

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 818**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/SE2011/051544**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087234**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11850142 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2654758**

54 Título: **Una composición que comprende al menos dos compuestos que inducen indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), para el tratamiento de un trastorno autoinmune o rechazo autoinmune de órganos**

30 Prioridad:

22.12.2010 SE 1051356

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2017

73 Titular/es:

**IDOGEN AB (100.0%)
Scheelevägen 2
223 81 Lund , SE**

72 Inventor/es:

**SALFORD, LEIF;
SJÖGREN, HANS OLOV y
WIDEGREN, BENGT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 818 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

Una composición que comprende al menos dos compuestos que inducen indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), para el tratamiento de un trastorno autoinmune o rechazo autoinmune de órganos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa, para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune o enfermedad o rechazo inmune de trasplantes o células terapéuticamente modificadas por genes, en donde dichos inductores tienen diferentes mecanismos de acción y en el que la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre los niveles de IDO. La invención se caracteriza además en las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la invención

La indolamina dioxigenasa (IDO) degrada el resto indol de triptófano e inicia la producción de metabolitos neuroactivos e inmunorreguladores, colectivamente conocidos como quinureninas. La expresión funcional de IDO por las células dendríticas ha surgido en los últimos años como un importante mecanismo de tolerancia periférica. La IDO contribuye a la tolerancia materna en el embarazo, el control del rechazo del aloinjerto, y la protección contra la autoinmunidad, la patología inflamatoria y la alergia. La expresión de IDO también sirve a un mecanismo fisiológico por el cual las malignidades inducen tolerancia inmune (Uyttenhove et al., 2004, Mellor et al., 2004, Munn et al., 2004). El amplio espectro de condiciones fisiopatológicas en las que la IDO aparece en funcionamiento sugiere que este sistema supresor está frecuentemente implicado en la desregulación fisiológica de las respuestas de las células T y las respuestas inflamatorias resultantes. Hay una serie de sustancias conocidas que inducen IDO, en donde dichos compuestos tienen diferentes mecanismos de acción. Ejemplos de clases de tales inductores de IDO, que tienen diferentes mecanismos de acción, son, entre otros, los análogos de citidina, inhibidores de histona desacetilasa, análogos de vitamina D3, interferones, ligandos de receptores tipo toll, hormonas de señalización del receptor de gonadotropina, análogos de prostaglandina E2, estabilizadores de IDO, conjugados CTLA4 solubles, y glicocorticoides.

25 Sin embargo, muchas de estas sustancias aumentan la cantidad de IDO a niveles que son demasiado bajos para ser adecuados en la composición farmacéutica, y por lo tanto requieren, para inducir niveles efectivos de IDO, dosis altas que no son adecuadas por razones de toxicología, cumplimiento o costes. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas composiciones farmacéuticas que, a niveles de dosis adecuados, puedan aumentar IDO a niveles que sean suficientes y terapéuticamente útiles en el tratamiento de diferentes trastornos autoinmunes y en la prevención de rechazos de trasplantes.

30 El documento US2008/108559 describe composiciones y métodos de tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y los trastornos hematológicos usando un inhibidor de la metilación del ADN y un inhibidor de la histona desacetilasa.

35 El documento WO2008/147283 describe el uso de zebularina para aumentar la cantidad de producción de IDO con el fin de inducir tolerancia inmunológica.

Sumario de la invención

40 La invención se refiere al hallazgo de que los compuestos que, cuando se usan solos, inducen IDO a niveles que no son suficientes en relación con los regímenes de tratamiento, podrían usarse en mezclas o combinaciones de compuestos que inducen IDO, y que mezclando diferentes inductores de IDO con un mecanismo de acción diferente, el aumento de IDO era más que la suma de lo que cada inductor de IDO habría logrado solo, y en algunos casos hasta 100 veces mayor que ese efecto aditivo. Haciendo esta combinación, será por primera vez posible producir una composición farmacéutica que pueda utilizarse para el tratamiento de un mamífero que lo necesite para una serie de enfermedades y trastornos en los que la inducción de IDO es terapéuticamente útil.

45 En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), para su uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad autoinmune o rechazo inmune de trasplantes o células terapéuticamente modificadas por genes, en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en el que uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a la composición descrita anteriormente para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno o enfermedad autoinmune o que sufre de un rechazo inmune de órganos, tejidos, células normales o células terapéuticamente modificadas por genes, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición se administra a un paciente y en el que el tratamiento induce IDO.

55

En un tercer aspecto de la invención, se cultivan células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno, por ejemplo a partir de sangre periférica o médula ósea del paciente o de otra persona, *ex vivo* en un medio adecuado. A estas células se añaden la composición inventada descrita anteriormente con el objetivo de inducir la producción de IDO e inducir la diferenciación a células que tienen una producción elevada de IDO. Simultáneamente o poco después, se administrará a las células uno o más antígenos, que están asociados con la afección que se está tratando (por ejemplo, un autoantígeno responsable de una enfermedad autoinmune), después de lo cual las células se transfieren al paciente. Este tratamiento *ex vivo*, o transferencia celular adoptiva, como también puede llamarse en la bibliografía científica, conducirá a una migración de las células transferidas a órganos o tejidos donde pueden activar las células T para convertirse en células T supresoras o para convertirse en células T reguladoras específicas de antígeno. Las células transferidas también pueden migrar a sitios de inflamación donde pueden perpetuar localmente las células T reguladoras existentes. Por lo tanto, según este aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición tiene un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en donde uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos es seleccionado de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno o enfermedad autoinmune o que sufre de rechazo inmune de órganos, tejidos, células normales o células terapéuticamente modificadas por genes, en donde el tratamiento induce IDO, en el que

20 i. Una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición se administra *ex vivo* a células derivadas del mamífero tratado o de otro mamífero;

ii. Uno o más antígenos asociados con una afección que se está tratando se administran a las células; y

iii. Las células tratadas se transfieren al mamífero que se está tratando.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para inducir IDO en un cultivo celular capaz de tener IDO inducido que comprende las etapas de:

- (A) proporcionar células aisladas en un medio adecuado;
- (B) añadir la composición que comprende al menos dos compuestos cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO comparado con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usa solo, en donde uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón Gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana;
- (C) incubar dichas células aisladas con la composición; y
- (D) obtener un cultivo celular en el que se induce IDO.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un cultivo celular en el que se ha inducido IDO que comprende una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en los que la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usa solo, en donde uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina e interferón gamma. La escala es logarítmica y los valores relativos se dan para cada barra.
- 45 Figura 2: Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por interferón gamma y ácido valproico. 2A: Ácido valproico a 1 mM. 2B: Ácido valproico a 0,5 mM.
- Figura 3: Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma y ácido valproico. El resultado demuestra claramente un efecto sinérgico de las tres sustancias sobre la expresión de IDO1 por células THP-1.
- Figura 4: Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por hCG y zebularina y por hCG e interferón gamma. 4R: Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control del medio), expuestas a zebularina sola (100 µM), hCG sola (0,1 unidades/ml) o una combinación. Los resultados de las células THP-1 expuestas a la combinación demuestran un efecto sinérgico. 4B: Resultados obtenidos cuando las células no estaban expuestas (control del medio), expuestas a hCG sola (0,01 unidades/ml), interferón gamma solo (200 UI/ml) o una combinación. Las células THP-1 expuestas a la combinación demostraron un efecto sinérgico.

Figura 5: Cinética de la expresión de IDO1 después de la exposición al interferón gamma durante 24 horas desde el inicio y la exposición continua a zebularina. El objetivo del estudio fue investigar la cinética del interferón en combinación con zebularina. La inducción de IDO1 por el interferón gamma solo fue fuerte después de 24 horas, pero el efecto no se mantuvo y disminuyó rápidamente. En contraste, cuando se combinó con zebularina mantenida durante todo el período, el efecto se mantuvo los días 2 y 3, aunque a un nivel reducido.

Figura 6: Cinética de la expresión de IDO1 después de la exposición al interferón gamma durante 24 horas después de diferentes tiempos de preexposición a zebularina. Cinética del efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina e interferón gamma. En el panel A se demuestra un bajo efecto de la zebularina después de cuatro días. Interferón gamma solo administrado después de 3 días, 24 horas antes de la cosecha da una banda fuerte y cuando se añade interferón gamma después de 3 días, 24 horas antes de la cosecha de células THP-1 expuestas a zebularina, da un efecto más fuerte, demostrando un efecto sinérgico también cuando la zebularina precede al interferón con 3 días. En el panel B, las células THP-1 recibieron zebularina solo durante 5 días y se detectó una banda débil. Interferón gamma solo dado después de 3 días y lavado 24 horas más tarde, mostró una banda débil cuando se probó 24 horas después de la eliminación del interferón. Esto está de acuerdo con los resultados presentados en la Figura 5. La combinación de zebularina desde el inicio y el interferón gamma dado durante 24 horas después de tres días, dio como resultado un alto nivel de expresión sostenido. En el panel C, las células THP-1 fueron expuestas a zebularina durante 6 días y el interferón gamma se administró durante 24 horas después de cuatro días y las células se cosecharon después de un total de 6 días. De nuevo, casi no se detectó inducción de IDO1 por el interferón gamma solo, pero con la combinación se observó una fuerte expresión de IDO1. En el panel D y E, las células THP-1 fueron expuestas a zebularina durante 7 días y al interferón gamma durante 24 horas, bien después de tres días (panel D) o después de cuatro días (panel E). Una expresión de IDO1 fuerte sostenida por la combinación se ilustra tanto en el panel D como en el E.

Figura 7: Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina y dos concentraciones de interferón A, 2,5 y 25 ng/ml, respectivamente.

Figura 8. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma e interferón A.

Figura 9. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma y TGF- β 1.

Figura 10. Efecto sinérgico sostenido sobre la expresión de IDO por zebularina y una exposición de 24 horas al interferón gamma.

Figura 11. Efecto sinérgico sostenido sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma e interferón A.

Figura 12. Efecto sinérgico sostenido sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF- β .

Figura 13. La expresión mejorada de IDO1 en células dendríticas derivadas de médula ósea de rata (BMDC) después de una exposición de 5 días a 50 μ M de zebularina *in vitro* y una función supresora mejorada, inhibiendo la activación policlonal de los linfocitos del bazo mezclados *in vitro*.

Figura 14. Zebularina, inoculada diariamente durante 7 días intraperitonealmente en ratas Wistar adultas, induce una expresión aumentada de IDO1 en el bazo y una reactividad de células T suprimida frente a la estimulación policlonal *in vitro*.

Figura 15. Supresión del rechazo inmunológico de los islotes pancreáticos alotransplantados por debajo de la cápsula renal mediante inoculaciones intraperitoneales diarias de zebularina durante 14 días en comparación con los controles no tratados. Seguimiento de glucosa en sangre en ratas de control como una indicación del rechazo. La figura muestra los resultados de animales de control.

Figura 16. Supresión del rechazo inmunológico de los islotes pancreáticos alotransplantados por debajo de la cápsula renal mediante inoculaciones intraperitoneales diarias de zebularina durante 14 días en comparación con los controles no tratados. Seguimiento de glucosa en sangre en ratas tratadas con zebularina como una indicación del rechazo. La figura muestra los resultados de animales tratados.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

La expresión "efecto sinérgico" pretende significar un aumento en los niveles de IDO, después del uso de una combinación de inductores de IDO, que es significativamente mayor que la suma de los niveles de IDO alcanzados con cada uno de los inductores de IDO si se usan solos, solíéndose denominar dicha suma "efecto aditivo".

La expresión "mecanismo de acción diferente" se define como diferentes maneras de inducir IDO, a nivel molecular y/o por vías biológicas más complejas, algunas de las cuales pueden incluir vías inmunológicas. En particular, se sabe por la literatura que las diferentes clases de inductores de IDO mostrados en la Tabla 1 a continuación tienen modos de acciones totalmente o parcialmente diferentes con respecto a su inducción de IDO. Estas diferentes

clases son análogos de citidina, inhibidores de histona desacetilasa, análogos de la vitamina D3, análogos del interferón gamma, otros interferones, tales como el interferón alfa, ligandos de receptores de tipo toll, hormonas de señalización del receptor de gonadotropina, análogos de prostaglandina E2, estabilizadores de IDO, conjugados CTLA4 solubles, TGF-beta y glicocorticoides. Los inductores de IDO de la presente invención incluyen análogos de

5 citidina, inhibidores de histona desacetilasa, análogos de interferón gamma, otros interferones, tales como interferón alfa, hormonas de señalización del receptor de gonadotropina y TGF-beta.

El término "inmunosupresor" se define en este documento como un efecto que reduce, detiene o mejora el insulto inmunológico y es protector, resucitativo o revivativo para el tejido afectado que ha sufrido el insulto citotóxico a partir de células inmunes o de inflamación.

10 La expresión "agente inmunosupresor" se define en este documento como el ingrediente activo o la composición que contiene una dosis de tratamiento de insulto inmune del ingrediente activo eficaz para reducir, prevenir, detener o mejorar el insulto inmunitario y que proporciona protección, resucitación o reactivación al tejido afectado que ha sufrido el insulto inmuno-mediado o está en riesgo de ello.

La expresión "dioxigenasa de indolamina (IDO)" pretende significar IDO-1 (indolamina 2,3-dioxigenasa, EC 1.13.11.52). IDO-1 e IDO-2 (indolamina-pirrol 2,3 dioxigenasa-tipo 1, EC 1.13.11.-) son dos proteínas diferentes que pueden catabolizar el triptófano. IDO-1 también puede catabolizar la serotonina y la melatonina, pero la especificidad del sustrato para IDO-2 no está tan bien estudiada. Los catabolitos procedentes de la ruta del triptófano son el triptófano, la N-formil-quinurenina, el formil-antranilato, el antranilato, la L-quinurenina, el 4-(2-aminofenil)-2,4-dioxibutanoato, el ácido quinurénico, la 3-hidroxi-L-quinurenina, 3-hidroxi-antranilato, 3-metoxi-antranilato, 4-(2-amino-3-hidroxi-fenil)-2,4-dioxobutanoato, xanturenato, 8-metoxi-curenato, semialdehído de 2-amino-3-carboxi-muconato, semialdehído de 2-aminomuconato, ácido quimolínico, cinnavalininato, triptamina, N-metilriptamina, indolacetato, 2-formamino-benzoilacetato, 5-hidroxi-L-triptófano, 5-hidroxi-N-formilcunerina, 5-hidroxi-cunerina, 4,6-Dihidroxi-cunerenamina, 4,6-dihidroxi-quinolina, serotonina, N-acetil-serotonina, melatonina, 6-hidroxi-melatonina, formil-N-acetil-5-metoxiquinurenamina, N-metilserotonina, formil-5-hidroxi-quinurenamina, 5-Metoxitriptamina, 5-hidroxiindol-acetaldehído, 5-hidroxiindolacetato, 5-Metoxiindolacetato, o 5-hidroxiindol-acetilglicina para potenciar la actividad inmunosupresora de IDO. Ejemplos son Quinurenina, 3-hidroxi-quinaurenina, ácido antranílico, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido quinolínico y ácido picolínico.

