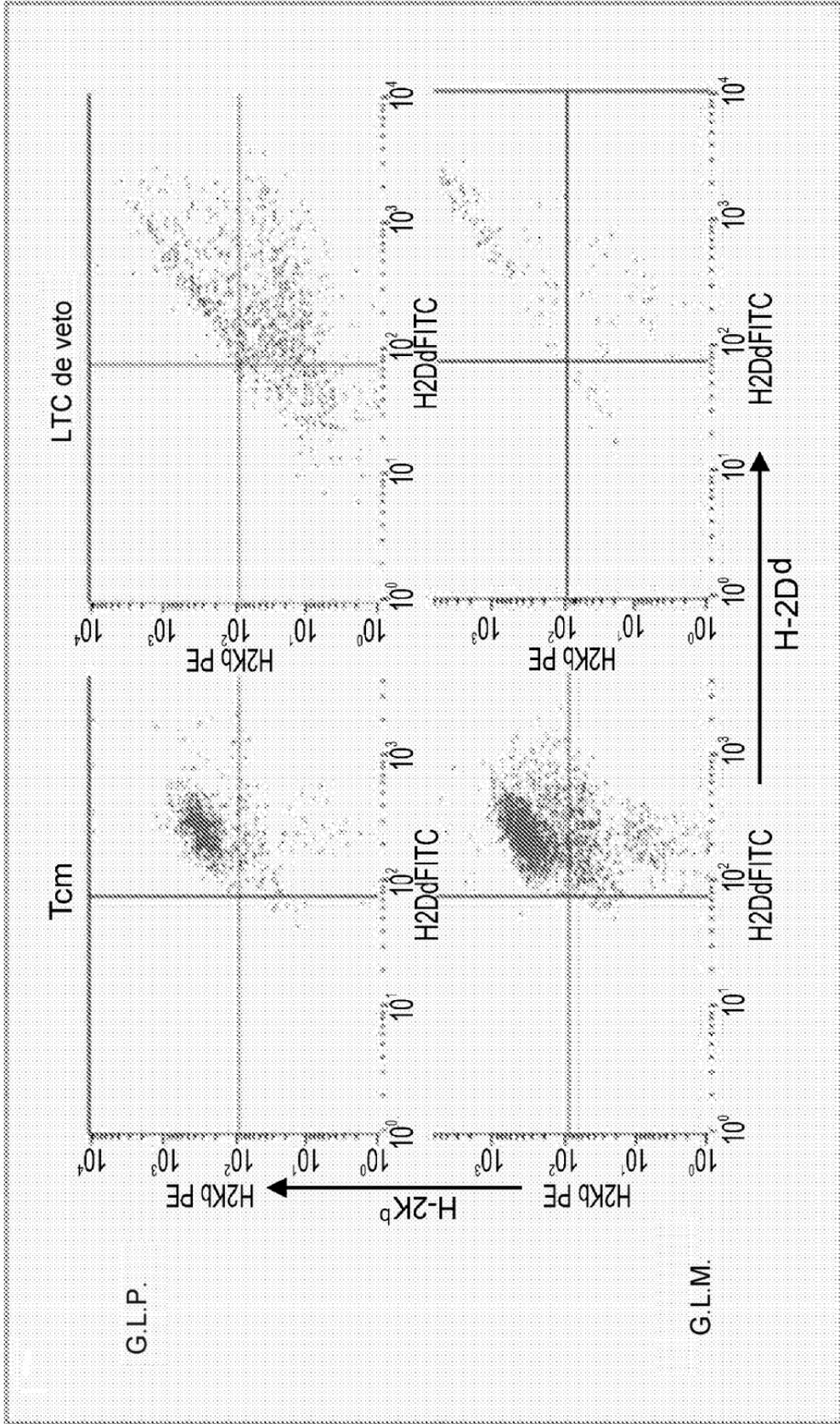
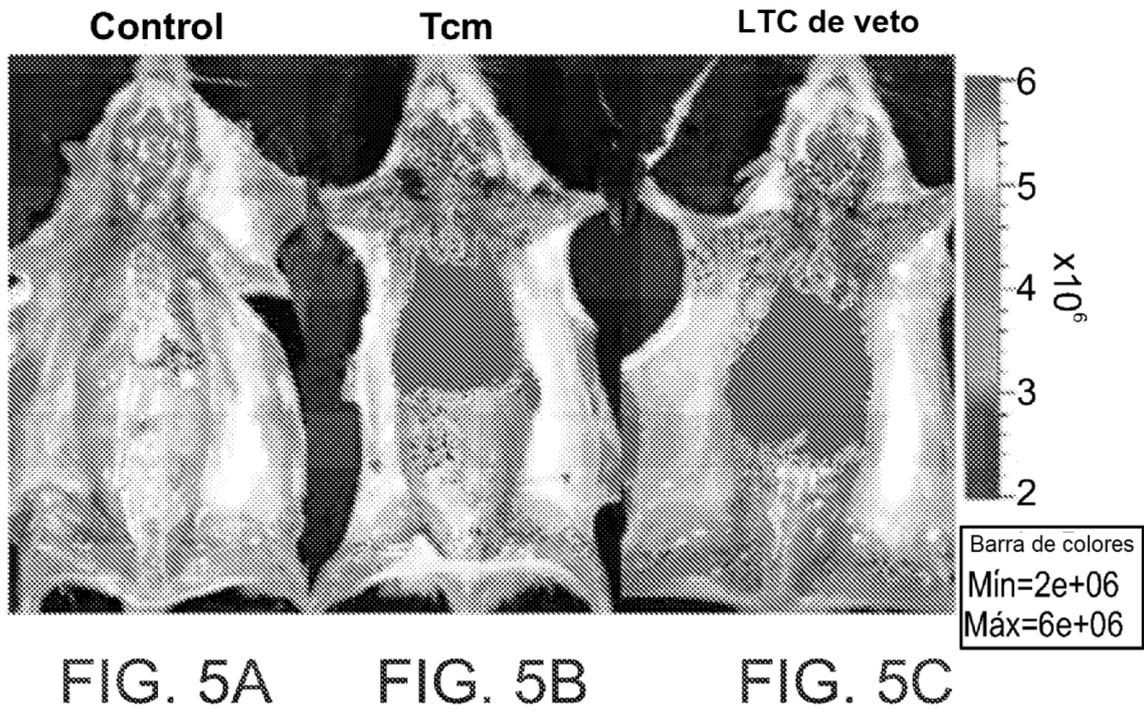
