

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 102**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A61K 31/59 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006** **E 11179826 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017** **EP 2443922**

54 Título: **El uso de células apoptóticas ex vivo para generar linfocitos T reguladores**

30 Prioridad:

02.11.2005 US 732847 P

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

19.09.2017

73 Titular/es:

THERAKOS, INC. (100.0%)
437 Creamery Way
Exton, PA 19341, US

72 Inventor/es:

PERITT, DAVID;
CAMPBELL, KIM y
KRUTSICK, AMY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 633 102 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

El uso de células apoptóticas *ex vivo* para generar linfocitos T reguladores

5 **Antecedentes de la invención**

10 Muchos tipos de células del organismo pueden eliminar los restos apoptóticos y celulares de los tejidos; sin embargo, el fagocito profesional, o célula presentadora de antígeno (APC), tiene una alta capacidad para hacerlo. El reconocimiento de las células apoptóticas ("AC") se produce a través de una serie de receptores de patrones moleculares asociados a las AC, evolutivamente conservados, ("ACAMPR") en APC que reconocen y se unen a los patrones moleculares asociados a células apoptóticas correspondientes ("ACAMP"). Estos receptores reconocen ligandos tales como fosfatidil serina y lípidos oxidados que se encuentran en las células apoptóticas. Savill *et al.* (2002); y Gregory *et al.* (2004).

15 Tanto *in vitro* como *in vivo*, ese aclaramiento de AC por las APC *in vivo* regula las respuestas inmunes. Savill *et al.* (2002). Esta modulación inmune parece ocurrir principalmente a través de una alteración de la función de las APC con varias marcas distintivas de una APC inductora de la tolerancia. Estas APC tolerogénicas inducen tolerancia a través de una variedad de mecanismos incluyendo la generación de linfocitos T reguladores ("T reg").

20 Los T reg comprenden un grupo heterogéneo de linfocitos T, que inhiben activamente las respuestas inmunes. Groux *et al.* (1997); Sakaguchi *et al.* (2001); y Roncarolo *et al.* (2001). Existe la posibilidad de desarrollar terapias con T reg para una variedad de enfermedades.

25 Una forma de generar T reg *in vivo* es a través de la infusión de AC. Hay pruebas de tanto modelos animales como tratamientos humanos de que la infusión de AC, como ocurre durante la fotoforesis extracorporal (ECP), induce T reg. Maeda *et al.* (2005); Lamioni *et al.* (2005); Aubin *et al.* (2004); Mahnke *et al.* (2003); y Saas *et al.* (2002).

30 Otros métodos de generación de T reg *ex vivo* incluyen exponer los linfocitos T a una variedad de sustancias incluyendo: IL-10 (Roncarolo *et al.* (2001); y Zeller *et al.* (1999)); TGFβ (Zheng *et al.* (2004); Gray *et al.* (1998); Horwitz *et al.* (1999); Ohtsuka *et al.* (1999a); Ohtsuka *et al.* (1999b); Stohl *et al.* (1999); Gray *et al.* (2001); Horwitz (2001); Yamagiwa *et al.* (2001); Horwitz *et al.* (2002); y Zheng *et al.* (2002)); αMSH (Luger *et al.* (1999); Taylor (2005); Namba *et al.* (2002); Nishida *et al.* (1999); Nishida *et al.* (2004); Streilin *et al.* (2000); Taylor *et al.* (1992); Taylor *et al.* (1994a); Taylor *et al.* (1994b); Taylor *et al.* (1996); Taylor (1999); Taylor (2003); y Taylor *et al.* (2003)); vitamina D3 (Willheim *et al.* (1999); Penna *et al.* (2000); Pedersen *et al.* (2004); May *et al.* (2004); Koren *et al.* (1989); Gregori *et al.* (2001); Cobbold *et al.* (2003); y Barrat *et al.* (2002)); dexametasona (Pedersen *et al.* (2004); Barrat *et al.* (2002); y O'Garra *et al.* (2003)); y purificación (Earle *et al.* (2005); Schwarz *et al.* (2000); Chatenoud *et al.* (2001); Tang *et al.* (2004); y Masteller *et al.* (2005)).

40 Las enfermedades autoinmunes implican la activación inapropiada de las células inmunes que son reactivas contra el propio tejido. Estas células inmunes activadas potencian la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. Otras enfermedades en las que participan los linfocitos T incluyen la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), que se produce en el contexto del trasplante. En la GVHD, los linfocitos T del donante rechazan los tejidos y órganos del receptor generando un ataque contra el organismo del receptor. Una serie de otras enfermedades implican la desregulación del sistema inmune del hospedador. Algunos se tratan mejor con productos farmacéuticos, algunos con productos biológicos, otros con tratamientos tales como la fotoforesis extracorporal (ECP), y otros tienen opciones de tratamiento muy limitadas.

50 La ECP ha demostrado ser una terapia eficaz en ciertas enfermedades mediadas por los linfocitos T. En el caso de la GVHD, se ha usado la fotoféresis como tratamiento en asociación con pomada tópica de triamcinolona, antifúngica, antiviral, antibióticos, inmunoglobulinas y metotrexato. La ECP también se ha usado con agentes inmunosupresores tales como el micofenolato de mofetilo, tacrolimus, prednisona, ciclosporina, hidroxycloloquina, esteroides, FK-506 y talidomida para la GVHD crónica ("cGVHD") y la cGVHD refractaria. Para los trasplantes de órganos sólidos, la ECP se ha usado junto con agentes inmunosupresores para reducir el número de episodios de rechazo agudo de aloinjertos asociados con los aloinjertos renales y los trasplantes cardíacos. Por ejemplo, la ECP se ha usado con OKT3 y/o los agentes inmunosupresores prednisona, azatioprina y ciclosporina para revertir el rechazo agudo de los aloinjertos renales. La ECP también se ha usado con la ciclofosfamida, la irradiación corporal total fraccionada y el etopósido para el trasplante alogénico de médula para la leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma no Hodgkin o anemia aplásica severa.

60 **Sumario de la invención**

65 La incubación *ex vivo* con leucocitos en un sistema alogénico conduce a la generación de linfocitos T con actividad reguladora. Esto genera linfocitos T reguladores ("linfocitos T reg" o "T reg") con actividad para suprimir las respuestas inmunes contra el aloantígeno.

En sistemas específicos del antígeno y de activación policlonal, se puede obtener un resultado específico del

antígeno mediante la adición de antígeno u otra estimulación con células autólogas apoptóticas ("AC").

La presente invención engloba un método de generación de linfocitos T con actividad reguladora según lo definido por la reivindicación 1. Las características opcionales están definidas por las reivindicaciones dependientes.

La presente divulgación incluye un método de tratamiento de un trastorno autoinmune o de mejora de uno o más de sus síntomas, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

La presente divulgación incluye un método de tratamiento de una enfermedad atópica o de mejora de uno o más de sus síntomas, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

La presente divulgación incluye un método de administración a un receptor de un trasplante de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

La presente divulgación incluye un método de administración a un paciente de GVHD de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

La presente divulgación incluye un método de tratamiento de un paciente con un trastorno o predisposición a padecer un trastorno mediante el análisis del paciente para determinar si tiene un trastorno y mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de A: Generación de T reg; B: Tras la generación de los linfocitos T reguladores, colocación de los linfocitos T reg en MLR.

La Figura 2 muestra que los linfocitos T reguladores generados mediante la incubación junto con PBMC tratadas con ECP inhiben la proliferación de los linfocitos T singénicos.

La Figura 3 muestra que los linfocitos T reguladores generados mediante la incubación junto con PBMC tratadas con ECP inhiben la proliferación de los linfocitos T mejor que los linfocitos Tr1 convencionales.

La Figura 4 muestra que la generación de linfocitos T reguladores mediante la incubación junto con PBMC tratadas con ECP se puede invertir a través de la adición de interleucina 2.

La Figura 5 muestra que la actividad supresora de los linfocitos T reguladores generados mediante la incubación junto con PBMC tratadas con ECP depende del contacto.

Descripción detallada

Generación ex vivo de T reg usando AC

Los sistemas que se producen *in vivo* para generar T reg son bastante complejos y se basan en una serie de tipos de células y en la ubicación morfológica. Sin embargo, la presente invención muestra que es posible generar estas células *in vitro* en las condiciones descritas en el presente documento. La incubación *ex vivo* con leucocitos en un sistema alogénico conduce a la generación de linfocitos T con actividad reguladora. Esto genera linfocitos T reguladores ("linfocitos T reg") con actividad para suprimir las respuestas inmunes contra el aloantígeno, importantes en una amplia variedad de trastornos incluyendo, sin limitación, enfermedades autoinmunes, enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) y trasplante de órganos sólidos. En sistemas específicos del antígeno y de activación policlonal, se puede obtener un resultado específico del antígeno mediante la adición de antígeno u otra estimulación con células autólogas apoptóticas ("AC").

Este método de producción *ex vivo* ofrece varias ventajas frente a los métodos inducidos por fármacos descritos anteriormente. Es importante destacar que se evitan los posibles efectos tóxicos y no naturales de estas moléculas añadidas.