La inmunosupresión mediada por IDO está mediada por la inanición de triptófano, la inducción de la apoptosis en los linfocitos y la inducción de las células T reguladoras (Treg). La inducción de la apoptosis y la inducción de Treg está mediada por los catabolitos, de donde la adición de tales catabolitos en combinación con la inducción de IDO por la composición de la invención puede aumentar el efecto clínico. La acción inmunosupresora de IDO puede explicarse por 1) la inanición de triptófano, 2) el efecto tóxico directo de varios de los catabolitos anteriormente mencionados que inducen la apoptosis de las células inmunitarias, particularmente L-quinurenina, antranilato, 3-hidroxi-antranilato y 3-hidroxi-L-quinurenina, y/o 3) que algunos de los catabolitos estimulan la diferenciación de células T helper a células T reguladoras inmunosupresoras importantes para la tolerancia.

Un análogo es una molécula que difiere en la estructura química de un compuesto original, por ejemplo un homólogo (que difiere por un incremento en la estructura química, tal como una diferencia en la longitud de una cadena alquílica), un fragmento molecular, una estructura que difiere de uno o más grupos funcionales, un cambio en la ionización. Los análogos estructurales a menudo se encuentran usando relaciones de actividad de estructura cuantitativa (QSAR), con técnicas tales como las descritas en Remington (The Science and Practice of Pharmacology, 19a edición (1995), capítulo 28).

Se sabe que la expresión del gen IDO se induce en las células presentadoras de antígeno. Diferentes subpoblaciones productoras de IDO de células dendríticas o macrófagos tienen una expresión variable de las otras enzimas en la ruta del triptófano y por lo tanto se puede anticipar que producen diferentes subconjuntos de catabolitos. Las células dendríticas (DC) y, particularmente, las células dendríticas plasmocitoides (pDC) son los mediadores más fuertes de la supresión de las células T dependientes de IDO (Fallarino et al., Current Drug Metabolism 8: 209-16, 2007).

La expresión de IDO está sujeta a una regulación compleja por una serie de señales, y los niveles de IDO pueden ser inducidos o mantenidos por diferentes mecanismos de acción. Por ejemplo, IDO puede ser inducido por la inhibición de las ADN metil transferasas o las histona desacetilasas que activan a promotores silenciados de otra manera de IDO. La IDO también puede ser inducida por la activación de NFkB, lo que da como resultado la expresión génica de IDO, siendo inducida dicha activación de NFkB por diversos factores tales como la señalización del interferón gamma R1/gamma R2, la activación del receptor de tipo toll, etc. Además, los inhibidores de las especies oxidativas reactivas (ROS) pueden contribuir a la estabilización del IDO, así como otros mecanismos que estabilizan los niveles existentes de IDO o potencian los efectos del IDO existente o inhiben las vías que degradan o inactivan el IDO. Otra forma de aumentar o mantener los niveles de IDO deseados es mediante la inhibición de vías que están en la dirección de otros inductores de IDO pero que no conducen a la inducción de IDO, favoreciendo dicha inhibición la inducción de IDO. Otro mecanismo más es activando el interferón gamma, y/u otras formas de activar una inducción autocrina de IDO. Estos y otros modos de acción para la inducción de IDO se describen en la

60 Tabla 1.

La invención se refiere a una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce IDO, para su uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad autoinmune o rechazo inmune de trasplantes o células terapéuticamente modificadas por genes, en el que los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en los que la composición da lugar a un efecto sinérgico (el "efecto sinérgico" se define anteriormente) en el nivel IDO en comparación con la suma del nivel IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usa solo, en donde uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana. Preferiblemente, tales efectos sinérgicos deberían ser significativamente más altos que el efecto aditivo (el "efecto aditivo" se define anteriormente), por ejemplo, al menos tres veces más alto. Sin embargo, el efecto sinérgico es preferiblemente más de tres veces superior, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50 ó 100 veces más alto o incluso más tal como se muestra en algunos de los ejemplos in vitro presentados a continuación. Los inductores de IDO pueden seleccionarse del grupo que consiste en análogos de citidina, inhibidores de histona desacetilasa, análogos de vitamina D3, análogos de interferón gamma, otros interferones, ligandos del receptor de tipo toll, hormonas de señalización del receptor de gonadotropina, análogos de prostaglandina E2, estabilizadores IDO, conjugados CTLA4 solubles y glicocorticoides. Ejemplos de diferentes inductores son zebularina, ácido valproico, gonadotropina coriónica humana e interferón gamma. Otros ejemplos son los mencionados en la Tabla 1 a continuación. En una realización de la invención, la composición comprende:

- i. Zebularina e interferón gamma;
- ii. Zebularina, interferón gamma e interferón A;
- 20 iii. Zebularina, interferón gamma y ácido valproico;
- iv. Zebularina, interferón gamma y TGF-beta; o
- v. Zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF-beta.

En otra realización de la invención, la composición comprende zebularina e interferón A.

En otra realización de la invención, la composición comprende zebularina y gonadotropina coriónica humana.

25 Las composiciones inventadas pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aclorhidria, leucoencefalitis hemorrágica aguda, enfermedad de Addison, alopecia areata, anemia perniciosa, enfermedad de la membrana basal anti-glomerular, síndrome antifosfolípido, anemia aplásica, alergia atópica, gastritis atrofica autoinmune, pérdida auditiva autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hipoparatiroidismo autoinmune, hipofisitis autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, poliendocrinopatía-candidiasis-distrofia ectodérmica autoinmune, síndrome autoinmune poliglandular Tipo II, síndrome de Behcet, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, colangitis esclerosante, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tiroiditis linfocítica crónica, síndrome de Churg-Strauss, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus (dependiente de insulina), esclerosis cerebral difusa de Schilder, epidermólisis bullosa adquirida, síndrome de Felty, glomerulonefritis membranosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Hamman-Rich, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica activa, enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, uveítis inducida por lentes, Lichus Sclerosus et Atrophicus, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso sistémico, hepatitis lupus, lupus nefritis, linfopenia, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido mixto conectivo, úlcera de Mooren, síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, mielitis transversa, 30 miocarditis, narcolepsia, neuromielitis óptica, síndrome vestíbulo ocular auditor, oftalmía simpática, síndrome de opsoclono-mioclono, pancreatitis, penfigoide ampuloso, penfigo foliaceo, pemfigo vulgaris, poliarteritis nodosa, policondritis recidivante, poliendocrinopatía autoinmune, polimialgia reumática, poliradiculoneuropatía, cirrosis biliar primaria, psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante, el síndrome de persona rígida, enfermedad de Still de inicio adulto, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a la insulina tipo B, síndrome uveomeningoencefálico, granulomatosis de Wegener y vitiligo. Entre los ejemplos específicos de enfermedades se incluyen la artritis reumatoide, la diabetes mellitus tipo I, la psoriasis, el síndrome de Sjögren, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, la arteriosclerosis, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia o en trasplantes para inhibir el rechazo inmune de órganos, tejidos, o células normales o terapéuticamente modificadas por genes.

En particular, las composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento de la artritis reumatoide, la diabetes mellitus tipo I, la psoriasis, el síndrome de Sjögren, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, la arteriosclerosis, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la demencia.

55 La composición inventada puede comprender además un tampón, excipiente, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad biológica

de los ingredientes activos. Tales tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

5 El término "tampón" pretende significar una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el propósito de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazolelático, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

10 El término "disolvente" pretende significar un líquido acuoso o no acuoso con el fin de presentar, diluir y/o disolver la composición. El disolvente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

15 El excipiente puede ser uno o más de hidratos de carbono, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, p. ej., para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son el almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y sus derivados, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, poli (alcohol vinílico)/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión, para la dilución o para proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Ejemplos de lípidos son los ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di- y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud y saturación de cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, huevo hidrogenado y lecitina de soja, que se añaden a la composición por razones similares a las de los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de zinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de la acumulación de líquido o propiedades de pigmento ventajosas.

25 La composición puede administrarse a un mamífero que lo necesite en una cantidad adecuada para conseguir un efecto correspondiente a tales concentraciones que inducen una fuerte actividad IDO in vitro de dichos al menos dos inductores.

30 Al tener un efecto directo sobre el sistema inmunitario, el tratamiento con una dosis adecuada también es posible para utilizar la composición para el pretratamiento de trasplantes (órganos, tejidos o células) induciendo la expresión de IDO en las células endoteliales y como consecuencia haciéndolas menos inmunogénicas al huésped y reduciendo el riesgo de rechazo de las células injertadas. Mediante el tratamiento subsiguiente de los receptores de injerto con la composición, a una dosis que proporcione la supresión inmune in vivo, se puede lograr una supervivencia permanente de los trasplantes sin más terapia inmunosupresora o con un mínimo de tal terapia.

35 Para tratar a un paciente, la composición inventada puede administrarse a niveles de dosis que alcanzarán concentraciones in vivo, en los sitios o lugares de acción, que se hagan entre 5 μ M a 10 mM, u otros niveles más bajos o más altos que sean efectivos, dependiendo de qué enfermedad o trastorno se trate y en la que se hace referencia al inductor de IDO. Para los inductores de IDO para los que las concentraciones normalmente no se expresan como concentraciones molares (M), se aplican otros valores numéricos, por ejemplo de 0,001 UI/mL a 100 MUI/mL, o intervalos más estrechos tales como 1-1000 UI/mL u otros niveles adecuados. De forma similar, se aplican otros valores numéricos cuando los niveles resultantes se expresan como ng/ml, mg/ml, mg/kg de peso corporal, etc. Inicialmente, se puede usar una dosis más alta tal como la seguida por una dosis de mantenimiento más baja. Para el tratamiento ex vivo (transferencia de células adoptiva), deben alcanzarse concentraciones similares a las indicadas anteriormente, si bien estas son concentraciones in vitro/ex vivo y no concentraciones in vivo. Las dosis destinadas para cada inductor de IDO también dependerán de qué otro inductor(es) IDO que actúe sinérgicamente se use. Además, como el número de inductores de IDO en la composición inventada y que actúa sinérgicamente puede ser dos, tres, cuatro o más, es obvio que se puede definir un número muy grande de niveles de dosis viables.

40 La composición de la invención puede ser administrada por cualquier vía adecuada incluyendo oral, sublingual, bucal, nasal, por inhalación, parenteral (incluyendo intraperitoneal, intraórgano, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraarticular, venosa (central, hepática o periférica), linfática, cardíaca, arterial, incluyendo el abordaje cerebral selectivo o superselectivo, perfusión retrógrada a través del sistema venoso cerebral, vía catéter en el parénquima cerebral o ventrículos), exposición directa o bajo presión sobre o a través del cerebro o tejido espinal o cualquiera de los ventrículos del líquido cefalorraquídeo, inyecciones en los espacios subaracnoideo, cerebral cisternal, subdural o epidural, a través de cisternas cerebrales o punción lumbar, instilación intra y periocular incluyendo la aplicación por inyección alrededor del ojo, dentro del globo ocular, sus estructuras y capas, el oído, incluyendo la trompa de Eustaquio, células de aire mastoides, canales auditivos externos e internos, membrana timpánica, oído medio, oído interno incluyendo el ganglio espiral coclear y los órganos laberínticos, así como vía

enteral, intestinal, rectal, vaginal, uretral o cisterna vesical. Además, para las indicaciones in útero y perinatal, las inyecciones en la vasculatura materna, o a través de o dentro de los órganos maternos incluyendo el útero, el cuello del útero y la vagina, y en el embrión, el feto, el neonato y los tejidos y espacios aliados como el saco amniótico, el cordón umbilical, la arteria o venas umbilicales y la placenta. La ruta preferida puede variar dependiendo del estado del paciente y de la composición utilizada en cada caso.

El efecto de la composición inventada puede combinarse con un agente inmunosupresor para reducir la frecuencia de las células inmunitarias efectoras durante o antes de la inducción de la tolerancia.

Esta invención incluye la posibilidad de utilizar el tiempo y la secuencia de suministro de la composición inventada para inducir la tolerancia de una manera óptima. También incluye la posibilidad de utilizar el tiempo y secuencia de suministro de los inductores IDO individuales, que comprende la composición inventada, para inducir la tolerancia de una manera óptima. Por ejemplo, cuando la composición inventada comprende dos inductores de IDO ("A" y "B"), se puede administrar primero A mediante una determinada vía de administración y régimen de dosificación (dosis, concentraciones, frecuencia, etc.). A continuación, B se administrará en otra ruta, dosis y régimen de dosificación. Finalmente, uno de A o B puede ser detenido antes que el otro. Se puede prever un gran número de tales regímenes de tratamiento diferentes y sinérgicos para las diversas combinaciones inventadas, cada uno teniendo en cuenta la inductancia IDO de cada inductor de IDO, la cinética de expresión génica, la farmacocinética, etc.

La composición puede comprender ingredientes activos adicionales tales como metotrexato, rapamicina, ciclofosfamida, antimetabolitos incluyendo azatioprina, inhibidores de la síntesis de nucleótidos (incluyendo micofenolato de mofetilo, mizoribina, leflunomida, FK778), FTY720, anticuerpos que agotan los linfocitos (incluyendo anticuerpos policlonales a linfocitos, timocitos, células T, muromonab-CD3, rituximab, alemtuzumab, CAMPATH-1), anticuerpos anti-TNF (incluyendo infliximab, adalimumab), natalizumab (anti-VLA-4), anticuerpos anti-CD154 BG9588 e IDEC 131), receptores de citoquinas solubles (incluyendo lenercept y etanercept (receptores TNF p55 y TNF p75 solubles) y anakinra (IL-1RA soluble). Los fármacos inmunosupresores mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con la composición de la invención para reducir el número de células efectoras inmunes.

La composición se puede distribuir y poner a disposición en formas de dosificación unitarias convenientes tales como cápsulas y ampollas y puede fabricarse y distribuirse por cualquiera de los métodos conocidos en las técnicas farmacéuticas. Además del ingrediente activo, la composición puede contener también otros agentes habituales de la técnica relacionados con el tipo de composición producida. Esto puede tomar, por ejemplo, la configuración de suspensiones, soluciones y emulsiones del ingrediente activo en diluyentes lipídicos, no acuosos o acuosos, disolventes, agentes disolventes, emulsionantes, jarabes, granulados o polvos, o mezclas de los mismos. La composición también puede contener agentes colorantes, conservantes, perfumes, adiciones aromatizantes y agentes edulcorantes. Además del ingrediente activo, la composición puede contener también otros medicamentos farmacéuticamente activos. La fabricación y distribución de la composición se lleva a cabo por técnicas conocidas en la técnica, tales como, unir uniformemente e íntimamente el ingrediente activo con líquidos o sólidos finos o ambos, y luego, si es necesario, formar la composición en una forma de unidad de dosis. La dosis discreta, la porción y el vehículo portador que constituyen la composición se adaptarán generalmente en virtud de su forma o embalaje para administración médica y se distribuirán para este fin.

Los comprimidos se pueden fabricar y distribuir por compresión o molde, a partir del ingrediente activo posiblemente con uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Las tabletas comprimidas se pueden fabricar y distribuir, por compresión en una máquina típica de la técnica, de una cantidad conocida del ingrediente activo en una configuración dispersable tal como polvo o gránulos, posiblemente mezclada con otros agentes incluyendo aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, conservantes y agentes dispersantes. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse y distribuirse moldeando en una máquina típica de la técnica una mezcla de cantidad conocida de compuestos farmacéuticamente activos de adición de ingrediente activo y otros aditivos humedecidos con un diluyente líquido. Las tabletas pueden estar revestidas, envueltas o cubiertas, con sustancias que incluyen matrices protectoras, que pueden contener opacificantes o edulcorantes y pueden formularse para permitir una liberación lenta o controlada o también liberar dentro de una cierta parte del sistema digestivo de los ingredientes activos contenidos. Las cápsulas pueden fabricarse y distribuirse mediante la colocación de una cantidad conocida de ingrediente activo, compuestos farmacéuticamente activos adicionales y aditivos dentro de una cápsula de gelatina u otra sustancia disoluble acuosa de dos partes o sellada. El ingrediente activo también se puede fabricar y distribuir como una composición en formas microencapsuladas, microsómicas, micelares y microemulsiones.