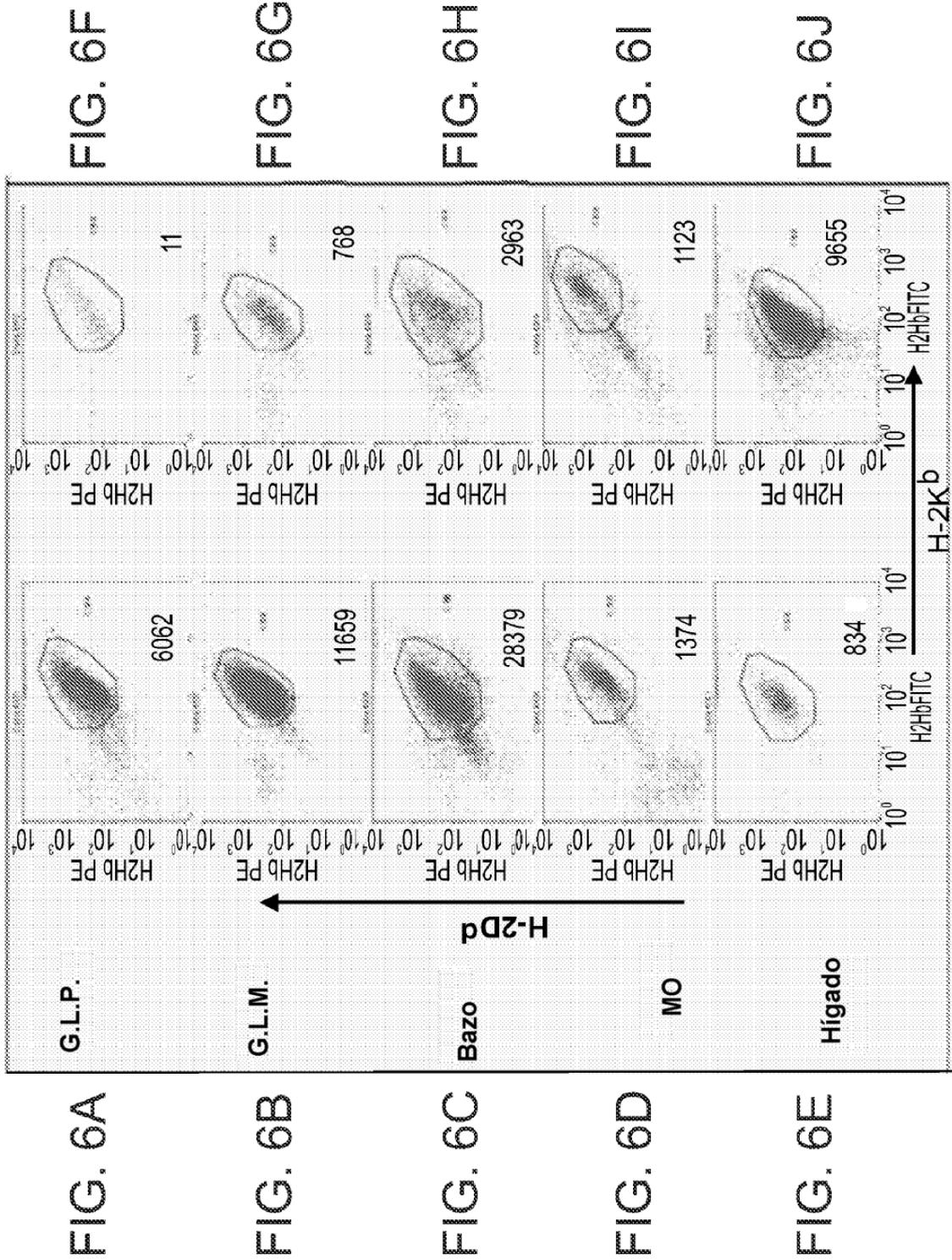