Además, existen ventajas de la generación *ex vivo* frente a la utilización *in vivo* de células apoptóticas incluyendo, sin limitación, un mayor control frente al número, la actividad y la función de estas células. Este control terapéutico proporciona mejores protocolos de tratamiento al paciente.

Mediante la generación de T reg usando una serie de métodos tales como la purificación, activación y adición de factores de diferenciación tales como TGF β , α MSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3 y dexametasona, se ha

demostrado que estas células se pueden generar *ex vivo*. Las células apoptóticas proporcionan un método de tipo más "*in vitro*" para inducir estas células mediante la generación de APC tolerógenas.

5 La presente divulgación incluye un método de generación de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) mediante la incubación de leucocitos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

La presente divulgación incluye composiciones de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

10 La presente divulgación incluye un método de tratamiento de un trastorno autoinmune o de mejora de uno o más de sus síntomas, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

15 Los trastornos autoinmunes incluyen, sin limitación, mielitis transversa aguda, alopecia areata, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprúe-dermatitis por enfermedad celíaca trastornos espinocerebelosos cerebelosos, degeneraciones espinocerebelosas (ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelosas),
 20 alcoholismo crónico, hepatitis inducida por el alcohol, hepatitis autoinmune, síndrome de disfunción inmunológica crónica de fatiga (CFIDS), enfermedad inflamatoria intestinal crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad de Churg-Hodgkin, penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de CResT, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Crohn, atrofia de Dejerine-Thomas, demencia pugilística, diabetes mellitus, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, lupus discoide, trastornos de ganglios basales, coagulación
 25 intravascular diseminada, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por fármacos, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de hospedador contra injerto, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, corea de Huntington, corea senil, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, atrofia muscular espinal infantil o juvenil, diabetes dependiente de insulina, artritis juvenil, patología de Kawasaki, lesiones
 30 del sistema corticoespinal, leucemias, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, liquen plano, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shy-Drager, Machado-Joseph), miastenia gravis, neurogénica muscular, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, parálisis
 35 supranuclear progresiva, soriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumática, sarcoidosis, esclerodermia, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, panencefalitis esclerosante subaguda, trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteemia, ataxia, telangiectasia, trastorno del sistema múltiple mitocondrial), lupus eritematoso sistémico (LES), arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroidiasis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo,
 40 granulomatosis de Wegener, síndrome de Wernicke-Korsakoff.

La presente divulgación incluye un método de tratamiento de una enfermedad atópica o de mejora de uno o más de sus síntomas, mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con
 45 células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

Los trastornos atópicos incluyen, sin limitación, patologías inflamatorias crónicas y patologías inflamatorias vasculares, incluyendo patologías inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, colitis ulcerosa y patología de Crohn y patologías inflamatorias vasculares, tales como, pero sin limitación,
 50 coagulación intravascular diseminada, aterosclerosis y patología de Kawasaki.

La presente divulgación incluye un método de administración a un receptor de un trasplante de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
 55

La presente divulgación incluye un método de administración a un paciente de GVHD de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

60 La presente divulgación incluye un método de tratamiento de un paciente con un trastorno o predisposición a padecer un trastorno mediante el análisis del paciente para determinar si tiene un trastorno y mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición de una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
 65

Los T reg pueden administrarse al paciente de acuerdo con un programa que incluye, sin limitación, dos días, una

semana antes del trasplante; tres días, una semana antes de la extracción de dicho trasplante; dos días a la semana durante dos semanas antes del trasplante; y tres días a la semana durante tres semanas antes del trasplante.

5 Las cantidades eficaces de T reg para su uso en los métodos de tratamiento de la presente invención para obtener el beneficio clínico requerido en un sujeto pueden variar dependiendo del origen de las células, el estado del sujeto, la edad y el peso del sujeto y otros factores relevantes, que son fácilmente determinables mediante métodos bien conocidos. Preferentemente, el número de T reg administrados a un paciente es de aproximadamente 1×10^5 /kg a aproximadamente 1×10^7 /kg. Más preferentemente, el número de T reg administrados a un paciente es de aproximadamente 1×10^6 /kg.

10 El método de la presente invención engloba la incubación de las AC y los leucocitos durante un tiempo y en condiciones suficientes para generar T reg. La incubación puede ser bajo cualquier condición conocida en la técnica que sea adecuada para los leucocitos y durante aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días. Preferentemente, la incubación es durante aproximadamente 8 días.

15 El método de la presente invención incluye además la selección de leucocitos que expresan CD4 para obtener células CD4⁺. Preferentemente, las células son CD4⁺.

20 El método de la presente invención incluye la incubación a cualquier concentración adecuada de AC y células CD4⁺. Preferentemente, las células están en una proporción de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1 de CD4⁺:AC. Más preferentemente, las células están en una proporción de 2:1 a aproximadamente 1:2 de CD4⁺:AC.

25 Las AC de la presente invención se obtienen mediante un tratamiento inductor de la apoptosis conocido en la técnica. Preferentemente, el tratamiento inductor de la apoptosis es un procedimiento de ECP que emplea un compuesto fotoactivable junto con luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable. Preferentemente, el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA. Preferentemente, el psoraleno es 8-MOP.

30 El método de la presente invención puede incluir la incubación con factores añadidos que potencien además la generación o función de los T reg. Los factores adecuados incluyen, sin limitación, hormonas, proteínas, fármacos o anticuerpos. Preferentemente, los factores incluyen, sin limitación, uno de TGFβ, αMSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3, dexametasona, rapamicina e IL-2. Preferentemente, el factor es IL-10. Preferentemente, la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. Preferentemente, la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml.

35 El método de la presente invención puede incluir la adición de un antígeno a la incubación para generar T reg que regulen la respuesta inmune al antígeno. Preferentemente, el antígeno es un aloantígeno. Dichos antígenos pueden seleccionarse de cualquiera conocido en la técnica.

40 Las poblaciones de células útiles en los métodos de la presente invención comprenden "células apoptóticas" que incluyen células y cuerpos celulares, es decir, cuerpos apoptóticos que presentan o presentarán una o más rasgos caracterizadores de la apoptosis. Una célula apoptótica puede comprender cualquier célula que esté en la fase de inducción, en la fase efectora o en la fase de degradación. Las poblaciones de células en las terapias de la invención también pueden comprender células que se han tratado con un agente inductor de la apoptosis que todavía son viables. Dichas células pueden presentar rasgos caracterizadores de la apoptosis en algún momento, por ejemplo, después de la administración al sujeto. Preferentemente, las AC son PBMC autólogas que se han tratado con un inductor de la apoptosis. Preferentemente, el inductor de la apoptosis es ECP.

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

55 Los rasgos caracterizadores de la apoptosis pueden incluir, pero sin limitación, la exposición superficial de la fosfatidilserina, como se detecta mediante métodos de detección convencionales aceptados, tales como tinción con Anexina V; alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial medidas mediante métodos convencionales aceptados; la evidencia de fragmentación del ADN, tal como el aspecto escalonado del ADN en electroforesis en gel de agarosa tras la extracción del ADN de las células o mediante el marcaje *in situ*. Salvioli *et al.* (1997); Teiger *et al.* (1996); y Gavrieli *et al.* (1992).

60 La población de células para su uso en la presente invención se induce a convertirse en apoptótica *ex vivo*, es decir, extracorporalmente, y es compatible con las del sujeto, donante o receptor. Una población de células puede prepararse a partir de esencialmente cualquier tipo de célula de mamífero incluyendo estirpes celulares cultivadas. Por ejemplo, una población de células puede prepararse a partir de un tipo de célula derivado del propio cuerpo del sujeto mamífero (autólogo) o de una estirpe celular establecida. En concreto, una población de células puede prepararse a partir de glóbulos blancos de sangre compatible con la del sujeto mamífero, más concretamente, de los propios glóbulos blancos del sujeto e, incluso más concretamente, de los propios leucocitos o linfocitos T del sujeto.

65

También se puede preparar una población de células a partir de una estirpe celular establecida. Una estirpe celular que puede ser útil en los métodos de la presente invención incluye, por ejemplo, células Jurkat (ATCC n.º TIB-152). Otras estirpes celulares apropiadas para su uso de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden ser identificadas y/o determinadas por los expertos en la materia. La población de células puede prepararse extracorporalmente antes de la administración al sujeto, donante o receptor. Así pues, en una realización, puede retirarse una alícuota de sangre del sujeto, sangre del receptor o sangre del donante, por ejemplo, mediante venopunción, y someterse al menos una parte de sus glóbulos blancos extracorporalmente a condiciones que induzcan la apoptosis.

En una realización, la población de células puede comprender un determinado subconjunto de células que incluye, pero sin limitación, leucocitos o células separadas de leucocitos basándose en su expresión de CD4, que son linfocitos T CD4⁺. La separación y purificación de los componentes sanguíneos es bien conocida por los expertos en la materia. De hecho, el advenimiento de la terapia con componentes sanguíneos ha dado lugar a numerosos sistemas diseñados para la recolección de componentes sanguíneos específicos. Varios de estos sistemas de recolección se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, Pa.), Baxter International (Deerfield, Ill) y Dynal Biotech (Oslo, Noruega).