Las composiciones que contienen los ingredientes activos aceptables para la administración tópica oral pueden fabricarse y distribuirse como pastillas que contienen los ingredientes activos, otros compuestos farmacéuticamente activos y aditivos en una base aromatizada, tales como acacia y tragacanto; como pastillas que contienen el ingrediente activo con otros compuestos farmacéuticamente activos y aditivos en una base inerte tales como gelatina y sacarosa: enjuagues bucales o enjuagues que contienen el ingrediente activo con otros compuestos farmacéuticamente activos y aditivos en un líquido aceptable.

La composición que contiene el ingrediente activo aceptable para la administración tópica de la piel puede fabricarse y distribuirse como ungüentos, aceites, cremas, lociones, geles, pastas y como parches transdérmicos que contienen el ingrediente activo, otros compuestos farmacéuticamente activos, aditivos y un medio portador

aceptable.

Las composiciones que contienen el ingrediente activo aceptable para la administración nasal pueden fabricarse y distribuirse con otros compuestos y aditivos farmacéuticamente activos como un polvo para la inhalación, o como un líquido oleoso, acuoso o no acuoso para la pulverización nasal o gotas.

5 Las composiciones que contienen el ingrediente activo aceptable para la administración rectal pueden fabricarse y distribuirse como supositorios, cremas, espumas, duchas o enemas con otros compuestos farmacéuticamente activos, bases adecuadas de los diluyentes, grasas y aditivos habituales solubles en agua conocidos por los profesionales de la técnica.

10 La composición que contiene el ingrediente activo aceptable para la administración vaginal puede fabricarse y distribuirse como pesarios, supositorios, cremas, geles, espumas, duchas o pulverizaciones con otros compuestos farmacéuticamente activos, bases adecuadas y aditivos conocidos por los expertos en la técnica.

15 La composición que contiene el ingrediente activo aceptable para la administración parenteral puede fabricarse y distribuirse a partir de soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, otros compuestos farmacéuticamente activos, aditivos incluyendo antioxidantes, bacteriostáticos y solutos y azúcares tales como manitol para hacer la composición isotónica, hipotónica o hipertónica con la sangre del receptor; y también suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir suspensiones y espesantes. La composición puede fabricarse y distribuirse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas de vidrio o plástico selladas, viales, botellas y bolsas como líquido, y en estado seco requiriendo solamente la adición de líquido estéril, por ejemplo agua, soluciones salinas o dextrosa, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se pueden preparar a partir de polvos y tabletas del tipo anteriormente descrito.

20 La composición que contiene el ingrediente activo aceptable para la administración al cerebro y estructuras relacionadas, la médula espinal y estructuras relacionadas, el sistema ventricular y los espacios de líquido cefalorraquídeo pueden ser fabricados y distribuidos como soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas, que contienen otros compuestos farmacéuticamente activos, aditivos que incluyen antioxidantes, bacteriostáticos y solutos y azúcares tales como manitol para hacer la composición isotónica, hipotónica o hipertónica con el líquido cefalorraquídeo; y también suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir suspensiones y espesantes. La composición puede fabricarse y distribuirse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas de vidrio o plástico selladas, viales, botellas y bolsas como líquido, y en estado seco requiriendo solamente la adición de líquido estéril, por ejemplo agua, soluciones salinas o dextrosa, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se pueden preparar a partir de polvos y tabletas del tipo anteriormente descrito.

25 Las dosis unitarias deseadas de composiciones son aquellas que contienen una dosis diaria o una dosis de tratamiento con insulto inmunológico o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo administrado. Las formas de dosis unitarias de la invención también pueden incluir sistemas más complejos tales como jeringas de doble cañón, jeringas con compartimentos secuenciales, uno de los cuales puede contener el ingrediente activo, y el otro cualquier diluyente o vehículo necesario. Los agentes en las jeringas serían liberados secuencialmente o como una mezcla o combinación de los dos después de la activación del émbolo de la jeringa. Tales sistemas son conocidos en la técnica.

30 La composición puede usarse para el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como los mencionados anteriormente.

Tabla 1. Once clases de sustancias inductoras de IDO

Clase	Ejemplos de sustancias en la clase	Otras sustancias de la clase	Mecanismo de acción para la inducción de IDO
Análogos de la citidina	Zebularina, desoxiazacitidina, azacitidina	Otros derivados de zebularina y análogos de citidina 5-metilcitidina, 2'-desoxiebularina, 5-fluoro-zebularina, 5-fluoro-2'-dexeibularina, 5-cloro-zebularina, 5-cloro-2'-dexeibularina, 5-bromo-zebularina, 5-bromo-2'-dexeibularina, 5-yodo-zebularina, 5-yodo-2'-dexeibularina, 5-metilpirimidin-2-ona, 5-Me-2'-desoxicebularina, o mono, di- o trifosfatos de los mismos	La inhibición de la ADN-metil transferasa, activando los promotores silenciados de IDO-1, y posiblemente de FoxP3 e interferón gamma

ES 2 638 818 T3

Clase	Ejemplos de sustancias en la clase	Otras sustancias de la clase	Mecanismo de acción para la inducción de IDO
Inhibidores de la histona desacetilasa	Ácido valproico, trichostatina A, vorinostat (SAHA)	Otros ácidos hidroxámicos, tetrapéptidos cíclicos (trapoxina B) y depsipeptidos, benzamidas, cetonas electrofílicas, fenilbutirato, belinostat (PXD 101), LAQ824, panobinostat (LBH589), CI994, mocetinostat (MGCD0103)	La inhibición de la histona desacetilasa, activando los promotores silenciados de IDO-1 y posiblemente de FoxP3 e interferón gamma
Análogos de la vitamina D3	Calcitriol (1,25 (OH) ₂ D ₃)	Dihidrotaquisterol, alfacalcidol, calcitriol, paricalcitol	1,25(OH) ₂ D ₃ inhibe Th1 (IL2, IFN γ) y Th17 e inhibe la producción de IL12, todo lo cual tiene lugar al menos parcialmente a través de la inducción de IDO
Interferón gamma análogos *	Interferón gamma	Los análogos de interferón gamma, inductores de IFN-g (IL12, IL18, mAb 4-1BB)	La señalización interferón gammaR1/gamma R2 indujo la activación de NFkB que da como resultado la expresión génica IDO
Otros interferones	Interferón A, interferón B1, interferón-tau	El interferón W1, el interferón K,	El receptor de interferón indujo la activación de NFkB que resulta en la expresión del gen IDO
Los ligandos del receptor tipo Toll (TLR)	Oligonucleótidos de ADN que contienen CpG (por ejemplo, ODN 1826 y 2006), lipopolisacáridos	Otros motivos CpG no metilados, ARN de doble hebra, ARN de cadena sencilla, ADN de cadena doble no metilado CpG.	La activación de NFkB activada por TLR da como resultado la expresión génica de IDO
hormonas de señalización del receptor de gonadotropina	La gonadotropina coriónica humana recombinante (rhCG), la prolactina	La hormona luteinizante (LH)	Señalización del receptor de gonadotropina, que resulta en la expresión del gen IDO
Análogos de prostaglandinas E2	Prostaglandina E2 (PGE2)	Otros análogos de prostaglandinas E2, p. ej., éster metílico de (R)-15-metil-PGE2, éster metílico de (S)-15-metil-PGE 2	señalización de PGE2-receptor, lo que resulta en la expresión del gen IDO
Estabilizadores IDO	TGF-beta, Interleucina-10	TGF-beta 1: 2, 1: 3 y 2: 3, GDNF, BMPs	Inhibidores de las Especies Oxidativas Reactivas (ROS), estabilizando así la IDO. Así como otros mecanismos de estabilización IDO o efecto IDO
Conjugados CTLA4 solubles	CTLA4-Ig (abatacept/Orencia®)	Otros conjugados solubles de CTLA4	La unión a CD80/86 activando interferón gamma, con una inducción autocrina de IDO
Glicocorticoides	Dexametasona	Otros análogos de glicocorticoides	La inducción del ligando GITR en células dendríticas y la regulación positiva de GITR en células T mejoran

Clase	Ejemplos de sustancias en la clase	Otras sustancias de la clase	Mecanismo de acción para la inducción deIDO
			la señalización inversa en DC a través de GITRL que induce expresión deIDO.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto sinérgico sobre la expresión deIDO por zebularina e interferón gamma

5 **Materiales y métodos**

THP-1 (ATCC: **TIB-202**) es una línea celular monocítica humana que se origina de una leucemia monocítica aguda. Tiene el fenotipo de monocitos pero puede diferenciarse a un fenotipo más dendrítico. En el presente estudio, las células THP-1 fueron pasadas *in vitro* en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 5% o 10%, Hepes 10 mM, piruvato sódico 1 mM y gentamicina 50 µg/ml (medio R5 o R10 respectivamente). La densidad celular se ajustó a 200.000 células por ml y los cultivos se incubaron durante cuatro a siete días a 37°C con CO₂ al 10% en una incubadora humidificada. La sustancia, o combinación de sustancias, que se está estudiando, se añadieron al medio en los puntos de tiempo especificados y en el caso de IFN-gamma se eliminó del medio como se indica. 96-168 horas después del inicio del tratamiento, la expresión deIDO se evaluó por PCR o por PCR cuantitativa (Roche). El ARN se extrajo de las células cultivadas en matraces o placas de seis pocillos usando reactivo de Trizol según el protocolo de Invitrogen. El ADN residual se eliminó mediante tratamiento con DNasa libre de Rnasa (Roche Applied Science). La calidad y cantidad del ARN aislado se midió por espectrofotómetro y electroforesis en gel.

La expresión génica se demostró utilizando PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando el kit (Superscript RT-PCR de un solo paso con Platinum Taq, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones. Las secuencias de cebadores directos y cebadores inversos para el gen IDO-1 humano analizado y el gen de mantenimiento HPRT, respectivamente, fueron: IDO-1 directo: 5'-GGCAAAGTGAAGAAAAAGG-3', inverso: 5'-CAGACAAATATA TGCGAAGAAC; HPRT directo: 5'-CAAGCTTGCTGGTGAAGGA-3', HPRT inverso: 5'-ACTAAGCAGATGGCCACAGAA-3'. Las condiciones de PCR se establecieron de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min seguido por 40 ciclos (para el IDO-1) o 30 ciclos (para el HPRT) a 94°C durante 15 s, 53°C durante 30 s y 72°C durante 30 s con una reacción de extensión final a 72°C durante 5 min.

Los análisis de la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron utilizando el kit SuperScript III platino de dos pasos qRT-PCR con SYBR Green (Invitrogen). Se utilizó un total de 100-500 ng de ARN total en una reacción de 20 µl de RT utilizando una mezcla de cebadores polydT y hexámeros aleatorios. El cDNA obtenido se diluyó hasta un volumen total de 80 µl y se almacenó a -20°C. Las secuencias de cebadores para los diferentes genes se diseñaron utilizando el soporte de software Gene Fisher (G. Giegerich, F. Meyer, C. Schleiermacher, ISMB-96). Los cebadores utilizados para la amplificación del gen IDO fueron: directo: 5'- AGTCCGTGAGTTTGTCTTTCAA-3', secuencias de cebador, inverso: TTTCACA-CAGGCGTCATAAGCT-3'.

Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) HPRT directo: 5'-CAAGCTTGCTGGTGAAGGA-3', HPRT inverso: 5'-ACTAAGCAGATGGCCACAGAA-3' según la secuencia de cDNA. La qRT-PCR se realizó en 20 µl de reacción que constaba de 2 µl de ADNc diluido (12,5 ng), 0,3 µM de cada cebador, 1 µl de albúmina de suero bovino (50 µg/ml) y 10 µl de Platino SYBR Verde qRT-PCR superMix-UDG. La amplificación de IDO se llevó a cabo en un Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals) con el siguiente perfil térmico: Platino SYBR Verde qRT-PCR superMix-UDG incubación a 50°C durante 2 min, luego desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos a 94°C durante 2 s, 58°C durante 10 s, y 72°C durante 14 s. La amplificación de HPRT se llevó a cabo como sigue, incubación con UDG a 50°C durante 2 min, desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos a 94°C durante 2 s, 55°C durante 10 s y 72°C durante 14 s. Después de la amplificación se realizó un análisis de la curva de fusión. Los experimentos de qRT-PCR se realizaron siempre por triplicado.

Resultados y discusión

Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), o expuestas a zebularina (Berry & Associates, Inc. EE.UU.) solo, o interferón gamma IFN γ (Sigma) solo a diferentes concentraciones (Figura 1). Las células también fueron expuestas a 100 µM de zebularina en combinación con diversas concentraciones de interferón gamma. La escala es logarítmica y los valores relativos se dan para cada barra. Es sorprendente que, por ejemplo, la zebularina sola a 100 µM diera un valor de 9 y 200 UI/ml de interferón gamma diera un valor de 80. La suma de estos valores es 89, mientras que cuando ambos se dan juntos la expresión de IDO1 alcanzó un valor por encima de 37.000. Esto demuestra la inducción sinérgica de la expresión de IDO-1 en células THP-1 por las dos sustancias.

Ejemplo 2. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por interferón gamma y ácido valproico

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control del medio), expuestas a interferón gamma solo (200 UI/ml), ácido valproico (Sigma) solo (1 mM) o a la combinación (Figura 2A). Los resultados de las células THP-1 expuestas a la combinación demuestran un efecto sinérgico. Experimentos similares pero con la concentración de ácido valproico reducida a 0,5 mM también se realizaron (Figura 2B). También se demostró un efecto sinérgico sobre la expresión de IDO1 con esta combinación.

Ejemplo 3. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma y ácido valproico

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea celular monocítica humana THP-1 no estaban expuestas (control del medio), expuestas a zebularina sola (100 µM), al interferón gamma solo (200 UI/ml) o ácido valproico solo (1 mM) (figura 3). Las células THP-1 fueron expuestas a las tres sustancias por parejas y también con las tres sustancias en combinación. La escala es logarítmica y los valores relativos se dan para cada barra. El resultado demuestra claramente un efecto sinérgico de las tres sustancias sobre la expresión de IDO1 en células THP-1.

Ejemplo 4. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por gonadotropina coriónica humana (hCG) y zebularina, y por hCG e interferón gamma

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea celular monocítica humana THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a zebularina sola (100 µM), hCG (Pregnyl, Suecia) sola (0,1 unidades/ml), o una combinación (Figura 4A). Los resultados de las células THP-1 expuestas a la combinación demuestran un efecto sinérgico. La Figura 4B muestra los resultados cuando las células no están expuestas (control del medio), se exponen a hCG sola (0,01 unidades/ml), interferón gamma solo (200 UI/ml) o una combinación. La combinación demuestra un efecto sinérgico sobre la expresión de IDO1 en células THP-1.