FIG. 4A

FIG. 4D

FIG. 4B





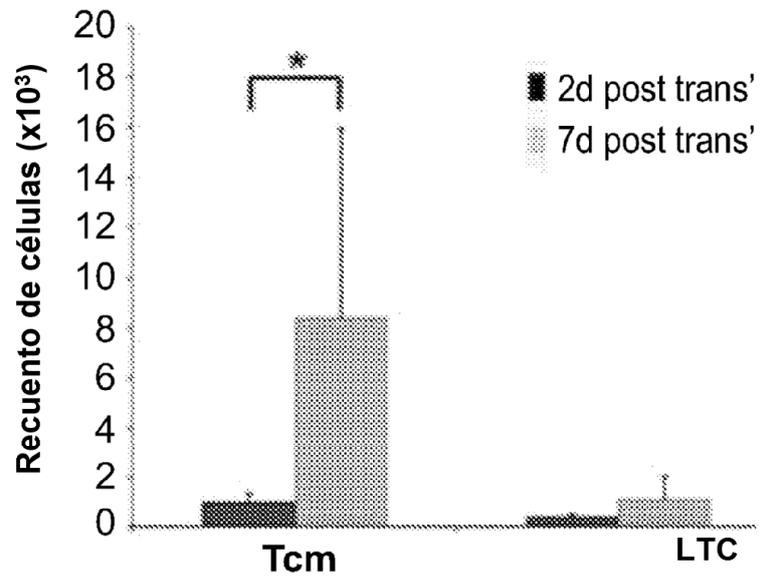
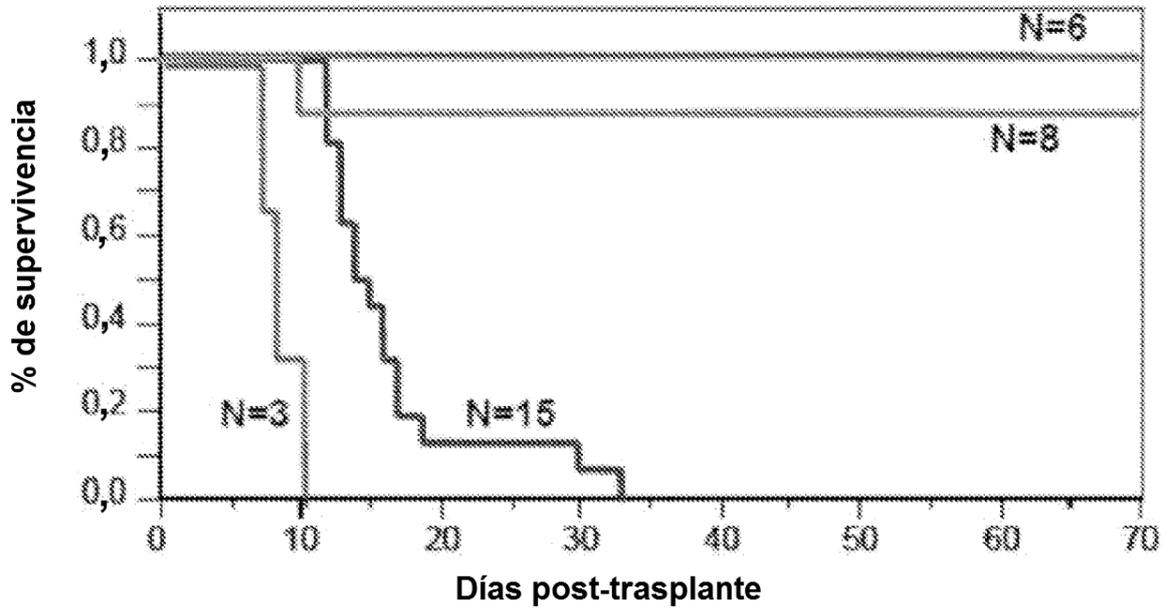