El sistema de separación de Immunicon separa los componentes sanguíneos usando nanopartículas magnéticas (ferrofluidos) recubiertas con anticuerpos que conjugan, es decir, forman un complejo, con los componentes diana en una muestra de sangre. A continuación, se incuba la muestra de sangre se incuba en un campo magnético potente, y el complejo diana emigra hacia fuera del resto de la muestra donde se puede recoger. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 6.365.362; 6.361.749; 6.228.624; 6.136.182; 6.120.856; 6.013.532; 6.013.188; 5.993.665; 5.985.153; 5.876.593; 5.795.470; 5.741.714; 5.698.271; 5.660.990; 5.646.001; 5.622.83.1; 5.597.531; 5.541.072; 5.512.332; 5.466.574; 5.200.084; 5.186.827; 5.108.933; y 4.795.698.

El sistema de separación biomagnética Dynabeads® de Dynal separa los componentes sanguíneos usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos que se conjugan con los componentes diana en una muestra de sangre, formando un complejo de Dynabeads-diana. El complejo se retira entonces de la muestra usando un concentrador de partículas magnéticas (Dynal MPC®). Se pueden recoger varios tipos de células diferentes usando este sistema de separación. Los linfocitos T y los subconjuntos de linfocitos T también pueden aislarse o retirarse positiva o negativamente de la sangre entera, capa leucocítica, células mononucleares en gradiente o tejidos digeridos usando, por ejemplo, el kit CELLlection™ CD2 (n.º de producto 116.03), Dynabeads® M-450 CD2 (n.º de producto 111.01/02), Dynabeads® CD3 (n.º de producto 111.13/14), Dynabeads® plus DETACHaBEAD (n.º de producto 113.03), Dynabeads® M-450 CD4 (n.º de producto 111.05/06), kit de aislamiento negativo de CD4 (linfocitos T auxiliares/inductores) (n.º de producto 113.17), kit de aislamiento positivo de CD8 (n.º de producto 113.05), CD8 Dynabeads® (n.º de producto 111.07/08), kit de aislamiento negativo de CD8 (n.º de producto 113.19), kit de aislamiento negativo de linfocitos T (n.º de producto 113.11), CD25 Dynabeads® (n.º de producto 111.33/34), y expansor de linfocitos T CD3/CD28 Dynabeads® (n.º de producto 111.31). Baxter International ha desarrollado varios sistemas de aféresis basados en las propiedades de la centrifugación, incluyendo el separador de células sanguíneas CS-3000, el separador Amicus y el sistema Autopheresis-C. El separador de células sanguíneas CS-3000 Plus recoge tanto los productos de aféresis celular como el plasma. Comprende un separador de flujo continuo con un sistema centrífugo de doble cámara que recoge los productos de la aféresis. El Amicus funciona en un formato bien de flujo continuo o de flujo intermitente para recoger las plaquetas y el plasma de un solo donante. El sistema Autopheresis-C está diseñado para la recolección de plasma de donantes, y puede recoger más de 250 ml de plasma. Véase, en general, las patentes de EE.UU. n.º 6.451.203; 6.442.397; 6.315.707; 6.284.142; 6.251.284; 6.033.561; 6.027.441; y 5.494.578.

La ECP se usa para inducir la apoptosis. Esto implica un compuesto fotoactivable añadido a una población de células *ex vivo*. El compuesto fotosensible puede administrarse a una población de células que comprende células sanguíneas tras su retirada del sujeto, receptor o donante, según sea el caso, y antes o simultáneamente con la exposición a la luz ultravioleta. El compuesto fotosensible puede administrarse a una población de células que comprende sangre entera o una fracción de la misma siempre que las células sanguíneas diana o los componentes sanguíneos reciban el compuesto fotosensible. En otra realización, se podría procesar primero una parte de la sangre del sujeto, sangre del receptor o sangre del donante usando métodos conocidos para retirar esencialmente los eritrocitos, pudiéndose administrar luego el compuesto fotoactivo a la población de células resultante que comprende la fracción de PBMC enriquecida.

Los compuestos fotoactivables para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, compuestos conocidos como psoralenos (o furocumarinas), así como derivados de psoraleno tales como los descritos en, por ejemplo, los documentos 4.321.919; y 5.399.719. Los compuestos preferidos incluyen 8-metoxipsoraleno; 4,5'8-trimetilpsoraleno; 5-metoxipsoraleno; 4-metilpsoraleno; 4,4-dimetilpsoraleno; 4-5' dimetilpsoraleno; 4'-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4',8-metoxipsoraleno; y un 4'-(omega-amino-2-oxa)alquil-4,5',8-trimetilpsoraleno, incluyendo, pero sin limitación, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. En una realización, el compuesto fotosensible que puede usarse comprende el derivado de psoraleno, amotosaleno (S-59) (Cerus Corp., Concord, AC). En otra realización, el compuesto fotosensible comprende 8-metoxipsoraleno (8 MOP).

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

Los aparatos de fotoféresis extracorporal útiles en los métodos de acuerdo con la invención incluyen los fabricados por Therakos, Inc., (Exton, Pa.) con el nombre de UVAR®. En la patente de EE.UU. n.º 4.683.889, se encuentra una descripción de dicho aparato. El sistema UVAR® usa un sistema de tratamiento y consiste en tres fases que incluyen: 1) la recolección de una fracción de capa leucocítica (enriquecida en leucocitos); 2) la irradiación de la fracción de capa leucocítica recolección; y 3) la reinfusión de los glóbulos blancos tratados. La fase de recolección tiene seis ciclos de etapas de extracción de sangre, centrifugación y reinfusión. Durante cada ciclo, se centrifuga la sangre entera y se separa en un recipiente de féresis. A partir de esta separación, se reservan el plasma (el volumen de cada ciclo es determinado por el operador del instrumento UVAR®) y 40 ml de capa leucocítica en cada ciclo de recolección. Se vuelven a infundir los glóbulos rojos y todo el plasma adicional al paciente antes de comenzar el siguiente ciclo de recolección. Finalmente, se separa un total de 240 ml de capa leucocítica y 300 ml de plasma, y se reserva para la irradiación con UVA.

La irradiación de la sangre enriquecida en leucocitos dentro del circuito de irradiación comienza durante la recolección de la capa leucocítica del primer ciclo de recolección. Se mezclan el plasma y la capa leucocítica recogidos con 200 ml de solución salina normal heparinizada y 200 mg de UVADEX® (8-metoxipsoralina hidrosoluble). Esta mezcla fluye en una capa de 1,4 mm de espesor a través de la cámara de fotoactivación PHOTOCEPTOR®, que se inserta entre dos bancos de lámparas UVA del PHOTOSLETTE®. Las lámparas PHOTOSLETTE® UVA irradian ambos lados de esta cámara PHOTOCEPTOR® transparente a la radiación UVA, permitiendo una exposición de 180 minutos a la luz ultravioleta A, produciendo una exposición media por linfocito de 1-2 J/cm². El preparado final de capa leucocítica contiene del 20 % al 25 % del componente de PBMC total, y tiene un hematocrito del 2,5 % a 7 %. Tras el período de fotoactivación, se vuelve a infundir el volumen al paciente durante un período de 30 a 45 minutos. La solicitud de patente de EE.UU. n.º 09/480.893 describe otro sistema para su uso en la administración de ECP. Los documentos 5.951.509; 5.985.914; 5.984.887. 4.464.166; 4.428.744; 4.398.906; 4.321.919; WO 97/36634; y WO 97/36581 también contienen la descripción de dispositivos y métodos útiles en este sentido.

Otro sistema que puede ser útil en los métodos de la presente invención se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/556.832. Ese sistema incluye un aparato mediante el que el volumen neto de fluido recogido o retirado de un sujeto puede reducirse durante la ECP. La cantidad eficaz de energía luminosa que se suministra a una población de células se puede determinar usando los métodos y sistemas descritos en el documento 6.219.584.

Hay una variedad de otros métodos de inducción de la apoptosis en una población de células que son bien conocidos. Uno de dichos tratamientos comprende someter una población de células a radiación ionizante (rayos gamma, rayos X, etc.) y/o a radiación electromagnética no ionizante que incluye luz ultravioleta, calentamiento, enfriamiento, privación de suero, privación del factor de crecimiento, acidificación, dilución, alcalinización, cambio de fuerza iónica, privación de suero, irradiación o una combinación de los mismos. Como alternativa, la apoptosis puede inducirse sometiendo una población de células a ultrasonidos.

Otro método de inducción de la apoptosis comprende la aplicación extracorporal de estrés oxidativo a una población de células. Esto puede conseguirse tratando la población de células, en suspensión, con agentes oxidantes químicos tales como peróxido de hidrógeno, otros peróxidos e hidroperóxidos, ozono, permanganatos, peryodatos y similares. Pueden usarse agentes oxidantes biológicamente aceptables para reducir los posibles problemas asociados con residuos y contaminaciones de la población de células inducida por apoptosis así formada.