Ejemplo 5. Cinética de la expresión de IDO1 después de la exposición al interferón gamma durante 24 horas desde el inicio y la exposición continua a zebularina

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea celular monocítica humana THP-1 se expusieron a zebularina sola (100 µM), interferón gamma (200 UI/ml) solo o las dos sustancias en combinación (Figura 5). El objetivo del estudio fue investigar la cinética del interferón en combinación con zebularina. Las células THP-1 se dividieron en cuatro grupos, uno expuesto a interferón gamma solo durante 24 horas, otro a zebularina solo durante todo el periodo de incubación y un tercer grupo expuesto a interferón gamma durante las 24 horas iniciales en combinación con zebularina para el periodo de incubación completo. Las células THP-1 se lavaron después de 24 horas y se sustituyó la zebularina. Los cuatro grupos de células THP-1 se recogieron para el aislamiento de ARN después de 24, 48, 72 o 96 horas. La exposición de 24 horas a la zebularina sola no proporcionó inducción de IDO1. Después de 96 horas se detectó un pequeño incremento en la inducción de IDO1 por zebularina. La inducción de IDO1 por el interferón gamma solo fue fuerte después de 24 horas, pero el efecto no se mantuvo y disminuyó rápidamente. En contraste, cuando se combinó con zebularina mantenida durante todo el periodo, el efecto se mantuvo a los días 2 y 3, aunque a un nivel reducido.

Ejemplo 6. Cinética de la expresión de IDO1 después de la exposición al interferón gamma durante 24 horas después de diferentes tiempos de preexposición a zebularina

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. La Figura 6 demuestra la cinética del efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina e interferón gamma. En el panel A se demuestra por la PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) un bajo efecto de zebularina después de cuatro días. El interferón gamma solo administrado después de 3 días, 24 horas antes de la cosecha da una banda fuerte y cuando se añade interferón gamma después de 3 días, 24 horas antes de la cosecha de células THP-1 expuestas a zebularina, da un efecto más fuerte, demostrando un efecto sinérgico también cuando la zebularina precede al interferón con 3 días. En el panel B, las células THP-1 recibieron zebularina sola durante 5 días y se detectó una banda débil. El interferón gamma solo dado después de 3 días y lavado 24 horas más tarde, mostró una banda débil cuando se probó 24 horas después de la eliminación del interferón. Esto está de acuerdo con los resultados presentados en la figura 5. La combinación de zebularina desde el inicio y el interferón gamma dado durante 24 horas después de tres días, dio como resultado un alto nivel de expresión sostenido. En el panel C, las células THP-1 fueron expuestas a zebularina durante 6 días y el interferón gamma se administró durante 24 horas después de cuatro días y las células se cosecharon después de un total de 6 días. De nuevo, casi no se detectó inducción de IDO1 por el interferón gamma solo, pero con la combinación se observó una fuerte expresión de IDO1. En el panel D y E, las células THP-1 fueron expuestas a zebularina durante 7 días y a interferón gamma durante 24 horas, bien después de tres días (panel D) o después de cuatro días (panel E). Una fuerte expresión IDO1 mantenida por la combinación se ilustra en el panel D y E. Como un control de ARN se ha utilizado HPRT.

Ejemplo 7. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina e interferón A

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 μ M de zebularina (Berry & Associates, Inc. EE.UU.) solo, o al interferón A (interferón alfa, IFN-A, Sigma) solo a dos concentraciones diferentes, 2,5 y 25 ng/ml (Figura 7). Las células también fueron expuestas a 100 μ M de zebularina en combinación con IFN-A en las mismas dos concentraciones. La zebularina estuvo presente durante toda la incubación, mientras que se añadió IFN-A después de 96 h y se aisló el ARN después de 120 h. La suma de las expresiones de IDO1 inducidas por zebularina sola e IFN-A solo es de 3,1 y 4,7, respectivamente, para las dosis más bajas y más altas de IFN-a, pero para el tratamiento combinado 6,0 y 16,1 a los dos niveles de dosis de IFN-A. Esto demuestra la inducción sinérgica de la expresión de IDO1 por las dos sustancias.

Ejemplo 8. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma e interferón A

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 μ M de zebularina (Berry & Associates, Inc. USA), o solo a interferón alfa (IFN-A, Sigma) de 2,5 ng/ml solo o a 50 μ g/ml de interferón gamma (IFN-g) solo, y a ambos IFN-g e IFN-A, o finalmente a una combinación de las tres sustancias (Figura 8). El tratamiento combinado con IFN-g e IFN-A se realizó añadiendo IFN-g al medio en el instante 0 y reemplazando este medio a las 72 h por medio que contenía IFN-A y a las 96 h reemplazando este medio con medio sin aditivos. El tratamiento con una combinación de las tres sustancias se realizó mediante la inclusión de zebularina y IFN-g en medio en el intervalo 0-72 h, reemplazándolo con medio que contenía IFN-A y zebularina, y después de otras 24 h este medio fue reemplazado por medio que contenía zebularina sola. Los tratamientos con sustancias singulares se realizaron en los mismos intervalos y al final del intervalo se substituyó el medio por medio sin aditivos. La combinación de las tres sustancias induce un fuerte efecto sinérgico sobre la expresión de IDO1. El fuerte efecto sinérgico se observa 48 h después de la eliminación de IFN-g y 24 h después de la eliminación de IFN-A, lo que indica un efecto sinérgico sostenido en la expresión de IDO1.

Ejemplo 9. Efecto sinérgico sobre la expresión de IDO por zebularina, interferón gamma y TGF-beta

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 μ M de zebularina (Berry & Associates, Inc. EE.UU.) solo o hasta 20 ng/ml de factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF-b1) (Sigma) solo, o a 100 μ g/ml de interferón gamma (IFN-g) o a una combinación de IFN-g y TGF- B1 o a una combinación de zebularina e IFN-g, o a una combinación de las tres sustancias, zebularina, IFN-g y TGF-b1. El tratamiento de combinación con IFN-g y TGF-b1 se realizó añadiendo IFN-g al medio 72 h después del inicio del cultivo y reemplazando el medio 24 h después con un medio que contenía TGF-b1. El tratamiento combinado con zebularina e IFN-g se realizó incluyendo zebularina en medio desde el inicio del cultivo, después de 72 h añadiendo IFN-g y 24 h después reemplazando el medio con medio que contenía zebularina. El tratamiento combinado con las tres sustancias se realizó añadiendo zebularina desde el inicio del cultivo, añadiendo IFN-g después de 72 h, y después de otras 24 h reemplazando el medio con medio que contenía zebularina y TGF-b1. Los tratamientos con sustancias singulares se realizaron en los mismos intervalos y al final del intervalo se substituyó el medio por medio sin aditivos. La combinación de las tres sustancias induce un fuerte efecto sinérgico sobre la expresión de IDO1, significativamente más fuerte que la zebularina y el IFN-g juntos o cada uno de ellos (Figura 9). Por el contrario, TGF-b1, en ausencia de zebularina, reduce el efecto de IFN-g. El fuerte efecto sinérgico se observa 24 h después de la eliminación de IFN-g, lo que indica un efecto sinérgico sostenido en la expresión de IDO1.

Ejemplo 10. Efecto sinérgico sostenido sobre la expresión de IDO por zebularina y una exposición de 24h al interferón gamma

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 μ M de zebularina (Berry & Associates, Inc. USA) solo durante todo el periodo de cultivo, o hasta 200 μ l/ml de interferón gamma (IFN-g, Sigma) solo durante 24 h (día 4 de cultivo) después de lo cual el medio de cultivo se reemplazó con medio sin aditivos, o a una combinación de 100 μ M de zebularina durante todo el periodo de cultivo e IFN-g durante 24 h al día 4 de cultivo, después de lo cual el medio de cultivo se reemplazó por medio que contenía zebularina sola (Figura 10). El ARN se aisló después de 10, 12 ó 14 días de cultivo y se analizó la expresión de IDO1. Aunque la expresión inducida por la exposición al interferón gamma de 24 h solo es inicialmente fuerte, es mínima en los puntos de tiempo estudiados. Por el contrario, el efecto sinérgico cuando se combinó con zebularina se mantuvo durante al menos 10 días después de la eliminación del interferón gamma, siendo demostrable todavía en el día 14. Esto demuestra que la IDO1 inducida sinérgicamente se mantiene durante mucho tiempo incluso cuando la exposición al interferón gamma es relativamente corta y los propios efectos del interferón gamma han desaparecido desde hace mucho tiempo.

Ejemplo 11. Efecto sinérgico sostenido sobre la expresión deIDO por zebularina, interferón gamma e interferón A

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 µM de zebularina (Berry & Associates, Inc. EE.UU.) solo durante todo el periodo de cultivo, o a 100 µl/ml de interferón gamma (IFN-g, Sigma) solo durante 24 h (día 4 de cultivo) o al interferón A (IFN-A, Sigma) después de cuyo cultivo, el medio se sustituyó por un medio sin aditivos. Otras muestras de células se expusieron a una combinación de 100 µM de zebularina durante todo el periodo de cultivo de 168 h y a IFN-g e IFN-A durante 24 h al día 4 de cultivo, después de lo cual el medio de cultivo se reemplazó por medio que contenía zebularina sola (Figura 11). El ARN se aisló después de 168 h de cultivo y se analizó la expresión deIDO1. Aunque la expresión inducida por la exposición de 24 h de IFN-g o IFN-A sola es inicialmente fuerte, es mínima en los puntos de tiempo estudiados. En contraste, el efecto sinérgico cuando se combinó con zebularina se mantuvo durante 72 días después de la eliminación del IFN-g e IFN-A. Esto demuestra que la expresión fuerte deIDO1 inducida sinérgicamente se mantiene durante mucho tiempo incluso cuando la exposición a IFN-g e IFN-A es relativamente corta y los propios efectos de IFN-g e IFN-A han desaparecido desde hace mucho tiempo.

Ejemplo 12. La expresión deIDO sinérgica sostenida por tratamiento combinado con zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF-beta

Los materiales y métodos utilizados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 anterior. Las células de la línea de células monocíticas humanas THP-1 no estaban expuestas (control de medio), expuestas a 100 µM de zebularina (Berry & Associates, Inc. USA) solo durante todo el periodo de cultivo, o bien a 100 µg/ml de interferón gamma (IFN-g, Sigma) solo o a 25 ng/ml de interferón A solo, o a 20 ng/ml de TGF-beta (TGG-b, Sigma) solo durante 24 h (día 4 de cultivo), después de lo cual se reemplazó el medio de cultivo por medio sin aditivos. Otras muestras de células se expusieron a una combinación de 100 µM de zebularina durante todo el periodo de cultivo de 168 h y al IFN-g, IFN-A y TGF-b durante 24 h al día 4 de cultivo, después de lo cual el medio de cultivo fue reemplazado por medio que contenía sólo zebularina (Figura 12). El ARN se aisló después de 168 h de cultivo y se analizó la expresión deIDO1. Aunque la expresión inducida por la exposición de 24 h de IFN-g o IFN-A sola es inicialmente fuerte, es mínima en los puntos de tiempo estudiados. En contraste, el efecto sinérgico de las 4 sustancias cuando se combinaron con zebularina se mantuvo durante 72 días después de la eliminación de IFN-g e IFN-A. Esto demuestra que la expresión fuerte deIDO1 inducida sinérgicamente se mantiene durante mucho tiempo incluso cuando la exposición a IFN-g e IFN-A y TGF-b es relativamente corta y los propios efectos de IFN-g e IFN-A han desaparecido desde hace mucho tiempo .

Ejemplo 13. Expresión mejorada deIDO en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de rata después de la exposición a zebularina *in vitro* y una función supresora mejorada, que inhibe la reactividad inmune de los linfocitos del bazo mezclados

Se cosecharon células de la médula ósea de los fémures de ratas y se cultivaron mediante técnicas *in vitro* en presencia de las citoquinas IL-4 (5 ng/ml) y GM-CSF (5 ng/ml) para apoyar la diferenciación en células dendríticas (BMDC). El día 7 del cultivo, el medio fue reemplazado por medio que contenía sólo GM-CSF. Algunas de las BMDC fueron expuestas a zebularina 50 µM durante los días 5-10 de cultivo y las células de control se quedaron sin este tratamiento adicional. La expresión deIDO1 por células tratadas con control y zebularina se analizó (Figura 13a). El resultado demuestra que la exposición a zebularina aumenta la expresión deIDO1 por encima del nivel expresado por las BMDC de control inmaduro. Los mismos dos tipos de células también se ensayaron en cuanto a su capacidad para suprimir la respuesta inmune proliferativa de las células T CD4+ y CD8+ del bazo, respectivamente, de la misma cepa endocrina de ratas Fischer 344 tras la estimulación con el estimulador fuerte anti-CD3 unido al fondo de los pozos del cultivo. La proliferación se analizó en FACS por la técnica CFSE y los anticuerpos monoclonales que reconocen a los creadores de CD4 y CD8. La adición de BMDC tratadas con zebularina en una proporción de 1:30 a cultivos de células de bazo demostró un efecto supresor significativamente más fuerte frente a la respuesta proliferativa que las BMDC de control ensayadas en paralelo, tanto para células T CD4+ como para CD8+ (Figura 13b). Esto demuestra que la exposición de BMDC a zebularina *in vitro* está induciendo una expresión más fuerte deIDO1, y que estos BMDC también tienen un efecto supresor más fuerte en la respuesta de células T que las BMDC no expuestas a zebularina.

Ejemplo 14. La zebularina, inoculada diariamente durante 7 días intraperitonealmente en ratas adultas, induce una expresión aumentada deIDO en el bazo y una reactividad de células T de bazo suprimida frente a la estimulación inmune *in vitro*

Un grupo de ratas Wistar recibió inoculaciones diarias intraperitoneales de zebularina (225 mg/kg/día) durante 7 días y un grupo control paralelo recibió inoculaciones diarias por vía intraperitoneal de PBS. Se aisló ARN de los bazos y se analizó la expresión deIDO1 mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa. Los resultados demuestran que el tratamiento sistémico con zebularina *in vivo* induce una mayor expresión deIDO1 en células de bazo (Figura 14a). Además, se recogieron células de bazo de ambos grupos después de la última dosis de zebularina y se ensayó su reactividad proliferativa para células T frente a la estimulación policlonal con anticuerpos anti-CD3. La proliferación se analizó en FACS por la técnica CFSE y anticuerpos monoclonales anti-CD4 y CD8 de rata (Figura 14b). La

respuesta proliferativa calculada fue aproximadamente tres veces menor con células de ratas tratadas con zebularina en comparación con células de ratas control tratadas con PBS. Esto demuestra que el tratamiento con zebularina induce una expresión aumentada de IDO1 en el bazo e inhibe la respuesta inmune de los linfocitos T del bazo.