FIG. 6K



Irradiación (10 Gy)	=====
10 Gy + 3×10^6 Balb-Nu MO	=====
10 Gy + Balb-NuMO + $1,25 \times 10^4$ CTH	=====
10 Gy + Balb-NuMO + CTH + 10^7 (C3HxBalb)F1 T _{CM}	=====

FIG. 7

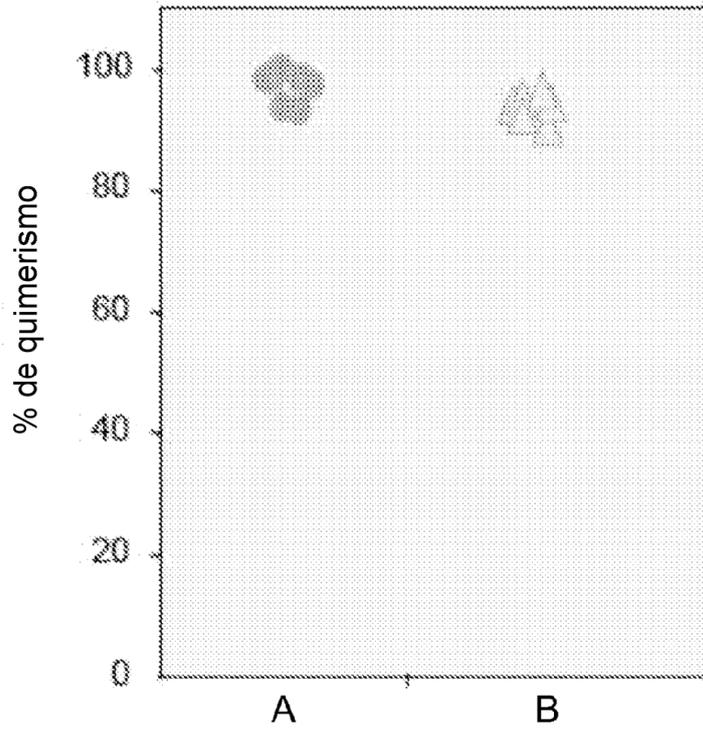


FIG. 8

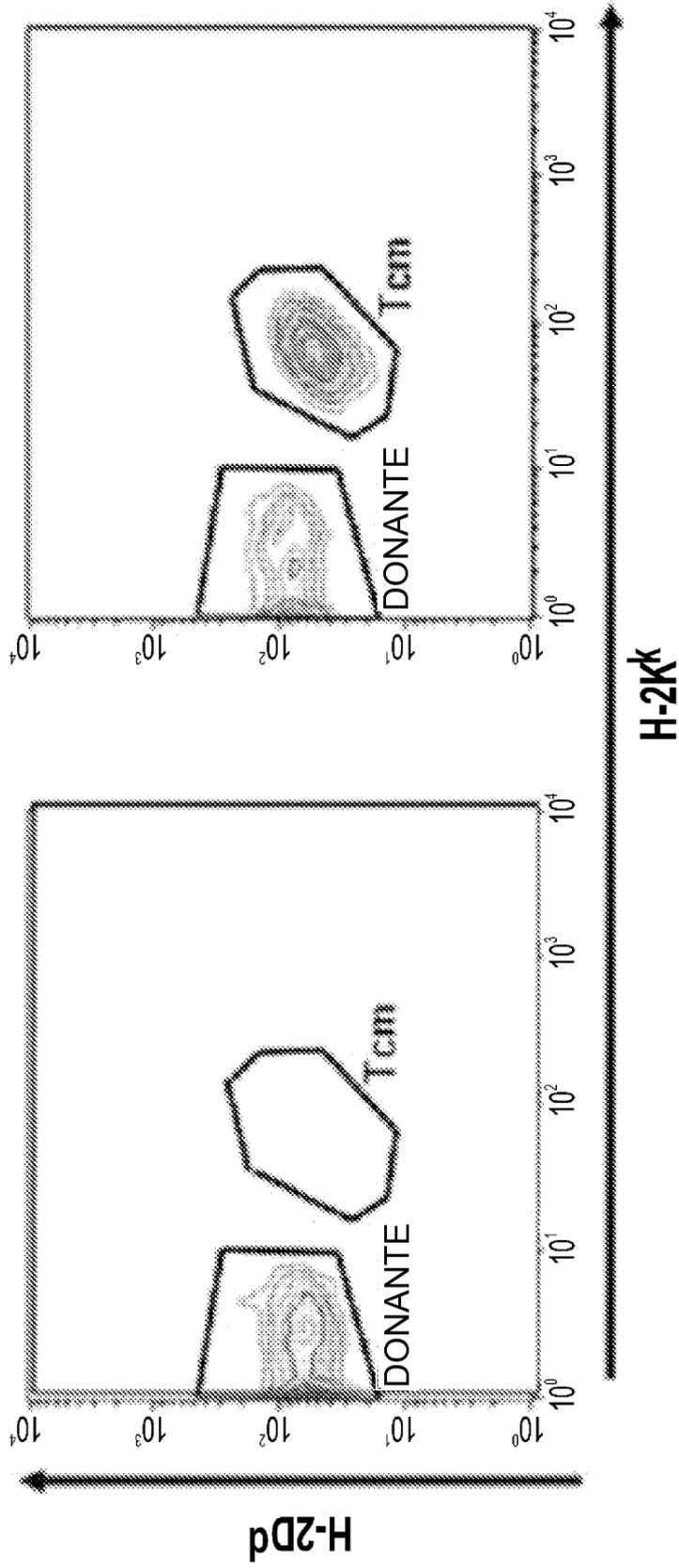


FIG. 9B

FIG. 9A

FIG. 10A

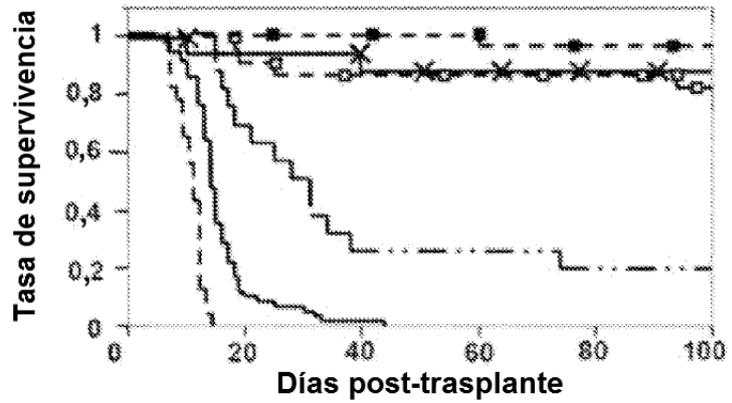


FIG. 10B

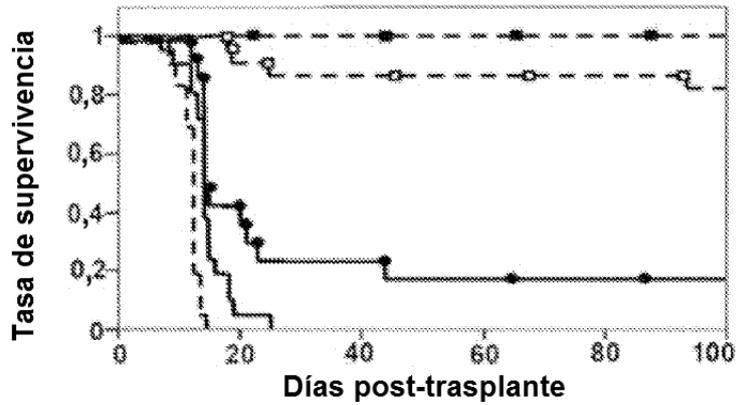