Al preparar la población de células inducida por apoptosis, se debe tener cuidado de no aplicar niveles excesivos de estrés oxidativo, radiación, tratamiento con fármacos, etc., porque, de lo contrario, podría haber un riesgo significativo de causar necrosis en al menos algunas de las células bajo tratamiento. La necrosis provoca la ruptura de la membrana celular y la liberación de los contenidos celulares, a menudo, con resultados biológicamente dañinos, en particular, inflamaciones, de modo que es mejor evitar la presencia de células necróticas y sus componentes junto con la población de células que comprende las células apoptóticas. Los niveles adecuados de tratamiento de la población de células para inducir la apoptosis y el tipo de tratamiento seleccionado para inducir la apoptosis son fácilmente determinables por los expertos en la materia.

Un proceso implica el cultivo de células del sujeto o una estirpe celular compatible de mamífero. Las células cultivadas pueden tratarse entonces extracorporalmente para inducir la apoptosis y crear una población de células en las mismas. El tratamiento extracorporal puede seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpos, agentes quimioterapéuticos, radiación, ECP, ultrasonidos, proteínas y agentes oxidantes. Las células, suspendidas en el plasma del sujeto u otro medio de suspensión adecuado, tal como solución salina o un medio de cultivo de células de mamífero equilibrado, pueden incubarse después como se indica a continuación.

Los métodos de detección y cuantificación de la apoptosis son útiles para determinar la presencia y el nivel de apoptosis del preparado que se va a incubar con leucocitos o linfocitos T en la presente invención. Las células sometidas a apoptosis pueden identificarse mediante un "escalonamiento" característico del ADN observado en electroforesis en gel de agarosa, como resultado de la escisión del ADN en una serie de fragmentos. En otra
 5 realización, se puede usar la expresión superficial de la fosfatidilserina en células para identificar y/o cuantificar una población de células inducida por la apoptosis. La medición de los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, que refleja los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, es otro método reconocido de identificación de una población de células. También se ha descrito en la literatura científica una serie de otros
 10 métodos de identificación de células sometidas a apoptosis y de una población de células, muchos de los cuales usan anticuerpos monoclonales contra marcadores específicos para una población de células.

La administración de T reg encuentra utilidad en el tratamiento de la artritis y otras enfermedades autoinmunes. También son útiles en el tratamiento o la profilaxis de al menos una enfermedad autoinmune en una célula, un tejido, un órgano, un animal o un paciente incluyendo, pero sin limitación, mielitis transversa aguda, alopecia areata,
 15 enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprúe-dermatitis por enfermedad celíaca trastornos espinocerebelosos cerebelosos, degeneraciones espinocerebelosas (ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelosas), alcoholismo crónico, hepatitis inducida por el alcohol, hepatitis autoinmune, síndrome de disfunción
 20 inmunológica crónica de fatiga (CFIDS), enfermedad inflamatoria intestinal crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad de Churg-Hodgkin, penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de CResT, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Crohn, atrofia de Dejerine-Thomas, demencia pugilística, diabetes mellitus, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, lupus discoide, trastornos de ganglios basales, coagulación intravascular diseminada, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por fármacos, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de hospedador contra injerto,
 25 enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, corea de Huntington, corea senil, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, atrofia muscular espinal infantil o juvenil, diabetes dependiente de insulina, artritis juvenil, patología de Kawasaki, lesiones del sistema corticoespinal, leucemias, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, liquen plano,
 30 enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shy-Drager, Machado-Joseph), miastenia gravis, neurogénica muscular, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, parálisis supranuclear progresiva, soriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumática, sarcoidosis, esclerodermia, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, síndrome de Sjögren,
 35 síndrome de la persona rígida, panencefalitis esclerosante subaguda, trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, trastorno del sistema múltiple mitocondrial), lupus eritematoso sistémico (LES), arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroidiasis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo, granulomatosis de Wegener, síndrome de Wernicke-Korsakoff.

La presente invención también es útil en el tratamiento del rechazo a injertos o la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD). El rechazo agudo de trasplante de órganos sólidos se produce en del 30 % al 60 % de los pacientes tras el trasplante de pulmón y, en menor grado, con el hígado, el riñón, el corazón, etc. debido al éxito de los agentes inmunosupresores. La reacción inmune mediada por los linfocitos (células) contra antígenos de
 45 trasplante es el principal mecanismo de rechazo agudo. Un rechazo retardado o crónico provoca la destrucción del injerto en meses o años después del trasplante y se caracteriza por la destrucción vascular que conduce a la necrosis del tejido trasplantado. En la actualidad, dicho rechazo no se suprime en gran medida mediante los regímenes convencionales y, por tanto, la necesidad de una tolerancia inmunológica más sostenible es una necesidad significativa no satisfecha.

En ocasiones, se produce el deterioro tardío del injerto, y este tipo crónico de rechazo suele progresar insidiosamente a pesar del aumento de la terapia inmunosupresora. La imagen patológica difiere de la del rechazo agudo. Se ve afectado principalmente el endotelio arterial, con una proliferación extensa que puede obstruir
 50 gradualmente la luz del vaso, produciendo la isquemia y la fibrosis del injerto.

Los inmunosupresores se usan en la actualidad ampliamente para controlar la reacción de rechazo, y son los principales responsables del éxito del trasplante. Sin embargo, estos fármacos suprimen todas las reacciones inmunológicas, por lo que la infección generalizada es la principal causa de mortalidad en los receptores de
 55 trasplantes.

El tratamiento con inmunosupresores existente puede diferir en el caso de los diferentes tipos de trasplantes. Los aloinjertos de hígado se rechazan de forma menos agresiva que los aloinjertos de otros órganos. Por ejemplo, el rechazo hiperagudo de un trasplante de hígado no se produce invariablemente en pacientes que fueron previamente sensibilizados a antígenos HLA o incompatibilidades de ABO. La terapia inmunosupresora típica en un adulto implica
 60 el uso de ciclosporina, en general, administrada i.v. a 4 a 6 mg/kg/día a partir del momento del trasplante y luego a 8 a 14 mg/kg/día p.o. cuando se tolera la comida. Las dosis se ajustan a la baja si se produce disfunción renal, y se

usan los niveles sanguíneos como medidas aproximadas de la dosificación adecuada.

En el trasplante cardíaco, las pautas inmunosupresoras son similares a las del trasplante renal o hepático. Sin embargo, en los trasplantes de pulmón y corazón-pulmón, se produce el rechazo agudo en más del 80 % de los pacientes, pero puede tratarse con éxito. Los pacientes son tratados con corticosteroides, administrados rápidamente i.v. a dosis altas, ATG u OKT3. Con frecuencia, también se administran ALG o OKT3 profilácticamente durante las dos primeras semanas posteriores al trasplante. El trasplante de páncreas es único entre los trasplantes de órganos vascularizados: en lugar de usarse para salvar una vida, intenta estabilizar o prevenir las devastadoras complicaciones de órganos diana de la diabetes de tipo I. Debido a que el receptor intercambia los riesgos de la inyección de insulina con los riesgos de la inmunosupresión, el trasplante de páncreas se ha limitado, en general, principalmente a pacientes que ya necesitan recibir fármacos inmunosupresores (es decir, diabéticos con insuficiencia renal que reciben un trasplante de riñón).

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

La tasa de rechazo es < 5 % en los trasplantes para los pacientes con leucemia de donantes idénticos a HLA. Para los pacientes con transfusión múltiple con anemia aplásica, la tasa de rechazo también se ha reducido significativamente debido al aumento de la inmunosupresión durante la inducción del trasplante. Sin embargo, pueden surgir complicaciones incluyendo el rechazo por el hospedador del injerto de médula ósea, la GVHD aguda e infecciones. Las complicaciones posteriores incluyen GVHD crónica, inmunodeficiencia prolongada y recurrencia de la enfermedad.

Se pueden realizar otros numerosos trasplantes más eficaces con el tratamiento de la presente invención. Los ejemplos incluyen trasplante de córnea, aloinjertos de piel, aloinjertos de cartílago, injertos óseos y trasplantes de intestino delgado.

Es posible tratar una serie de otros trastornos más eficazmente usando los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el linfoma cutáneo de linfocitos T es una enfermedad en la que los linfocitos T se vuelven malignos y afectan a la piel. Hay tres tipos de tratamiento de uso común: la radiación; la quimioterapia; y la fotoféresis. El tratamiento del linfoma cutáneo de linfocitos T depende de la etapa de la enfermedad, de la edad del paciente y de su estado general de salud. Se puede considerar el tratamiento convencional debido a su eficacia en pacientes en estudios anteriores o se puede considerar la participación en un ensayo clínico. La mayoría de los pacientes con linfoma cutáneo de linfocitos T no se cura con la terapia convencional y algunos tratamientos convencionales pueden tener más efectos secundarios de los deseados. El tratamiento usando el método de la presente invención también se puede usar en el tratamiento de esta enfermedad.