5 **Ejemplo 15. Supresión del rechazo inmunológico de los islotes pancreáticos alotransplantados por inoculaciones intraperitoneales diarias de zebularina durante 14 días.**

Se aislaron islotes pancreáticos del páncreas de ratas Lewis mediante una técnica establecida. Después del cultivo a 37°C durante la noche, se implantaron 500-1200 islotes debajo de la cápsula renal de ratas Fischer 344 adultas (11-14 semanas de edad) que fueron confirmadas hiperglucémicas (glucosa en sangre ≥ 20 mMol/L) después de haber recibido una dosis única de 35-40 mg/kg intraperitonealmente de estreptozotocina, que es selectivamente tóxico para las células beta productoras de insulina presentes en los islotes pancreáticos. La glucosa en sangre disminuyó rápidamente a niveles normales como signo del trasplante exitoso de los islotes productores de insulina. Un grupo de estas ratas se dejó sin tratamiento adicional como controles, mientras que otro grupo se trató con inoculaciones diarias intraperitoneales de zebularina (225 mg/kg) durante 14 días comenzando 6-8 días después del trasplante en un momento en que las ratas tenían un azúcar en sangre normal por debajo de 11,1 mMol/l. Los islotes alotransplantados fueron rechazados inmunológicamente a los 9-14 días en 6/8 ratas de control (Figura 15). Las dos ratas excepcionales que mantuvieron un azúcar en sangre normal fueron sometidas a nefrectomía 40 y 43 días después del trasplante para comprobar si su glucosa en sangre normal era el resultado de una supervivencia sostenida inesperada de los islotes injertados (en cuyo caso su azúcar en la sangre debería aumentar rápidamente al retirarse el injerto) o se debió a la recuperación de algunos islotes pancreáticos dañados por la estreptozotocina (en cuyo caso su azúcar en la sangre debía permanecer normal a pesar de la eliminación del injerto). Dado que la glucemia permaneció normal durante ≥ 7 días después de la nefrectomía de las dos ratas de control, se concluyó que después del daño inicial causado por la estreptozotocina en estas 2 ratas, algunos islotes pancreáticos se habían recuperado para producir cantidades suficientes de insulina para mantener un nivel de azúcar en sangre normal. Veintidós días después del trasplante sólo 1/10 de las ratas tratadas con zebularina habían rechazado el injerto como se indica por un azúcar en sangre normal en todas las ratas, excepto esta única, al completarse el tratamiento de 20-22 días después del trasplante y en todas las 7 analizadas ≥ 1 semana después de que se detuviera el tratamiento con zebularina (Figura 16). Esto demuestra una capacidad inmunosupresora o de inducción tolerante de la sustancia inductora de IDO1 zebularina.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), para su uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad autoinmune o rechazo inmune de trasplantes o células terapéuticamente modificadas por genes, en el que los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en donde uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende:
- (i) zebularina e interferón gamma;
- (ii) zebularina, interferón gamma e interferón A;
- (iii) zebularina, interferón gamma y ácido valproico;
- (iv) zebularina, interferón gamma y TGF-beta; o
- (v) zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF-beta.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende zebularina e interferón A.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende zebularina y gonadotropina coriónica humana.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición comprende además un tampón, excipiente, diluyente, disolvente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se usa para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aclorhidria, leucoencefalitis hemorrágica aguda, enfermedad de Addison, alopecia areata, anemia perniciosa, enfermedad de membrana basal anti-glomerular, síndrome antifosfolípido, anemia aplásica, alergia atópica, gastritis atrófica autoinmune, pérdida auditiva autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hipoparatiroidismo autoinmune, hipofisitis autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, oreopatía autoinmune, orquitis autoinmune, poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-ectodérmica-distrofia, síndrome autoinmune poliglandular Tipo II, síndrome de Behcet, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, colangitis esclerosante, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tiroiditis linfocítica crónica, síndrome de Churg-Strauss, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus (dependiente de insulina), esclerosis cerebral difusa de Schilder, epidermolisis bullosa adquirida, síndrome de Felty, glomerulonefritis de membrana, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Hamman-Rich, hepatitis autoinmune, hepatitis activa crónica, enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, uveítis inducida por lentes, Lichus Sclerosus et Atrophicus, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso sistémico, hepatitis lúpica, nefritis lúpica, linfopenia, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, úlcera de Mooren, síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, mielitis transversa, miocarditis, narcolepsia, neuromielitis óptica, síndrome vestibulo ocular auditor, oftalmía simpática, síndrome de opsoclono-mioclono, pancreatitis, penfigoide ampolloso, penfigo foliaceo, penfigo vulgaris, poliarteritis nodosa, policondritis recidivante, poliendocrinopatía autoinmune, polimialgia reumática, poliradiculoneuropatía, cirrosis biliar primaria, psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante, el síndrome de persona rígida, enfermedad de Still de inicio adulto, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a la insulina tipo B, síndrome uveomeningoencefálico, granulomatosis de Wegener y vitiligo.
7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se utiliza para el tratamiento de la artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, psoriasis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, arteriosclerosis, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica) o demencia.
8. Un método *ex vivo* de inducción de IDO en un cultivo celular capaz de tener IDO inducido que comprende las etapas de:
- A) proporcionar células aisladas en un medio adecuado;
- B) añadir una composición que comprende al menos dos compuestos cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción,

en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el IDO en comparación con la suma del nivel IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en el que uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, Interferón A y gonadotropina coriónica humana;

5 C) incubar dichas células aisladas con la composición; y

D) obtener un cultivo celular en el que se induce IDO.

9. Un método para inducir IDO en un cultivo celular capaz de tener IDO inducido según la reivindicación 8, en el que la composición comprende:

(i) zebularina e interferón gamma;

10 (ii) zebularina, interferón gamma e interferón A;

(iii) zebularina, interferón gamma y ácido valproico;

(iv) zebularina, interferón gamma y TGF-beta; o

(v) zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF-beta.

15 **10.** Un método para inducir IDO en un cultivo celular capaz de tener IDO inducido según la reivindicación 8, en el que la composición comprende zebularina e interferón A o zebularina y gonadotropina coriónica humana.

11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno o enfermedad autoinmune o que sufre de rechazo inmune de órganos, tejidos, células normales o células terapéuticamente modificadas por genes, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición se administra a un paciente y en la que el tratamiento induce IDO.

20 **12.** Una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en el que los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico en el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en el que uno de los al menos dos compuestos es zebularina y otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y la gonadotropina coriónica humana, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno o enfermedad autoinmune o que sufre de rechazo inmune de órganos, tejidos, células normales o células terapéuticamente modificadas por genes, en el que el tratamiento induce IDO, en el que:

25 i. Una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición se administra ex vivo a las células derivadas del mamífero tratado o de otro mamífero;

30 ii. Uno o más antígenos asociados con una afección que se está tratando se administran a las células; y

iii. Las células tratadas se transfieren al mamífero que se está tratando.

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la composición comprende:

(i) zebularina e interferón gamma;

(ii) zebularina, interferón gamma e interferón A;

35 (iii) zebularina, interferón gamma y ácido valproico;

(iv) zebularina, interferón gamma y TGF-beta; o

(v) zebularina, interferón gamma, interferón A y TGF-beta.

14. Una composición según la reivindicación 12, en la que la composición comprende zebularina e interferón A o zebularina y gonadotropina coriónica humana.

40 **15.** Un cultivo celular en el que se ha inducido IDO, comprendiendo el cultivo de células una composición que comprende al menos dos compuestos, cada uno de los cuales induce indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), en donde los al menos dos compuestos inducen IDO mediante diferentes mecanismos de acción, en donde la composición da lugar a un efecto sinérgico sobre el nivel de IDO en comparación con la suma del nivel de IDO alcanzado con cada uno de los al menos dos compuestos cuando se usan solos, en el que uno de los al menos dos compuestos es zebularina y el otro de los al menos dos compuestos se selecciona de la lista que consiste en interferón gamma, interferón A y gonadotropina coriónica humana y células aisladas en un medio.