FIG. 10C

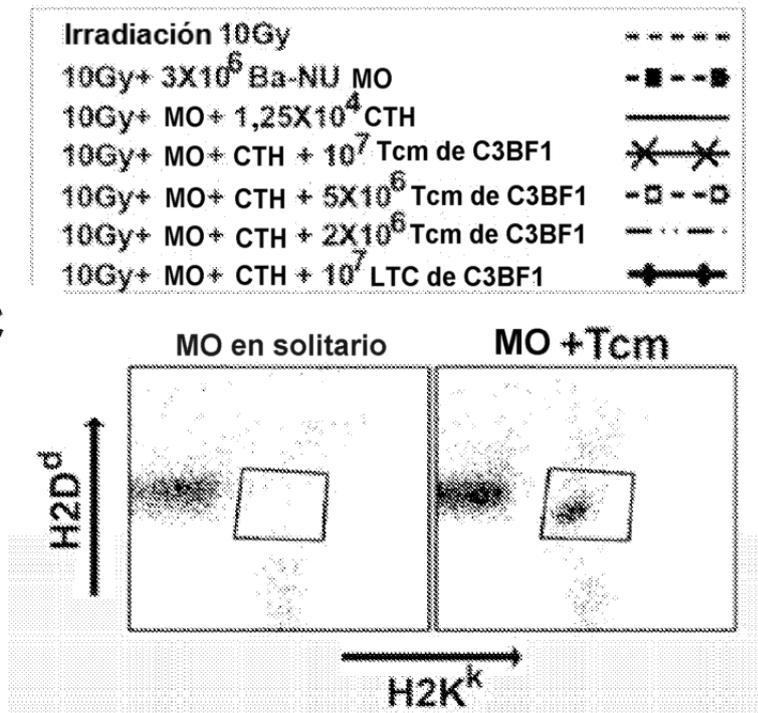


FIG. 11A

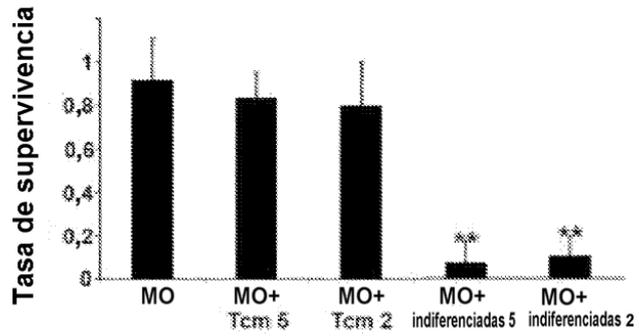


FIG. 11B

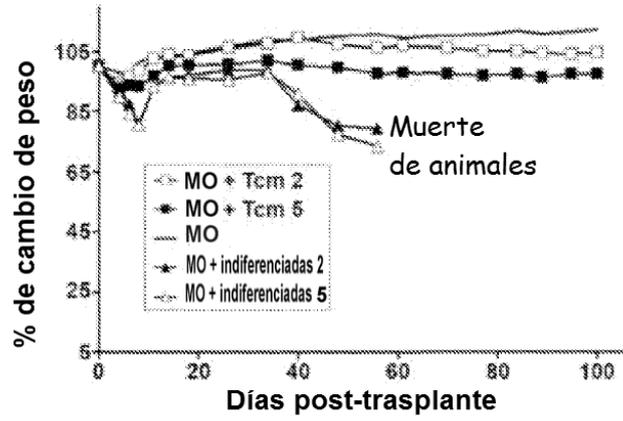
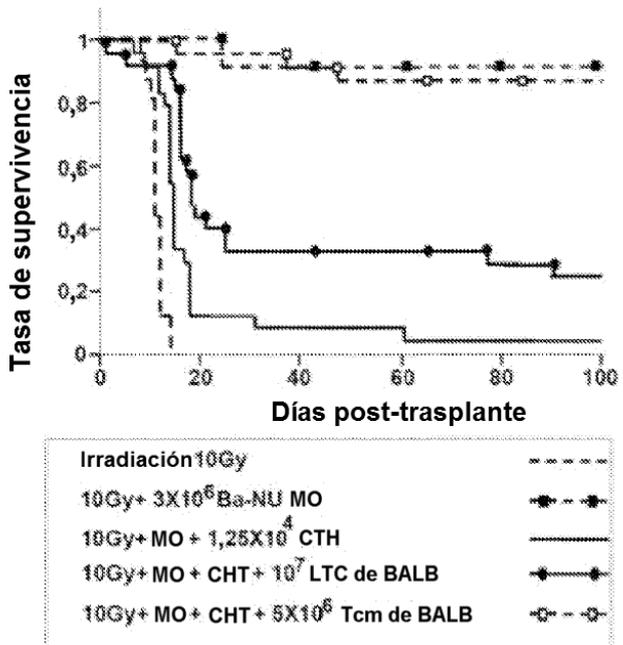