Los métodos de la presente invención también pueden usarse en la cirugía de implantes, por ejemplo, con la cirugía de implante realizada comúnmente en cirugía plástica cosmética o no cosmética. Dichos implantes pueden incluir injertos dentales, injertos de grasa, por ejemplo, en las mejillas, los labios y los glúteos, implantes faciales, incluyendo los de la nariz, las mejillas, la frente, la barbilla y el cráneo, los implantes de las nalgas, los implantes mamarios, etc. Otros implantes incluyen, pero sin limitación, anillo corneal, cortical, orbital, coclear, músculo (todos los músculos, incluyendo pectorales, glúteos, abdominales, gastrocnemios, sóleo, bíceps, tríceps), implantes aloplásticos de articulaciones y huesos, implantes de reparación ósea (tornillos, varillas, barras, resortes), placas de metal, inyecciones espinales, de cabello vertebral, de bótox/colágeno/restilano/perlano, implantes de pene, implantes de próstata, implantes mamarios (cosméticos y reconstructivos), dispositivos intrauterinos, implantes hormonales, implante de células fetales o madre, marcapasos, desfibriladores, arterias/venas/válvulas artificiales y órganos artificiales.

Las enfermedades autoinmunes también pueden tratarse más eficazmente usando los métodos de la presente invención. Se trata de enfermedades en las que el sistema inmune produce autoanticuerpos contra un antígeno endógeno, con la consecuente lesión de los tejidos. Los individuos pueden ser identificados como aquellos que tienen una enfermedad mediante varios métodos, incluyendo, pero sin limitación, la tipificación de enlace HLA, ensayos basados en sangre o en suero, o identificación de variantes genéticas, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Por ejemplo, una vez que se determina que un individuo tiene el enlace HLA DR4 y ha sido diagnosticado de artritis reumatoide, se puede prescribir un tratamiento con T reg. Otros alelos de HLA, también conocidos como alelos de MHC, que están asociados con las enfermedades autoinmunes incluyen B27 (espondilitis anquilosante); DQA1*0501 y DQB1*0201 (enfermedad celíaca); DRB1*03, DRB1*04, DQB1*0201, DQB1*0302 y DMA*0101 (diabetes de tipo I); y Cw6 (soriasis). Estos alelos también se pueden usar para determinar si un individuo está experimentando una enfermedad autoinmune y, por lo tanto, si el tratamiento con T reg puede ser

eficaz.

Se pueden usar ensayos basados en sangre o en suero para evaluar la predisposición a una enfermedad. Existe, por ejemplo, un ensayo que detecta la presencia de anticuerpos autonucleares en el suero, que puede conducir al inicio del lupus. También existen ensayos basados en suero para predecir la miocarditis autoinmune. Además, se pueden usar ensayos basados en suero para determinar los niveles de insulina (diabetes), o enzimas hepáticas o cardíacas para otras enfermedades. Los niveles T3 pueden ser predictivos de la tiroiditis de Hashimoto. Después de que se determine que un individuo tiene una enfermedad usando un ensayo basado en sangre o en suero, los métodos de la presente invención pueden usarse para prevenir o retrasar la aparición de o reducir los efectos de estas enfermedades. Los individuos pueden ser identificados como predispuestos a la enfermedad a través de la identificación de variaciones genéticas, incluyendo, pero sin limitación, los SNP. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, primero se determina si un paciente tiene un trastorno autoinmune o está predispuesto al mismo, y se prescribe a ese paciente entonces el tratamiento con T reg.

Los métodos de la presente invención también son aplicables al tratamiento de enfermedades atópicas, que son enfermedades alérgicas en las que los individuos son muy sensibles a alérgenos extrínsecos. Las enfermedades atópicas incluyen, pero sin limitación, la dermatitis atópica, asma bronquial extrínseca, urticaria, rinitis alérgica, enterogastritis alérgica y similares. Se pueden usar ensayos de diagnóstico convencionales para determinar si un paciente tiene un trastorno del tipo descrito anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en el mismo por referencia.

Ejemplo 1

25

Inducción apoptótica mediante 8MOP/UVA

Se pasaron leucocitos humanos de donantes normales sobre una placa de Ficoll, y se recogieron las PBMC y se lavaron antes de colocarlas a aproximadamente 10^7 células/ml en un matraz de cultivo de tejidos T-75. A este matraz, se añadieron 200 ng/ml de 8-MOP antes de la irradiación con UVA (~ 3 J/cm²). Las células se retiraron rápidamente del matraz, con el fin de evitar la adherencia, y se colocaron a la concentración apropiada para la generación de T reg.

Generación de T reg

35

Se pasaron leucocitos humanos de donantes normales sobre una placa de Ficoll, y se recogieron las PBMC. Se purificaron los linfocitos T de las PBMC usando columnas clasificadoras de células activadas magnéticamente y cóctel de anticuerpos de selección negativos en CD4⁺ (Miltenyi Biotec). Se incubaron los linfocitos T CD4 sin tratamiento previo purificados junto con las PBMC tratadas con ECP en una proporción 2:1 (CD4:PBMC) con 20 ng/ml de IL-10 durante 8 días (Figura 1A). Después de 8 días, se purificaron los linfocitos T CD4⁺ usando MAC y cóctel de anticuerpos de selección positivos en CD4 (Miltenyi Biotec). IL-10 no es necesario pero, en algunos casos, induce un fenotipo más consistente.

Evaluación de T reg

45

Se evaluó la actividad supresora de T reg mediante una reacción secundaria de linfocitos mixtos ("MLR") (Figura 1 B). Se dispusieron linfocitos T CD4⁺ singénicos en una placa de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo. Se añadieron células dendríticas alogénicas al pocillo a 2.000 células por pocillo. Se titularon los T reg en la MLR a partir de una proporción de 1 linfocito T reg con respecto a 4 linfocitos T respondedores. La proliferación se midió el día 5 mediante la incorporación de bromodesoxiuridina ("BRDU") usando ELISA de quimioluminiscencia BRDU de proliferación celular de Roche. La quimioluminiscencia se midió usando TopCount (Perkin Elmer).

Ejemplo 2

Se encuentra actividad de T reg en la generación de linfocitos T mediante el presente método

55

Se incubaron linfocitos T CD4⁺ con células sanguíneas periféricas tratadas con ECP durante 8 días en presencia de 20 ng/ml de IL-10. Se purificaron los T reg del cultivo usando MAC y cóctel de anticuerpos de selección positivos en CD4 (Miltenyi Biotec). Para evaluar su actividad reguladora, a continuación, se añadieron los T reg a una MLR que consistía en 10.000 linfocitos T CD4⁺ singénicos y 2.000 células dendríticas alogénicas. Se midió la proliferación en estos cultivos al día 5 mediante la incorporación de BRDU. Los resultados se muestran en la Figura 2.

60

Ejemplo 3**Se encuentra actividad de T reg en la generación de linfocitos T mediante el presente método**

- 5 Se generaron células Tr1 mediante la incubación de linfocitos T CD4⁺ en presencia de 20 ng/mg de IL-10. Se generaron T reg mediante la incubación de linfocitos T CD4⁺ con células sanguíneas periféricas tratadas con ECP durante 8 días en presencia de 20 ng/ml de IL-10. Se purificaron los T reg del cultivo usando MAC y cóctel de anticuerpos de selección positivos en CD4 (Miltenyi Biotec). Para evaluar su actividad reguladora, a continuación, se añadieron los T reg a una MLR que consistía en 10.000 linfocitos T CD4⁺ singénicos y 2.000 células dendríticas alogénicas. Se midió la proliferación en estos cultivos al día 5 mediante la incorporación de BRDU. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 4

- 15 **Se encuentra el fenotipo T reg en la generación de linfocitos T con el presente método**

- Se incubaron linfocitos T CD4⁺ con células sanguíneas periféricas tratadas con ECP durante 8 días en presencia de 20 ng/ml de IL-10. Se purificaron los T reg del cultivo usando MAC y cóctel de anticuerpos de selección positivos en CD4 (Miltenyi Biotec). A continuación, se añadieron los T reg a una MLR que consistía en 10.000 linfocitos T CD4⁺ singénicos y 2.000 células dendríticas alogénicas. Se añadió IL-2 a la MLR a 2 ng/ml. Se midió la proliferación en estos cultivos al día 5 mediante la incorporación de BRDU. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 5

- 25 **Se encuentra el fenotipo T reg en la generación de linfocitos T con el presente método**

- Se evaluaron T reg generados mediante la incubación junto con PBMC tratadas con ECP en una MLR usando un sistema de insertos de transpocillos de 24 pocillos (Sistema de insertos Anopore 0,2 µM de cultivo titular Nunc n.º 136935). Se colocó una MLR compuesta de 500.000 linfocitos T CD4⁺ singénicos y 100.000 células dendríticas alogénicas en la parte inferior del transpocillo. Se dispusieron 250.000 T reg bien en el inserto del transpocillo o directamente en el fondo con los linfocitos T respondedores y células dendríticas alogénicas. El día 5, se retiraron los insertos y se midió la proliferación el día 5 mediante la incorporación de BRDU. Los resultados se muestran en la Figura 5.

- 35 **Ejemplo 6**

(Aplicación in vivo en modelo de ratón) (Profético)

Ratones

- 40 Los ratones C3H/HeJ (C3H; H2k), (B6XC3H)F1 (H2bXk), (B6XDBA/2)F1 (H2bXd), C57BL/6 (B6; H2b) y CBA/JCr (CBA; H2k) macho se adquirirán del National Cancer Institute Research and Development Center (Frederick, Md.). Los ratones B10.BR (H2k) se adquirirán de los laboratorios Jackson (Bar Harbour, ME). Los ratones usados para los experimentos tendrán entre 6 y 10 semanas de vida, y se alojarán en jaulas microaislantes estériles dentro de un centro específico libre de patógenos, recibiendo comida y agua esterilizadas en autoclave a voluntad.