45

Fig. 1

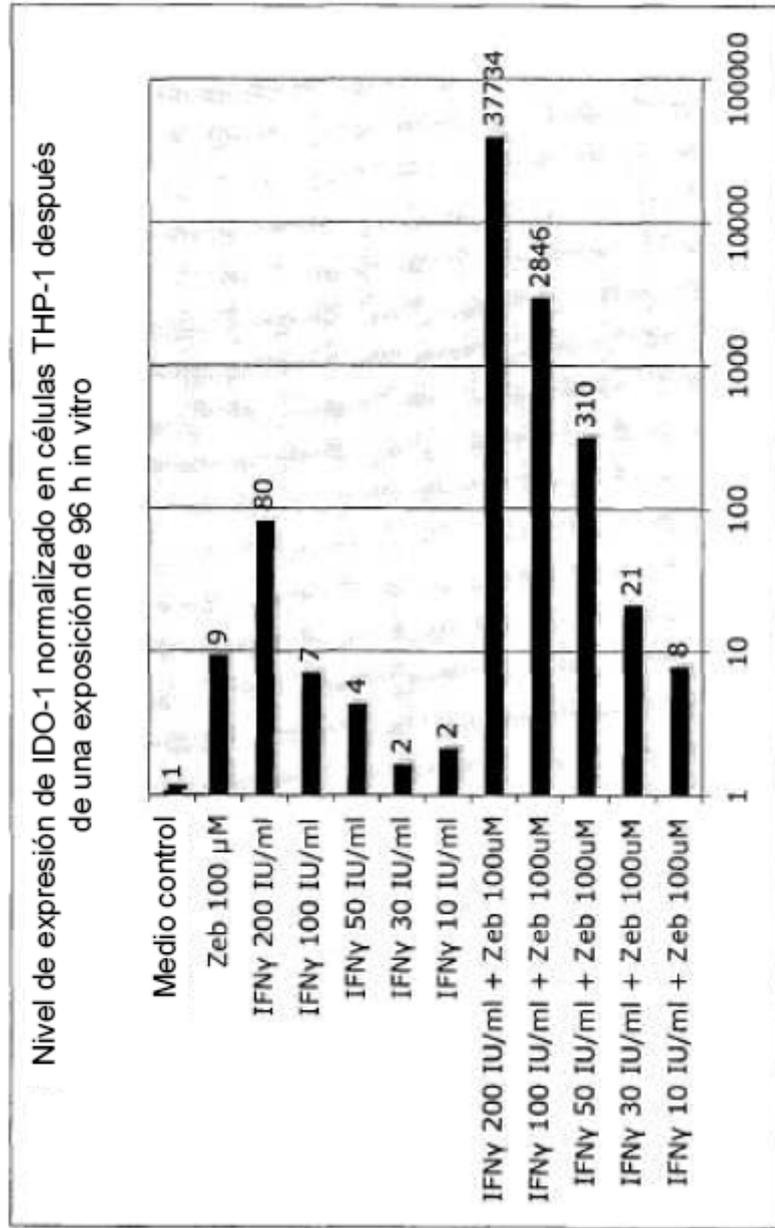


Fig. 2A

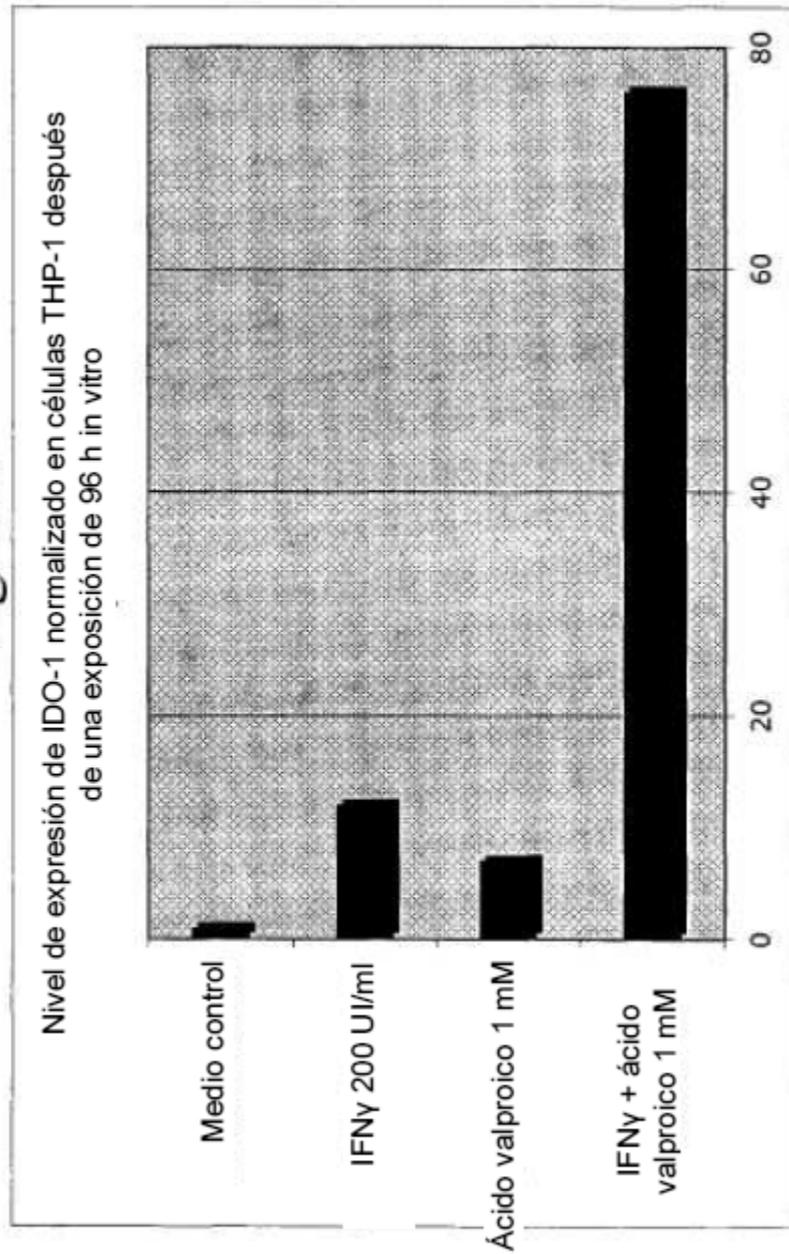


Fig. 2B

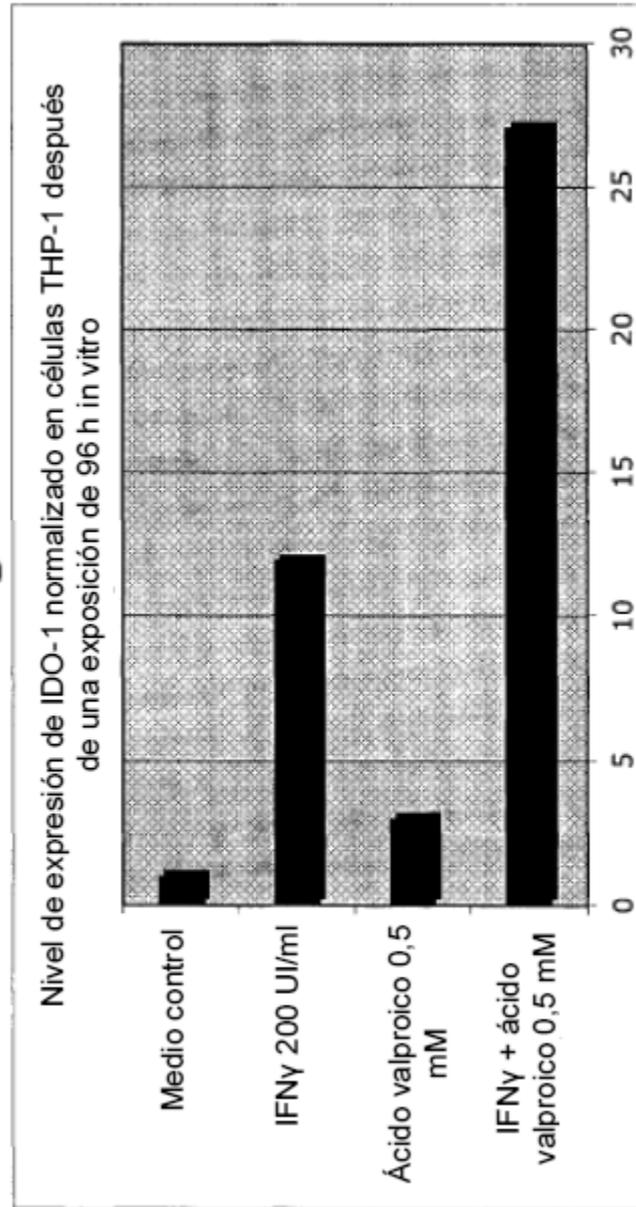


Fig. 3

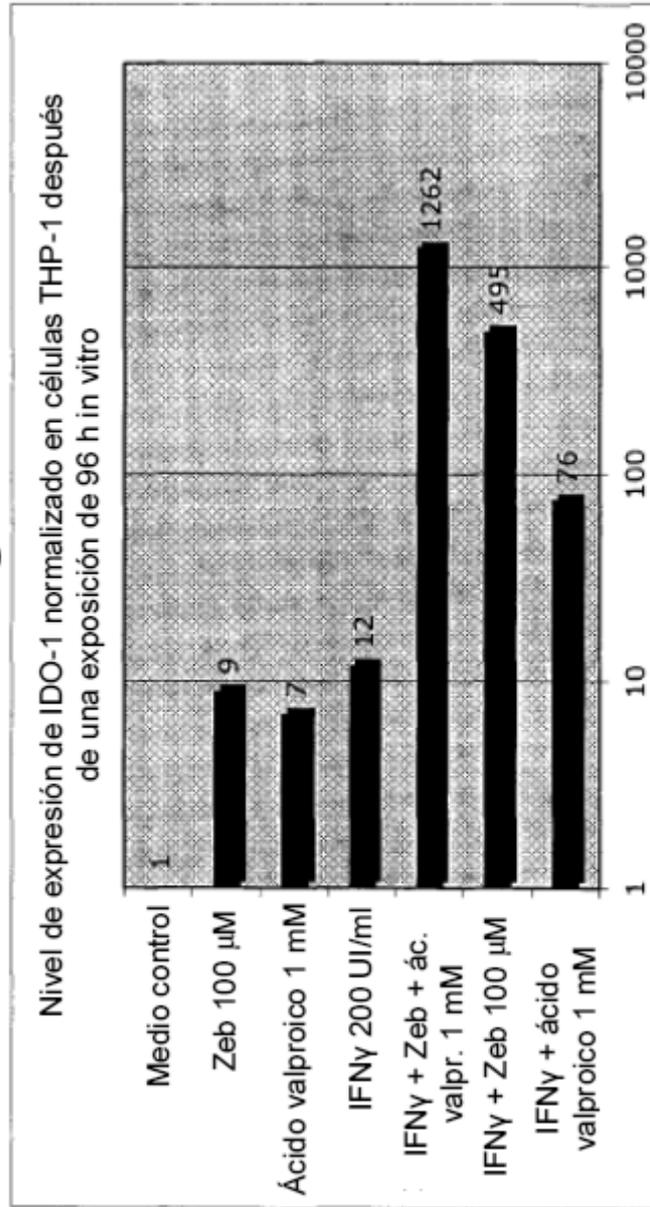


Fig. 4A

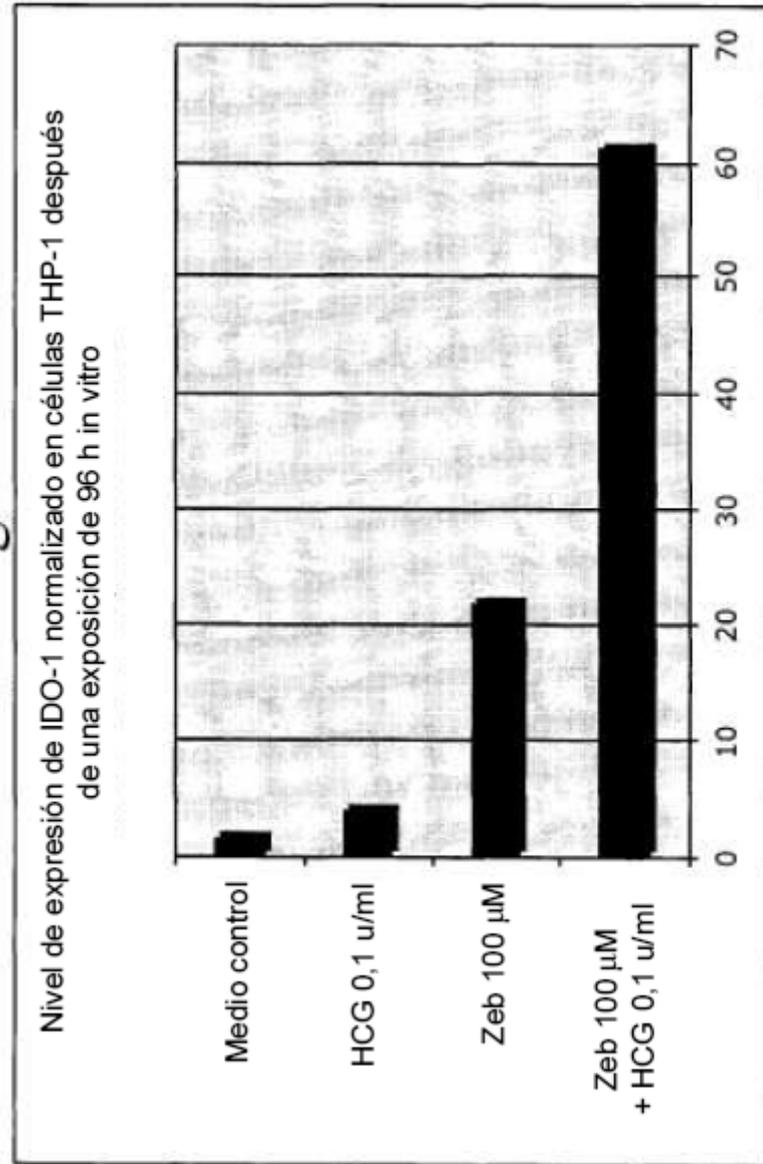


Fig. 4B

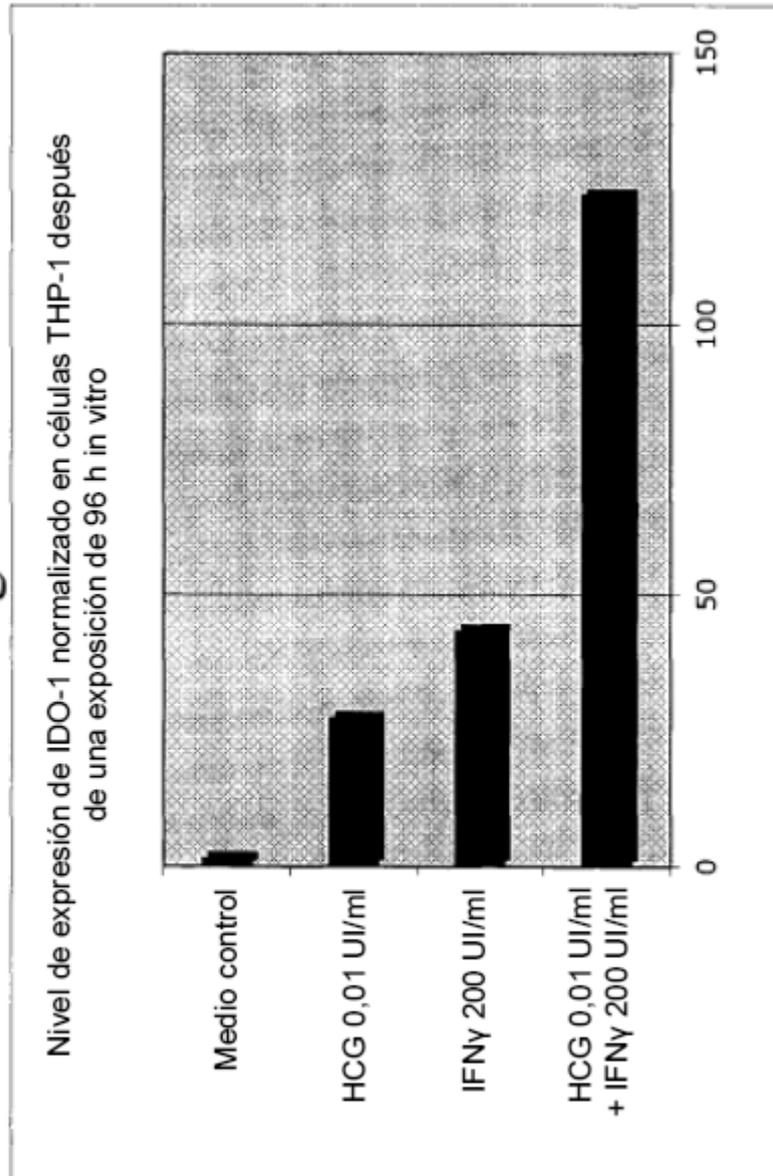
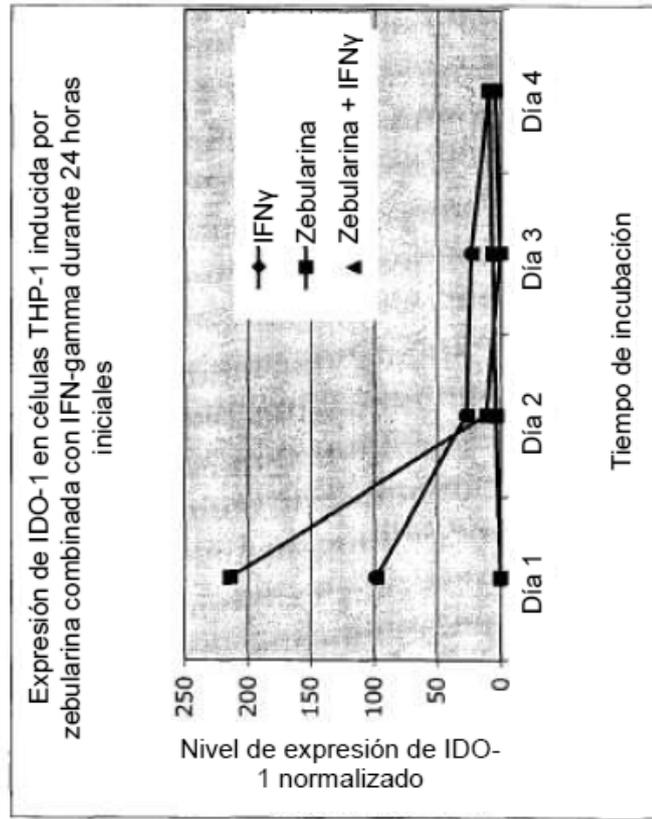
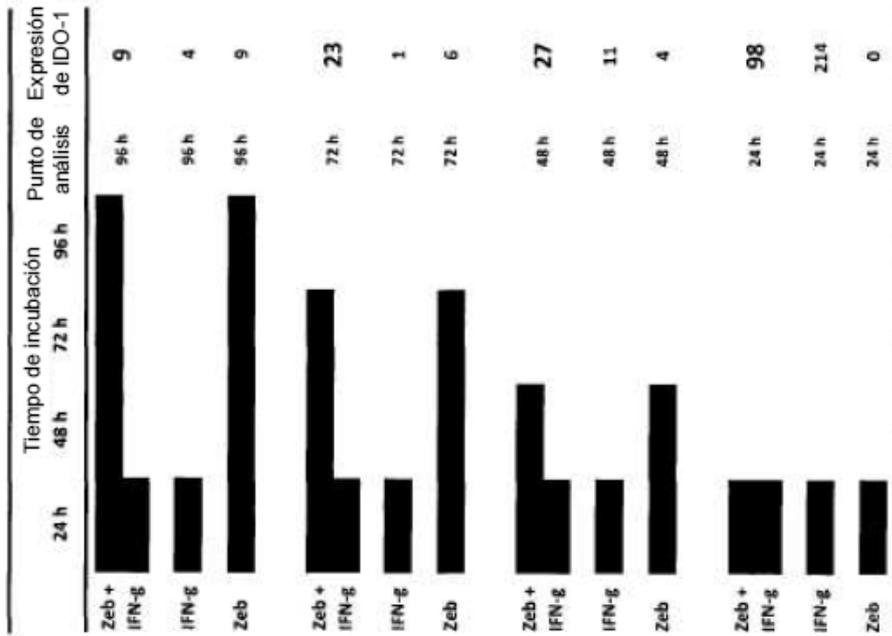


Fig. 5

Expresión deIDO-1 normalizada en células THP-1 24-96 h después de la adición de Zebularina 100 µM sola o de 200 U/ml de IFN-gamma durante 24 horas sola o combinada con Zebularina



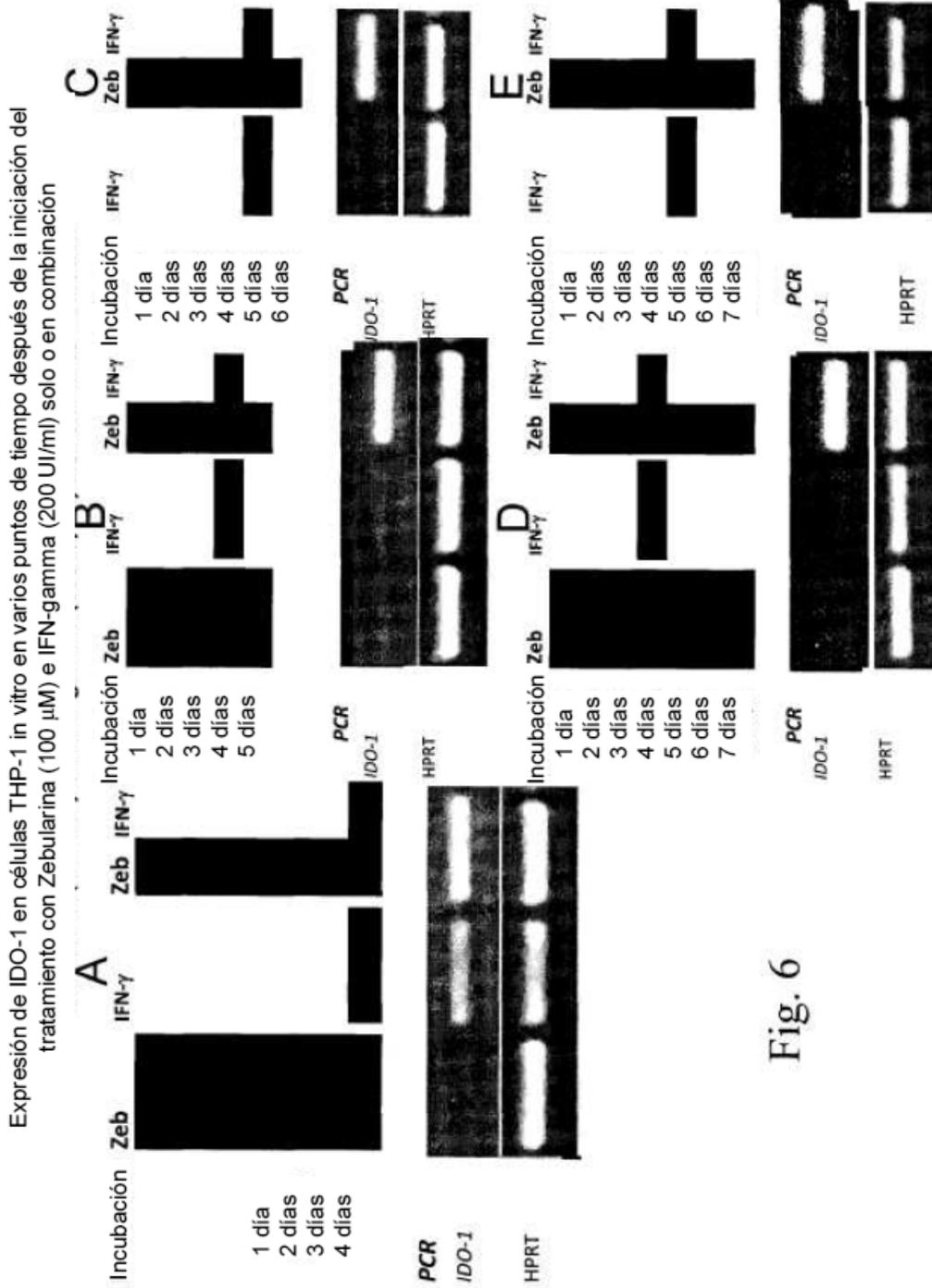


Fig. 6

Fig. 7

Expresión de IDO-1 normalizado en células THP-1 monocíticas humanas después de una exposición a zebularina 100 μ M para el periodo de cultivo entero y a IFN- α a concentraciones de 25 ó 2,5 ng/ml en el intervalo de 96-120 h como se indica. ARN aislado después de 120 h.