FIG. 11C



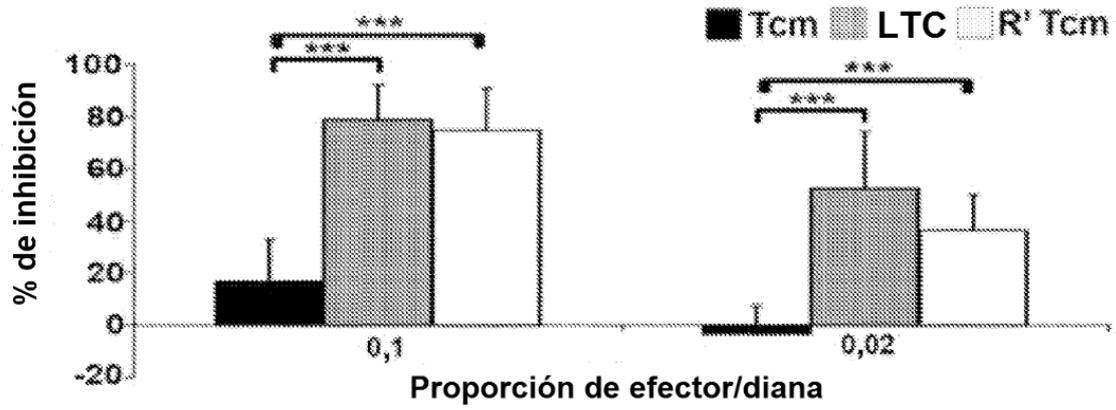


FIG. 12A

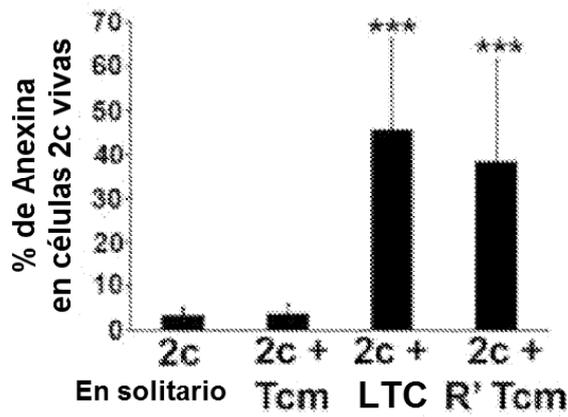


FIG. 12B

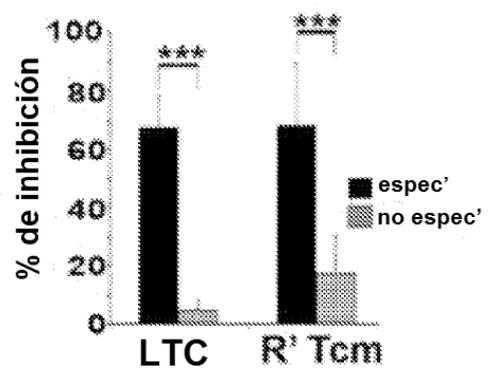


FIG. 12C

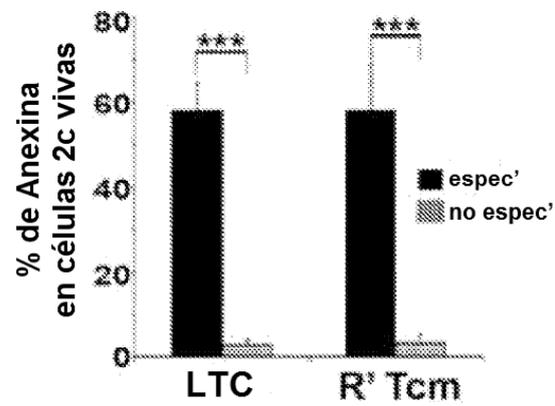


FIG. 12D