Medios

- 50 Se usará solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con albúmina de suero bovino al 0,1 % (BSA, Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) para todas las manipulaciones *in vitro* de la médula ósea y los linfocitos de donantes. Inmediatamente antes de la inyección, las células se lavarán y se volverán a suspender en PBS solo. Para mantener las estirpes celulares y para ensayos *in vitro*, se usará medio RPMI 1640 (Mediatech, Herndon, Va), suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, GIBCO, Grand Island, NY), L-glutamina a 2 mmol/l, 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina.

- 55 Anticuerpos

Fotoféresis experimental

- 60 Se recogerán esplenocitos de ratones sanos singénicos de la misma camada y se transformarán en suspensión de células individuales mediante molienda con el extremo posterior de una jeringa en PBS. Se volverán a suspender estas células y las células se lavarán dos veces con PBS antes de volver a suspenderlas a 12,5 x 10⁶ células/ml de PBS. Tras lavar las células, se volverán a suspender en medio enfriado con hielo y se sembrarán a aproximadamente 10⁶ células/ml en un matraz T75. Se añadirá Psoraleno (solución UVADEX) a una concentración final de 200 ng/ml, que es una dilución de 100 veces la solución madre proporcionada por Therakos. Se dispondrá el matraz acostado en la cámara de irradiación UVA y se aplicarán aproximadamente 1,5 J/cm² de luz correspondiente

a 1,5 minutos de luz inferior cuando la bandeja está a 6 cm de la fuente de luz. Se retirarán las células rápidamente del matraz para evitar la adherencia y se colocarán a la concentración apropiada para inyección. Si hay adherencia, se raspará o se golpeará el matraz suavemente para eliminar la mayoría de las células.

5 Trasplante de médula ósea

Se extraerá médula ósea de la tibia y los fémures de los ratones donantes mediante lavado abundante con PBS que contiene BSA al 0,01 % (PBS/BSA). Se extraerán las células de médula ósea de los linfocitos T usando un anti-Thy 1.2nAb (J1j, Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Md.) a una dilución 1:100 y complemento de cobaya (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pa.) a una dilución de 1:6 durante 45 minutos a 37 °C. Se aislarán linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de ratones donantes. Se tratarán los esplenocitos con una solución de lisis salina equilibrada de Gey que contenga cloruro de amonio al 0,7 % (NH₄Cl) para eliminar los glóbulos rojos (RBC). Tras el agotamiento de los RBC, se agruparán las células del bazo y de los ganglios linfáticos y se agotarán de linfocitos B mediante la filtración en una placa de Petri de plástico, previamente recubierta con una dilución de 5 mg/ml de IgG de cabra anti-ratón durante 1 hora a 4 °C. Se espera que estos tratamientos den lugar a poblaciones de donantes del aproximadamente 90 % al 95 % de células CD3⁺, cuantificadas mediante citometría de flujo fluorescente. A continuación, se aislarán subconjuntos de linfocitos T mediante selección negativa usando anticuerpos monoclonales anti-CD8 (3,168) o anti-CD4 (RL172) y complemento. Se espera que estos tratamientos reduzcan las poblaciones de subconjuntos de linfocitos T dirigidas hasta los niveles de fondo, según lo determinado mediante análisis de citometría de flujo. Se expondrán los ratones receptores a una irradiación de 13 Gy del cuerpo entero procedente de una fuente de ¹³⁷CS a 1,43 Gy/min, administrada a una dosis dividida de 6,5 Gy cada una, con 3 horas de separación. A continuación, estos ratones recibirán el trasplante de 2 x 10⁶ células de médula ósea tratadas con anti-Thy1.2 (ATBM, sin linfocitos T) junto con el número indicado de linfocitos T apropiados (linfocitos T enriquecidos en CD4 o CD8 donantes), por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola. Los ratones se tratarán con T reg 1 día antes del trasplante y de nuevo en los días 0, 4, 8 y 12 (todos a 0,5 mg, i.p.). Para los experimentos de GVL, los ratones receptores B6 serán expuestos a una inyección de T reg un día antes del trasplante de ATBM y linfocitos T de donantes, con un programa similar de tratamiento con T reg. En los experimentos tanto de GVHD como de GVL, los ratones se verificarán diariamente para determinar la morbilidad y la mortalidad hasta su terminación. Se agruparán los datos de 2-3 experimentos separados, y se determinarán las medianas de los tiempos de supervivencia (MST) como el punto del 50 % de supervivencia interpolado de una regresión lineal a través de todos los puntos de datos del día de la muerte, incluyendo el cero. Las comparaciones estadísticas para la supervivencia entre los grupos experimentales se realizarán mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. La significación para las comparaciones de peso se determinará mediante la prueba T en puntos de tiempo individuales.

35 Citometría de flujo

Se incubarán anticuerpos monoclonales apropiados en volúmenes de 25 µl con 2-5 x 10⁵ células en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo en U a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugarán a 1.500 rpm durante 3 minutos y se lavarán con PBS que contendrá BSA al 0,1% y azida de sodio al 0,01 % (tampón de lavado). Se calcularán el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia media aritmética para cada muestra.

Análisis patológico

45 Se tomarán muestras de biopsias de oído de espesor completo (3 x 2 mm) de cada ratón de los diversos grupos de tratamiento y se fijarán inmediatamente en glutaraldehído al 4 % durante una noche, y luego se aclararán con tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,4). Los tejidos se fijarán después con tetróxido de osmio al 2 % durante 2 h, se deshidratarán en etanol graduado y se introducirán en Epon 812. Se cortarán secciones de un micrómetro de espesor con un ultramicrotomo Porter-Blum MT2B, se teñirán con azul de toluidina y, finalmente, se sumergirán en etanol al 95 % para un análisis al microscopio óptico. Se hará el recuento del número de células epidérmicas disqueratóticas/mm lineal, según se ha determinado previamente, bajo un objetivo de 100 aumentos y una pieza ocular de 10 aumentos de un microscopio óptico. Se evaluarán más de diez mm lineales de la epidermis de cada animal y cada punto de tiempo. El análisis se realizará en condiciones de ocultación en cuanto a los grupos de tratamiento.

55 El documento 20030157073; Kohm, A. *et al.* (2002); Tang, Q. *et al.* (2004); y Schwarz, A *et al.* (2004) proporciona modelos de animales adicionales para T reg.

60 A continuación, se proporcionan ejemplos comparativos adicionales útiles para comprender la invención:

1. Un método de generación de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) que comprende la incubación de leucocitos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
2. El método de acuerdo con el Ejemplo 1, donde la incubación es durante un tiempo y en condiciones suficientes para generar T reg.
- 65 3. El método de acuerdo con el Ejemplo 1, que comprende además la etapa de selección de leucocitos que expresan CD4 para obtener células CD4⁺.

4. El método de acuerdo con el Ejemplo 3, donde la incubación es a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.
5. El método de acuerdo con el Ejemplo 4, donde la incubación es a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.
- 5 6. El método de acuerdo con el Ejemplo 1, donde las AC se obtienen mediante un tratamiento de inducción de la apoptosis.
7. El método de acuerdo con el Ejemplo 6, donde el tratamiento inductor de la apoptosis es un procedimiento de ECP que emplea un compuesto fotoactivable junto con luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable.
- 10 8. El método de acuerdo con el Ejemplo 7, donde el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA.
9. El método de acuerdo con el Ejemplo 8, donde el psoraleno es 8-MOP.
10. El método de acuerdo con el Ejemplo 1, donde la incubación comprende además la adición de factores que potencian adicionalmente la generación o función de los T reg.
- 15 11. El método de acuerdo con el Ejemplo 10, donde los factores son hormonas, proteínas, fármacos o anticuerpos.
12. El método de acuerdo con el Ejemplo 11, donde los factores se seleccionan de al menos uno de TGFβ, αMSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3, dexametasona, rapamicina e IL-2.
13. El método de acuerdo con el Ejemplo 12, donde el factor es IL-10.
- 20 14. El método de acuerdo con el Ejemplo 13, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.
15. El método de acuerdo con el Ejemplo 14, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml.
16. El método de acuerdo con el Ejemplo 1, donde la incubación es durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días.
- 25 17. El método de acuerdo con el Ejemplo 16, donde la incubación es durante de aproximadamente 8 días.
18. El método de acuerdo con el Ejemplo 1 que comprende además la adición de un antígeno a la incubación para generar T reg que regulen la respuesta inmune hacia el antígeno.
19. El método de acuerdo con el Ejemplo 18, donde el antígeno es un aloantígeno.
- 30 20. Una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida mediante la incubación de los leucocitos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
21. La composición acuerdo con el Ejemplo 20, donde la incubación es durante un tiempo y en condiciones suficientes para generar T reg.
- 35 22. La composición de acuerdo con el Ejemplo 20, que comprende además la etapa de selección de leucocitos que expresan CD4 para obtener células CD4⁺.
23. La composición de acuerdo con el Ejemplo 22, donde la incubación es a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.
24. La composición de acuerdo con el Ejemplo 23, donde la incubación es a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.
- 40 25. La composición de acuerdo con el Ejemplo 20, donde las AC se obtienen mediante un tratamiento de inducción de la apoptosis.
26. La composición de acuerdo con el Ejemplo 25, donde el tratamiento inductor de la apoptosis es un procedimiento de ECP que emplea un compuesto fotoactivable junto con luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable.
- 45 27. La composición de acuerdo con el Ejemplo 26, donde el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA.
28. La composición de acuerdo con el Ejemplo 27, donde el psoraleno es 8-MOP.
29. La composición de acuerdo con el Ejemplo 20, donde la incubación comprende además la adición de factores que potencian adicionalmente la generación o función de los T reg.
- 50 30. La composición de acuerdo con el Ejemplo 29, donde los factores son hormonas, proteínas, fármacos o anticuerpos.
31. La composición de acuerdo con el Ejemplo 30, donde la incubación comprende además la adición de los factores seleccionados de al menos uno de TGFβ, αMSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3, dexametasona, rapamicina e IL-2.
- 55 32. La composición de acuerdo con el Ejemplo 31, donde el factor es IL-10.
33. La composición de acuerdo con el Ejemplo 32, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.
34. La composición de acuerdo con el Ejemplo 33, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml.
- 60 35. La composición de acuerdo con el Ejemplo 20, donde la incubación es durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días.
36. La composición de acuerdo con el Ejemplo 35, donde la incubación es durante aproximadamente 8 días.
37. La composición de acuerdo con el Ejemplo 20 que comprende además la adición de un antígeno a la incubación para generar T reg que regulen la respuesta inmune hacia el antígeno.
- 65 38. La composición de acuerdo con el Ejemplo 37, donde el antígeno es un aloantígeno.
39. Un método de tratamiento de un trastorno autoinmune o de mejora de uno o más de sus síntomas, que

comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

- 5 40. El método de acuerdo con el Ejemplo 39, donde el tratamiento inductor de la apoptosis es un procedimiento de ECP que emplea un compuesto fotoactivable junto con luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable.
41. El método de acuerdo con el Ejemplo 40, donde el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA.
42. El método de acuerdo con el Ejemplo 41, donde el psoraleno es 8-MOP.
- 10 43. El método de acuerdo con el Ejemplo 40, donde la incubación comprende además la adición de factores que potencian adicionalmente la generación o función de los T reg.
44. El método de acuerdo con el Ejemplo 43, donde los factores son hormonas, proteínas, fármacos o anticuerpos.
45. El método de acuerdo con el Ejemplo 44, donde los factores se seleccionan de al menos uno de TGFβ, αMSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3, dexametasona, rapamicina e IL-2.
- 15 46. El método de acuerdo con el Ejemplo 45, donde el factor es IL-10.
47. El método de acuerdo con el Ejemplo 46, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml.
48. El método de acuerdo con el Ejemplo 47, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml.
- 20 49. El método de acuerdo con el Ejemplo 40, donde la incubación es durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días.
50. El método de acuerdo con el Ejemplo 49, donde la incubación es durante de aproximadamente 8 días.
51. El método de acuerdo con el Ejemplo 40 que comprende además la adición de un antígeno a la incubación para generar T reg que regulen la respuesta inmune hacia el antígeno.
- 25 52. El método de acuerdo con el Ejemplo 51, donde el antígeno es un aloantígeno.
53. El método de acuerdo con el Ejemplo 40, donde el trastorno autoinmune es al menos uno de mielitis transversa aguda, alopecia areata, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, enfermedad de Addison autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprúe-dermatitis por enfermedad celíaca trastornos espinocerebelosos cerebelosos, degeneraciones espinocerebelosas (ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelosas), alcoholismo crónico, hepatitis inducida por el alcohol, hepatitis autoinmune, síndrome de disfunción inmunológica crónica de fatiga (CFIDS), enfermedad inflamatoria intestinal crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad de Churg-Hodgkin, penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de CResT, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Crohn, atrofia de Dejerine-Thomas, demencia pugilística, diabetes mellitus, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, lupus discoide, trastornos de ganglios basales, coagulación intravascular diseminada, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por fármacos, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de hospedador contra injerto, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, corea de Huntington, corea senil, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, atrofia muscular espinal infantil o juvenil, diabetes dependiente de insulina, artritis juvenil, patología de Kawasaki, lesiones del sistema corticoespinal, leucemias, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, liquen plano, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shy-Drager, Machado-Joseph), miastenia gravis, neurogénica muscular, enfermedad de Parkinson, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, parálisis supranuclear progresiva, soriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumática, sarcoidosis, esclerodermia, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, panencefalitis esclerosante subaguda, trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia, trastorno del sistema múltiple mitocondrial), lupus eritematoso sistémico (LES), arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroidiasis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener, síndrome de Wernicke-Korsakoff.
- 35 54. Un método de tratamiento de un trastorno atópico o de mejora de uno o más de sus síntomas, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
- 55 55. El método de acuerdo con el Ejemplo 54, donde el trastorno atópico es al menos uno de patologías inflamatorias crónicas y patologías inflamatorias vasculares, incluyendo patologías inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, colitis ulcerosa y patología de Crohn y patologías inflamatorias vasculares, tales como, pero sin limitación, coagulación intravascular diseminada, aterosclerosis y patología de Kawasaki.
- 60 56. Un método que comprende la administración a un receptor de un trasplante de una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).
- 65 57. El método de acuerdo con el Ejemplo 56, donde los T reg se administran al receptor del trasplante de acuerdo con un programa seleccionado del grupo que consiste en dos días, una semana antes del trasplante;

tres días, una semana antes de la extracción de dicho trasplante; dos días a la semana durante dos semanas antes del trasplante; y tres días a la semana durante tres semanas antes del trasplante.

58. Un método que comprende la administración a un paciente de GVHD de una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

59. El método de acuerdo con el Ejemplo 58, donde los T reg se administran al receptor del trasplante de acuerdo con un programa seleccionado del grupo que consiste en dos días, una semana antes del trasplante; tres días, una semana antes de la extracción de dicho trasplante; dos días a la semana durante dos semanas antes del trasplante; y tres días a la semana durante tres semanas antes del trasplante.

60. Un método de tratamiento de un paciente con un trastorno o una predisposición a padecer un trastorno que comprende el análisis del paciente para determinar si tiene un trastorno y la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) obtenida incubando leucocitos autólogos con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC).

Referencias

Aubin *et al.* (2004) "Ultraviolet light-induced regulatory (suppressor) T cells: an approach for promoting induction of operational allograft tolerance?" *Transplantation* 77(1 Supl):S29-31

Chatenoud *et al.* (2001) "Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity!" *Immunol Rev* 182:149-163

Cobbold *et al.* (2003) "Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms" *Immunol Rev* 196:109-124

Earle *et al.* (2005) "In vitro expanded human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation" *Clin Immunol* 115:3-9

Gavrieli *et al.* (1992) "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation" *J Cell Biol* 119:493-501

Gray *et al.* (1998) "Generation of an inhibitory circuit involving CD8⁺ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3" *J Immunol* 160:2248-2254

Gray *et al.* (2001) "Transforming growth factor beta enhances the expression of CD154 (CD40L) and production of tumor necrosis factor alpha by human T lymphocytes" *Immunol Lett* 78:83-88

Gregori *et al.* (2001) "Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance" *J Immunol* 167:1945-1953

Gregory *et al.* (2004) "The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?" *Immunol* 113:1-14

Groux *et al.* (1997) "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis" *Nature* 389:737-742

Horwitz (2001) "Peripheral blood CD4⁺ T cells in systemic lupus erythematosus" *Lupus* 10:319-320

Horwitz *et al.* (1999) "Role of NK cells and TGF-beta in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease" *Microbes Infect* 1:1305-1311

Horwitz *et al.* (2002) "The potential of human regulatory T cells generated ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases" *Arthritis Res* 4:241-246

Koren *et al.* (1989) "1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on human lymphocytes and interferes with the cellular response to interleukin-2" *Immunopharmacology* 18:187-194

Lamioni *et al.* (2005) "The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo" *Transplantation* 79:846-850

Luger *et al.* (1999) "Role of epidermal cell-derived alpha-melanocyte stimulating hormone in ultraviolet light mediated local immunosuppression" *Ann NY Acad Sci* 885:209-216

Maeda *et al.* (2005) "Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells" *J Immunol* 174:5968-5976

Mahnke *et al.* (2003) "Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells" *Blood* 101:4862-2869

Masteller *et al.* (2005) "Expansion of Functional Endogenous Antigen-Specific CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells from Nonobese Diabetic Mice" *J Immunol* 175:3053-3059

May *et al.* (2004) "Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs" *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:377-393

Namba *et al.* (2002) "Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2" *J Leukoc Biol* 72:946-952

Nishida *et al.* (1999) "Specific aqueous humor factors induce activation of regulatory T cells" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 410:2268-2274