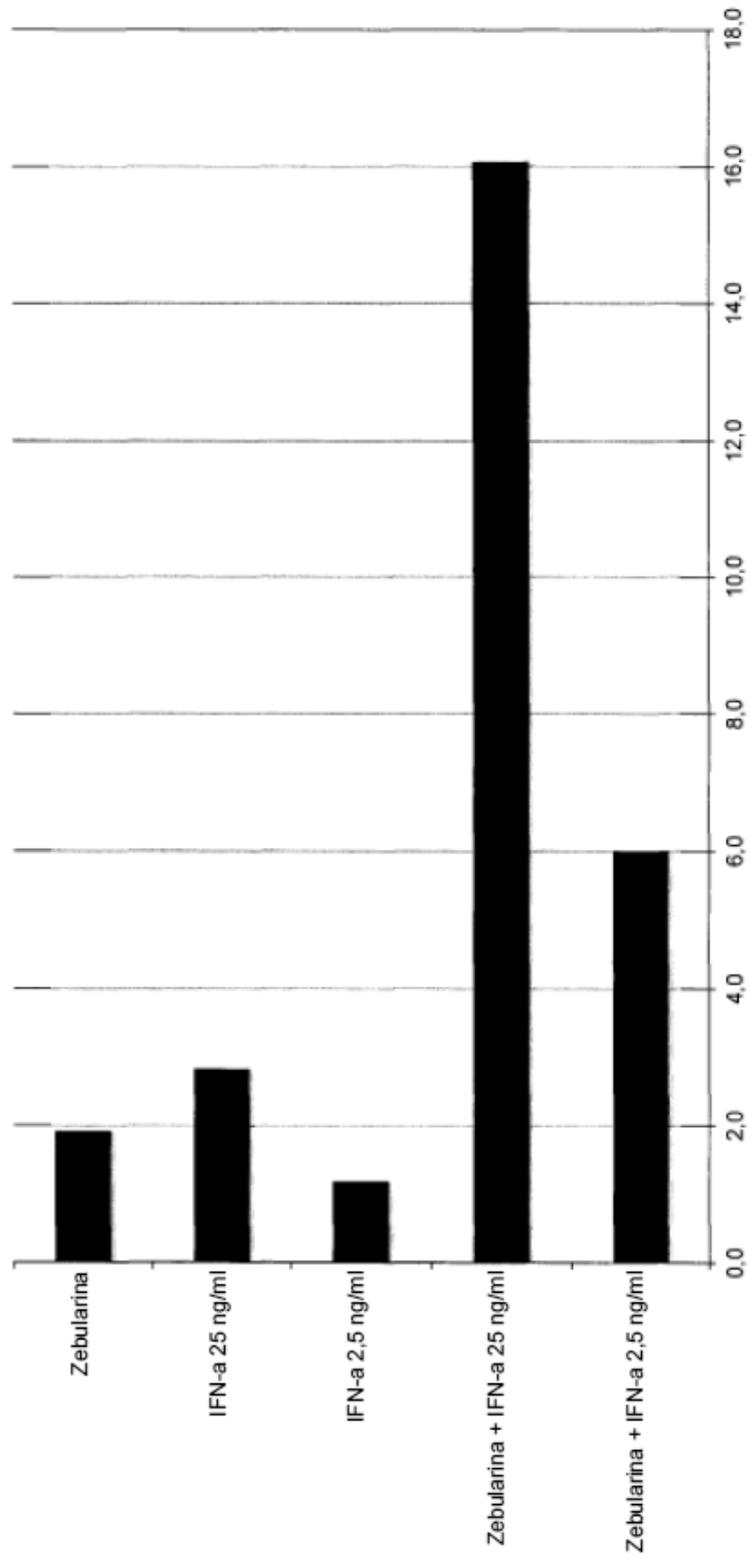


Fig. 8

Expresión de IDO-1 normalizada en células THP-1 monocíticas humanas después de una exposición a zebularina 100 μ M para el periodo de cultivo entero, a IFN- γ 50 UI/ml en el intervalo de 0-72 h, y a IFN- α 2,5 ng/ml en el intervalo de 72-96 h como se indica. ARN aislado después de 120 h.

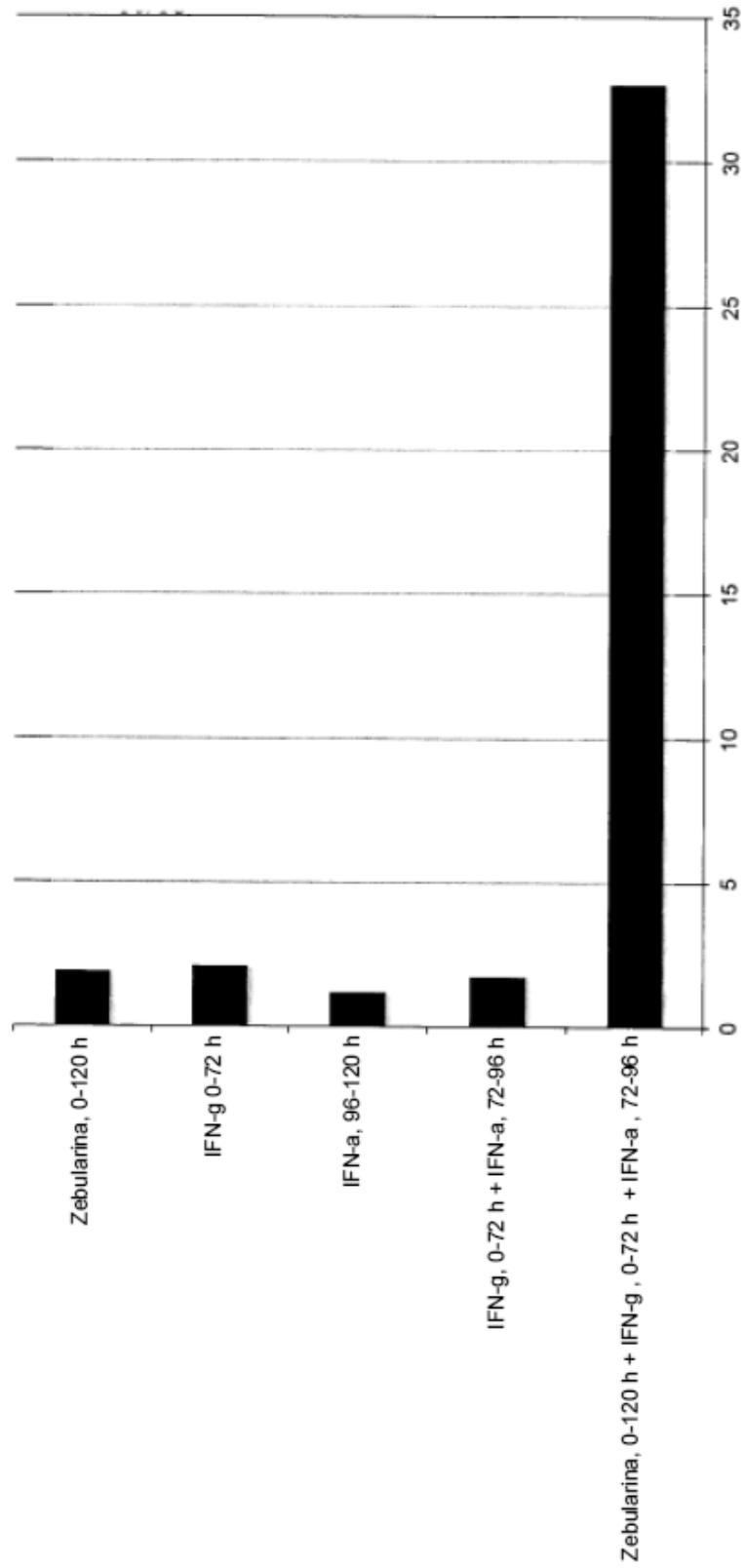


Fig. 9

Expresión de IDO-1 normalizada en células THP-1 monocíticas humanas después de 120 h de cultivo y exposición a zebularina 100 μ M para el periodo de cultivo entero, a IFN- γ 100 UI/ml en el intervalo de 72-96 h, y a 20 ng/ml de TGF- β 1 durante las últimas 24 h, 96-120 h, como se indica

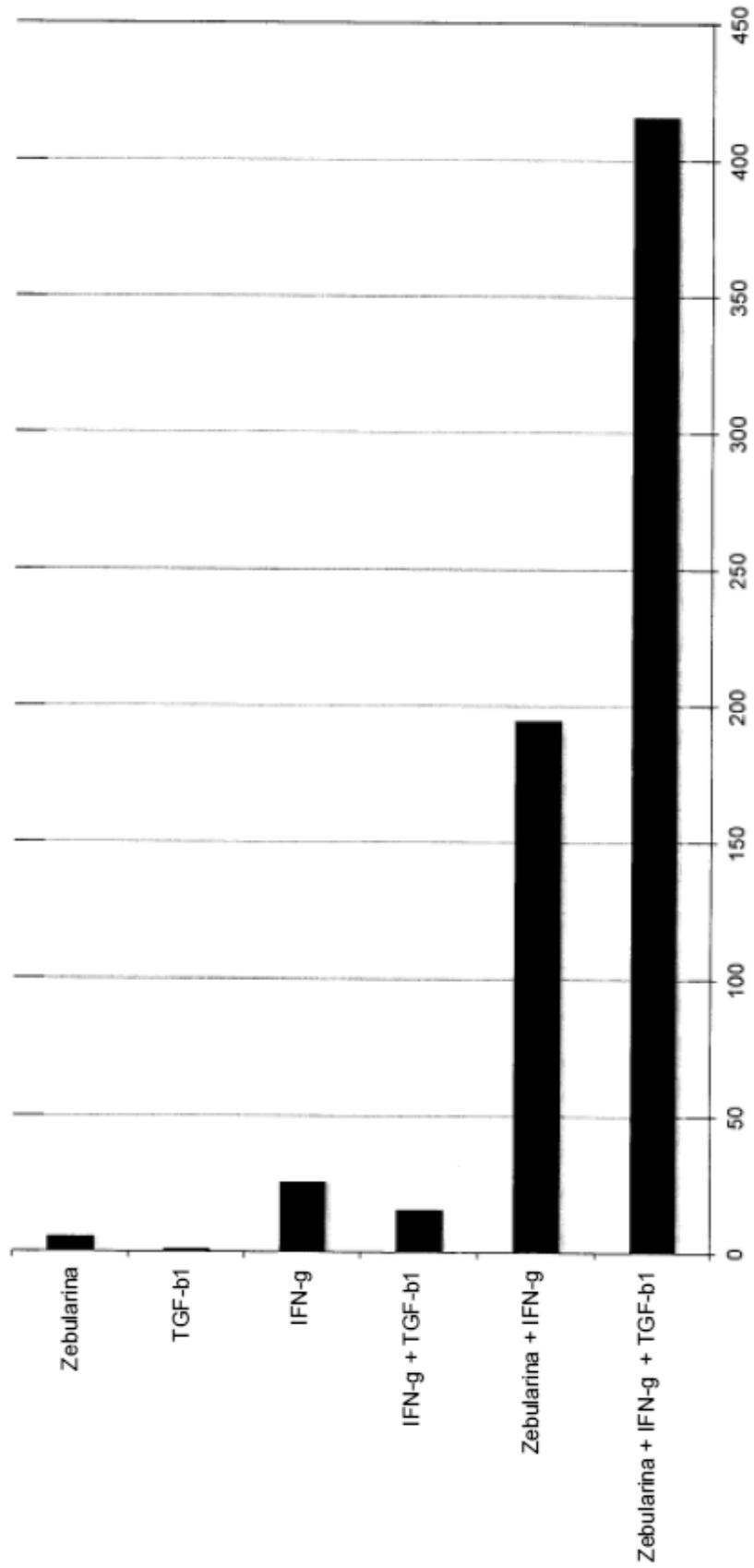


Fig. 10

Expresión deIDO-1 (relaciónIDO-1/HPRT) en células THP-1 monocíticas humanas después de la exposición a zebularina sola, IFN-g solo, ambas sustancias, o medio sin aditivos. Zebularina presente para el periodo de cultivo entero, IFN-y presente durante 24 h, añadido después de 72 h

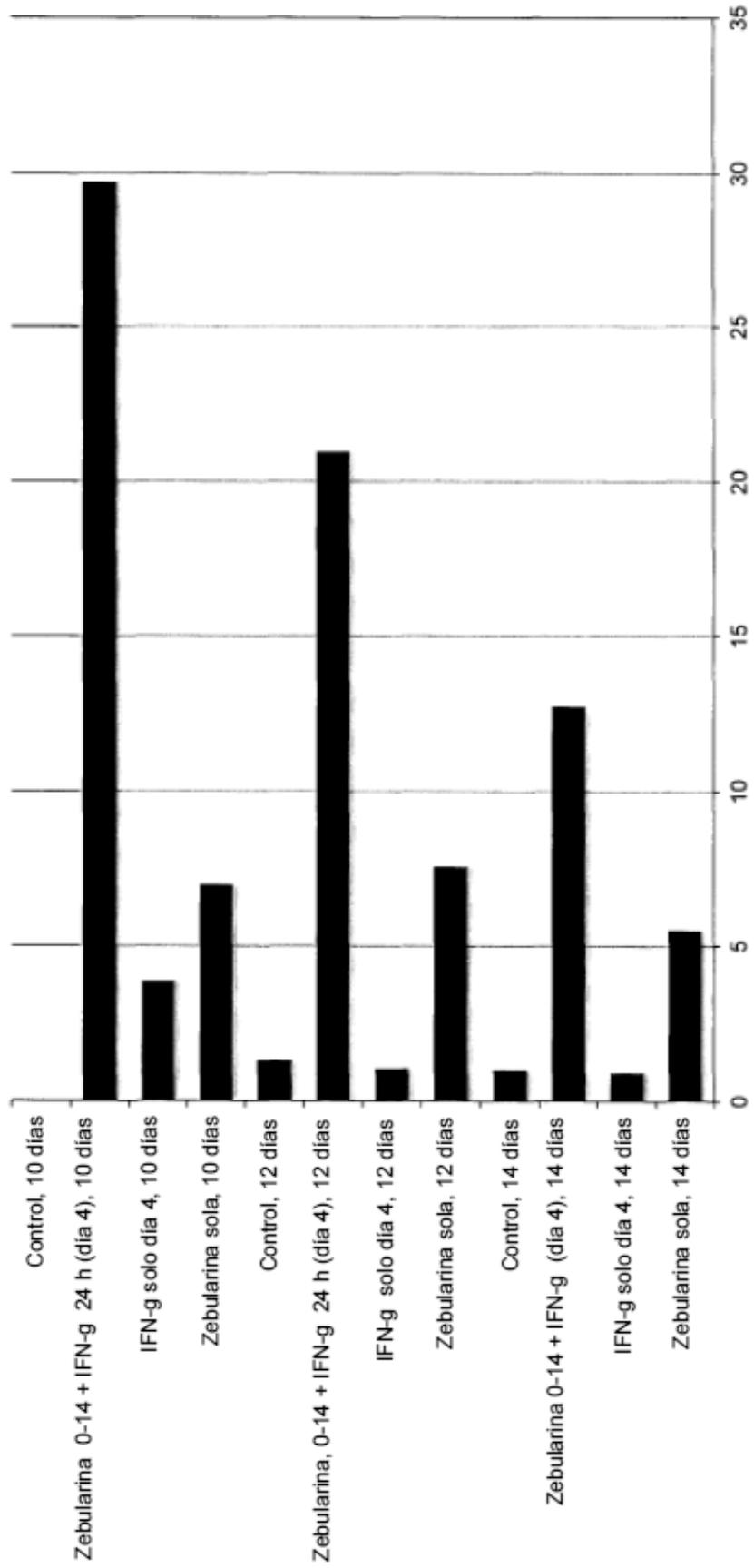


Fig. 11

Expresión deIDO-1 sostenida en células THP-1 monocíticas humanas después de 168 h de cultivo y exposición a zebularina para el periodo entero y a IFN-γ y IFN-α en el intervalo de 72-96 h