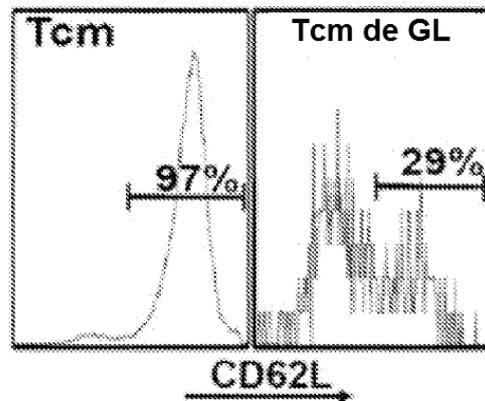


FIG. 12E

FIG. 13A

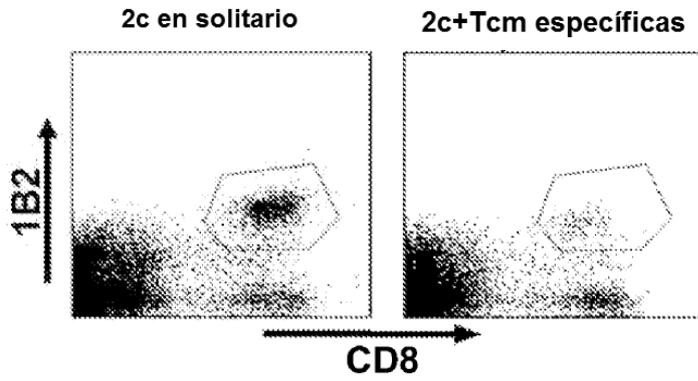


FIG. 13B

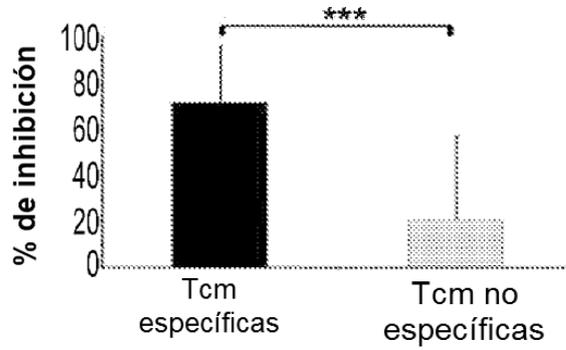


FIG. 13C

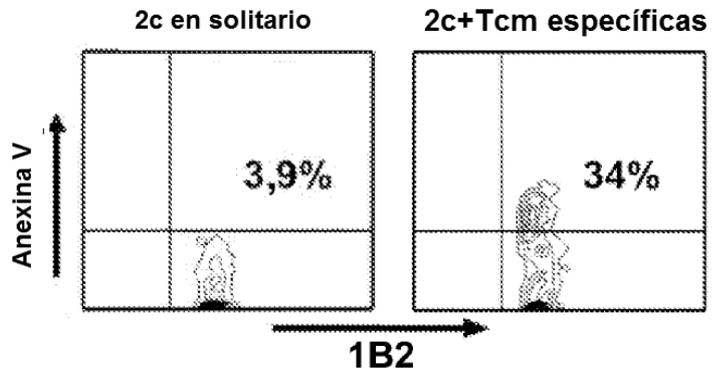


FIG. 13D