Nishida *et al.* (2004) "Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone against rat endotoxin-induced uveitis and the time course of inflammatory agents in aqueous humor" *Int Immunopharmacol* 4:1059-1066

O'Garra *et al.* (2003) "In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines" *Immunol Lett* 85:135-139

Ohtsuka *et al.* (1999a) "Cytokine-mediated downregulation of B cell activity in SLE: effects of interleukin-2 and

- transforming growth factor-beta" *Lupus* 8:95-102
- Ohtsuka *et al.* (1999b) "The relationship between defects in lymphocyte production of transforming growth factor-beta1 in systemic lupus erythematosus and disease activity or severity" *Lupus* 8:90-94
- 5 Pedersen *et al.* (2004) "Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3)" *Immunol Lett* 91:63-69
- Penna *et al.* (2000) "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation" *J Immunol* 164:2405-2411
- Roncarolo *et al.* (2001) "Type 1 Tregulatory cells" *Immunol Rev* 182:68-79
- 10 Saas *et al.* (2002) "Cell-based therapy approaches using dying cells: from tumour immunotherapy to transplantation tolerance induction" *Expert Opin Biol Ther* 2:249-263
- Sakaguchi *et al.* (2001) "Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance" *Immunol Rev* 182:18-32
- Salvioli *et al.* (1997) *FEBS Let* 411:77-82
- 15 Savill *et al.* (2002) "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses" *Nat Rev Immunol* 2:965-975
- Schwarz *et al.* (2000) "Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance" *J Immunol* 165:1824-1831
- Stohl *et al.* (1999) "Impaired cytotoxic T lymphocyte activity in systemic lupus erythematosus following in vitro polyclonal T cell stimulation: a contributory role for non-T cells" *Lupus* 8:293-299
- 20 Streilein *et al.* "Neural control of ocular immune privilege" *Ann N Y Acad Sci* 917:297-306
- Tang *et al.* (2004) "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes" *J Exp Med* 199:1455-1465
- Taylor (1999) "Ocular immunosuppressive microenvironment" 73:72-89
- 25 Taylor (2003) "Modulation of regulatory T cell immunity by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone" *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:143-149
- Taylor (2005) "The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAKM in macrophages" *J Neuroimmunol* 162:43-50
- Taylor *et al.* (1992) "Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor" *Curr Eye Res* 11:1199-1206
- 30 Taylor *et al.* (1994a) "Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor" *J Immunol* 153:1080-1086
- Taylor *et al.* (1994b) "Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-stimulated T cell production of gamma-interferon" *Neuroimmunomodulation* 1:188-194
- 35 Taylor *et al.* (1996) "Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid" *Neuroimmunomodulation* 3:112-118
- Taylor *et al.* (2003) "Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2644-2629
- Teiger *et al.* (1996) *J Clin Invest* 97:2891-97
- 40 Willheim *et al.* "Regulatory effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes" *J Clin Endocrinol Metab* 84:3739-3744
- Yamagiwa (2001) "A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood" *J Immunol* 166:7282-7289
- Zeller *et al.* (1999) "Induction of CD4⁺ T cell alloantigen- specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta" *J Immunol* 163:3684-3691
- 45 Zheng *et al.* (2002) "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4⁺CD25⁻ precursors" *J Immunol* 169:4183-4189
- Zheng *et al.* (2004) "CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome" *J Immunol* 172:1531-1539.

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* de generación de linfocitos T con actividad reguladora (T reg) que comprende:
 - 5 a. seleccionar leucocitos que expresan CD4 para obtener células CD4⁺;
 - b. incubar leucocitos autólogos CD4⁺ con células mononucleares de sangre periférica apoptóticas autólogas (AC), donde las AC se obtienen mediante un tratamiento inductor de la apoptosis que es un procedimiento de ECP que emplea un compuesto fotoactivable junto con luz de una longitud de onda que activa el compuesto fotoactivable.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la incubación es durante un tiempo y en condiciones suficientes para generar T reg.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la incubación es a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1, preferentemente a una proporción de CD4⁺:AC de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto fotoactivable es un psoraleno y la luz es UVA.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el psoraleno es 8-MOP.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la incubación comprende además la adición de factores que potencian adicionalmente la generación o función de los T reg, opcionalmente, donde los factores son hormonas, proteínas, fármacos o anticuerpos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde los factores se seleccionan de al menos uno de TGFβ, αMSH, anti-CD46, IL-10, vitamina D3, dexametasona, rapamicina e IL-2.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el factor es IL-10.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la IL-10 está presente a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, preferentemente, a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml.
- 35 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la incubación es durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 días, preferentemente, durante aproximadamente 8 días.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además la adición de un antígeno a la incubación para generar T reg que regulen la respuesta inmune hacia el antígeno, opcionalmente, donde el antígeno es un aloantígeno.

Figura 1

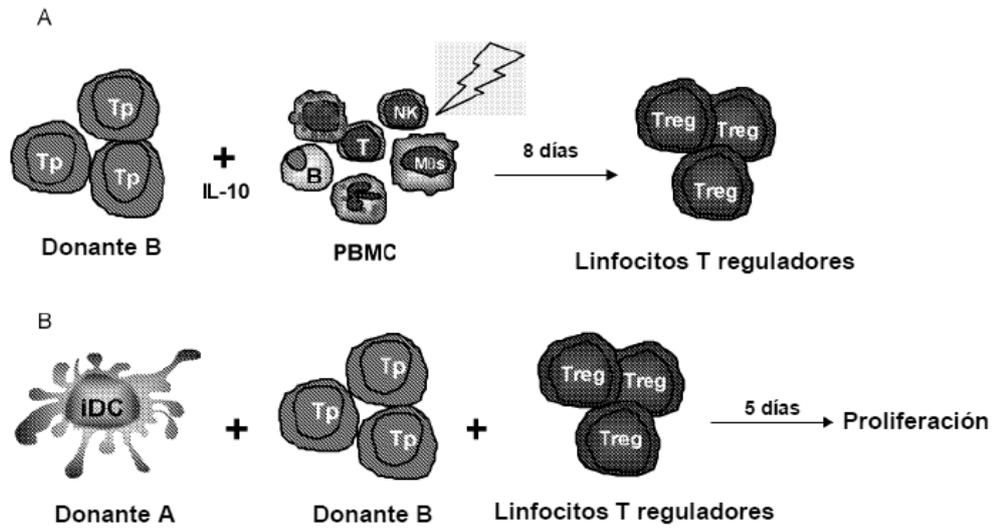


Figura 2

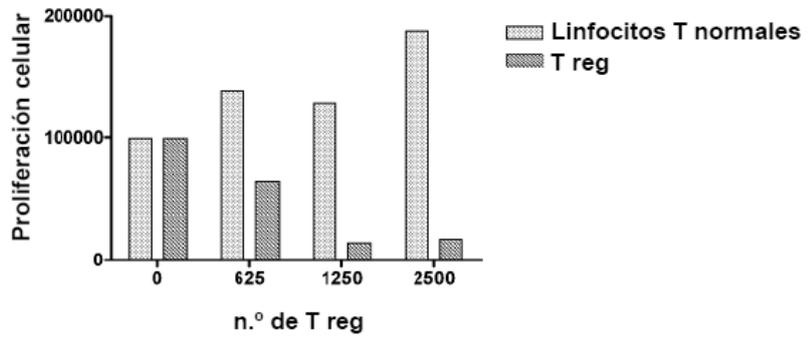


Figura 3

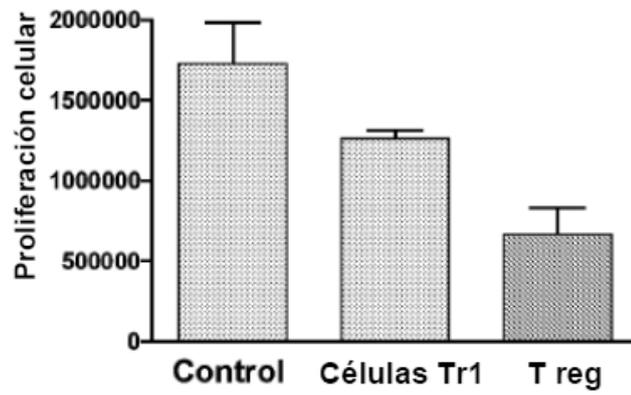


Figura 4

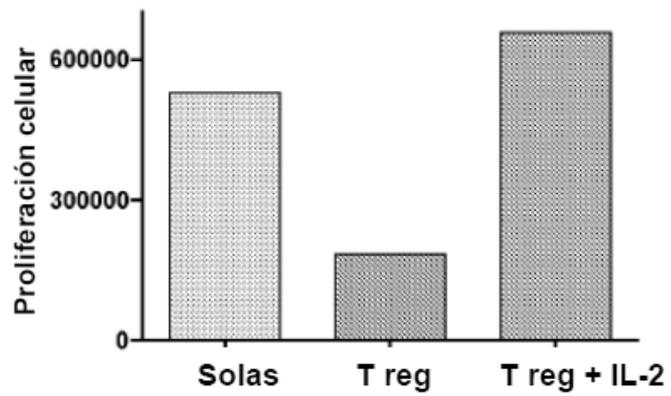


Figura 5