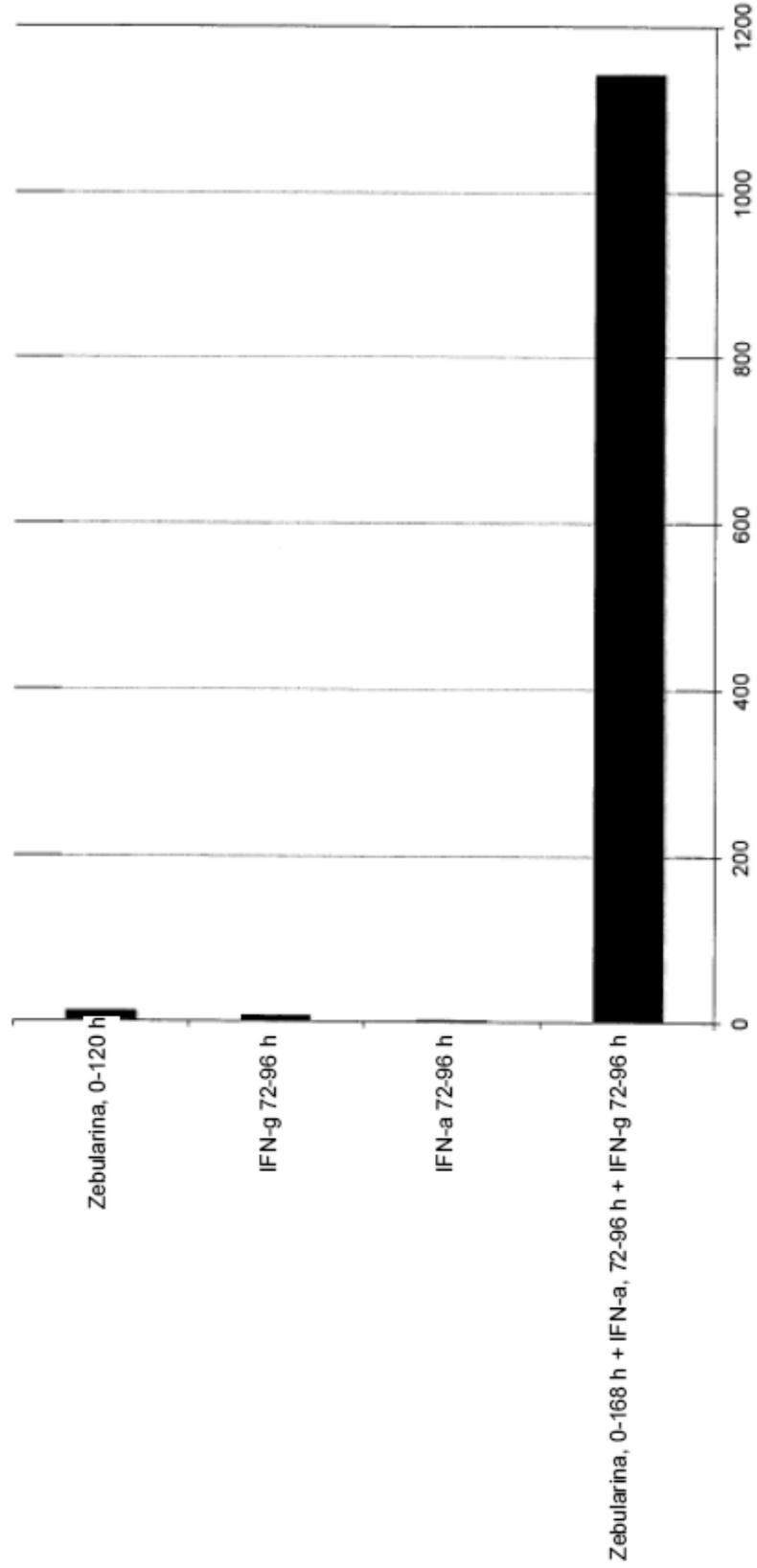


Fig. 12

Expresión deIDO-1 sostenida en células THP-1 monocíticas humanas después de 168 h de exposición a zebularina para el periodo entero y a IFN-γ, IFN-a y TGF-b en el intervalo de 72-96 h

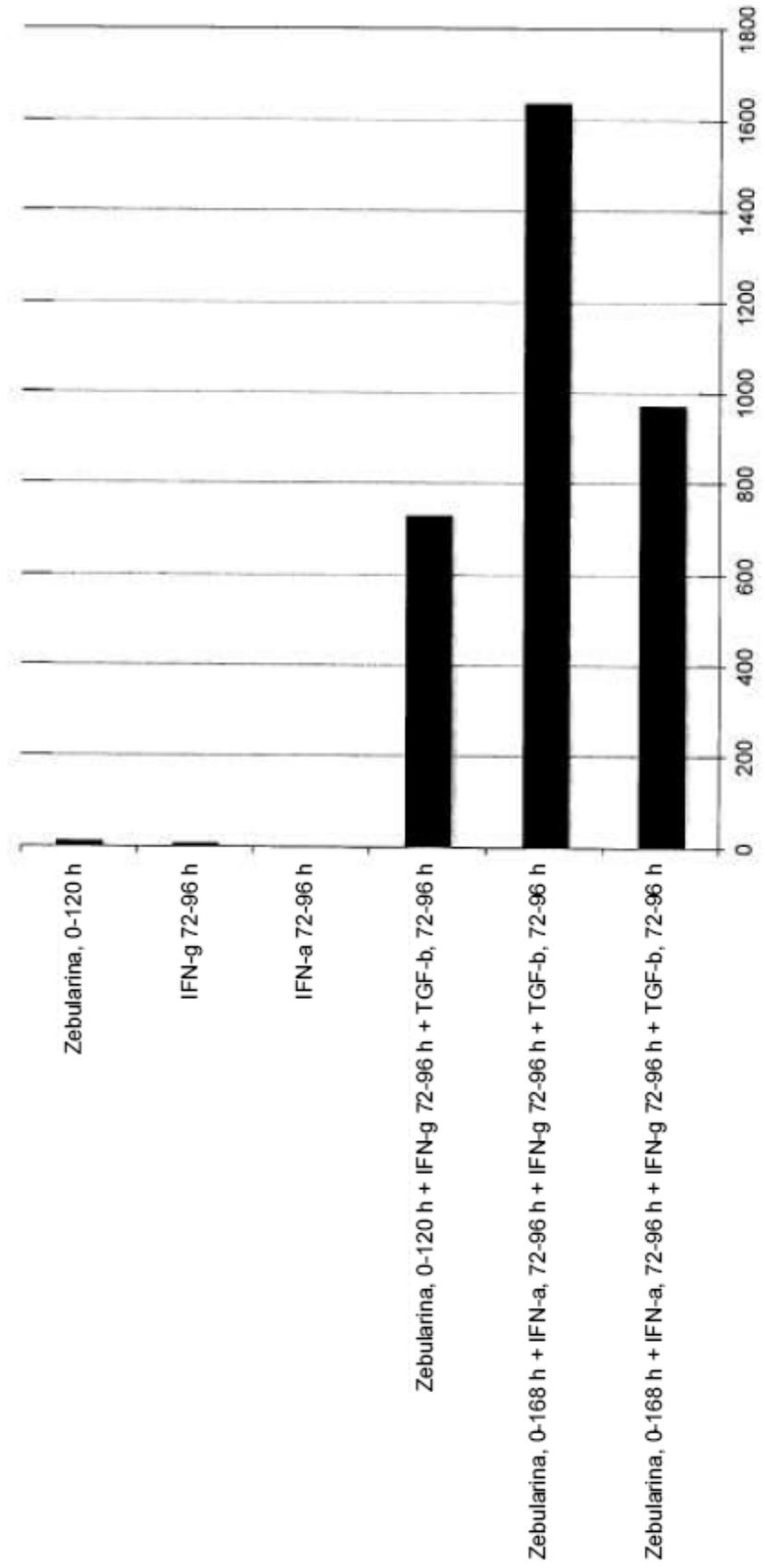


Fig. 13

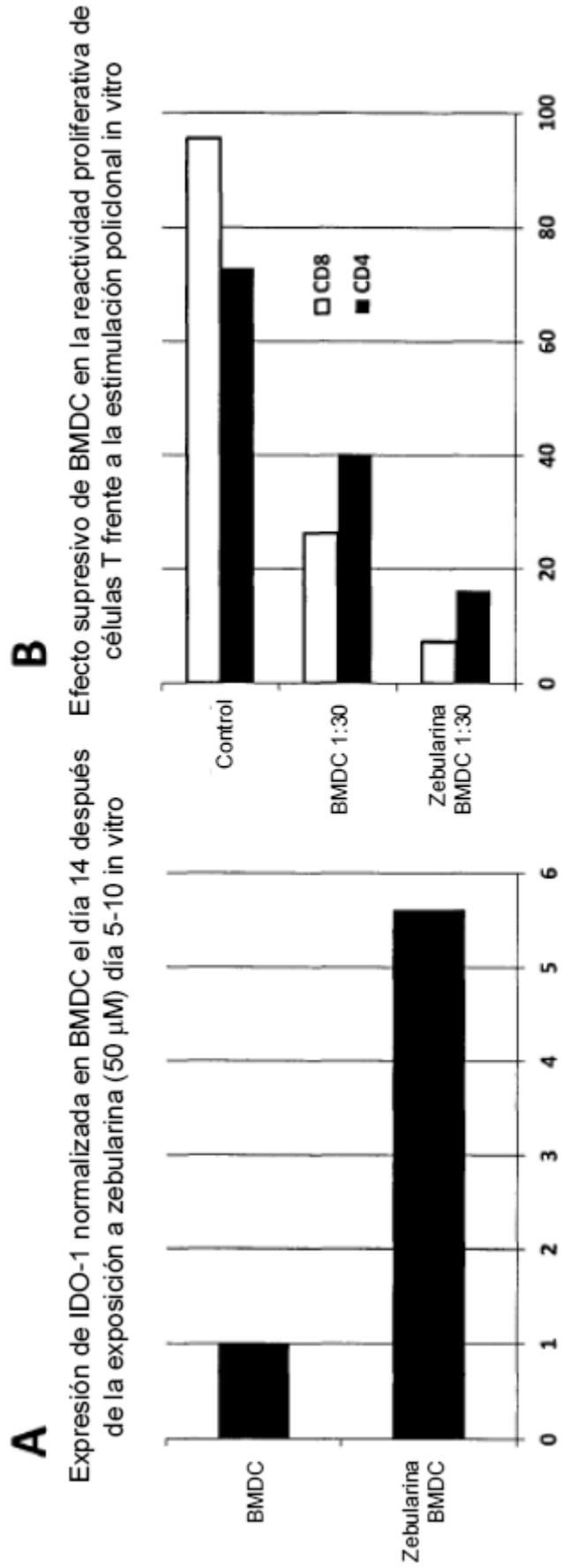


Fig. 14

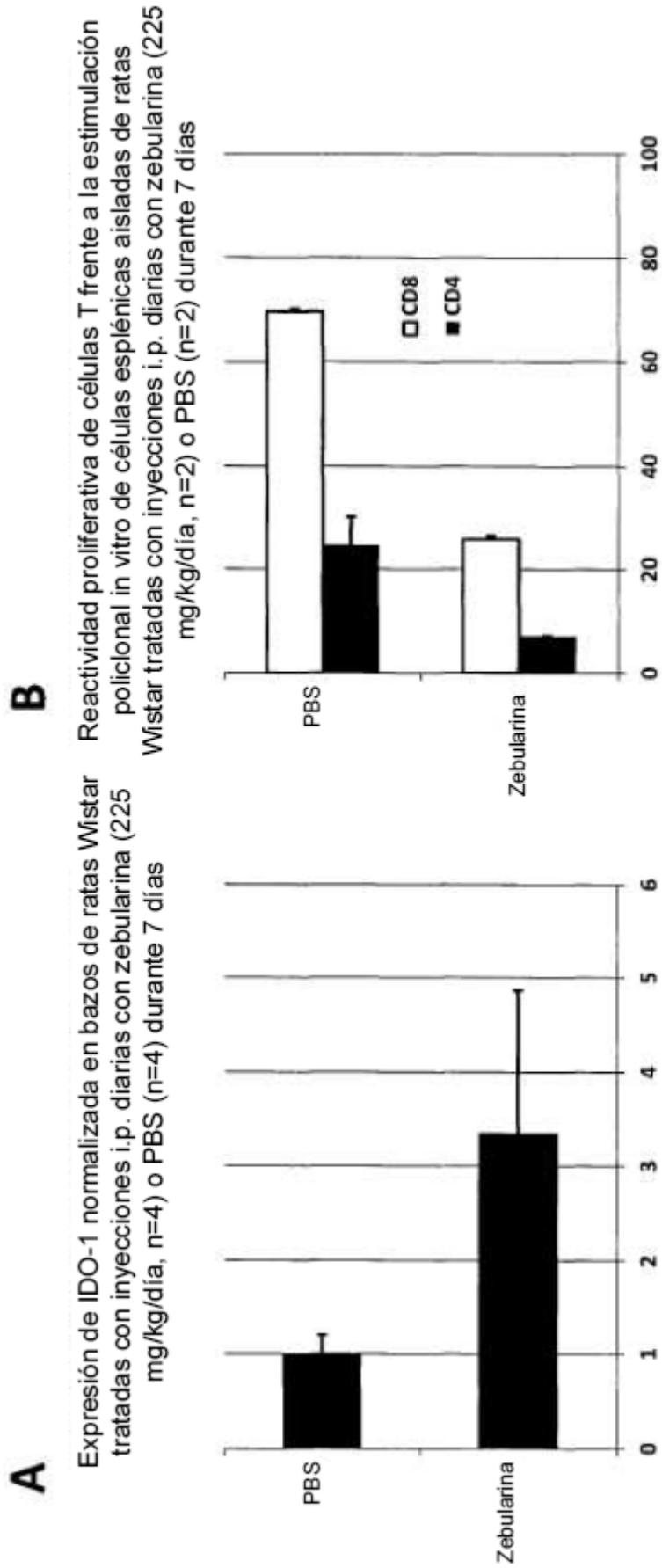
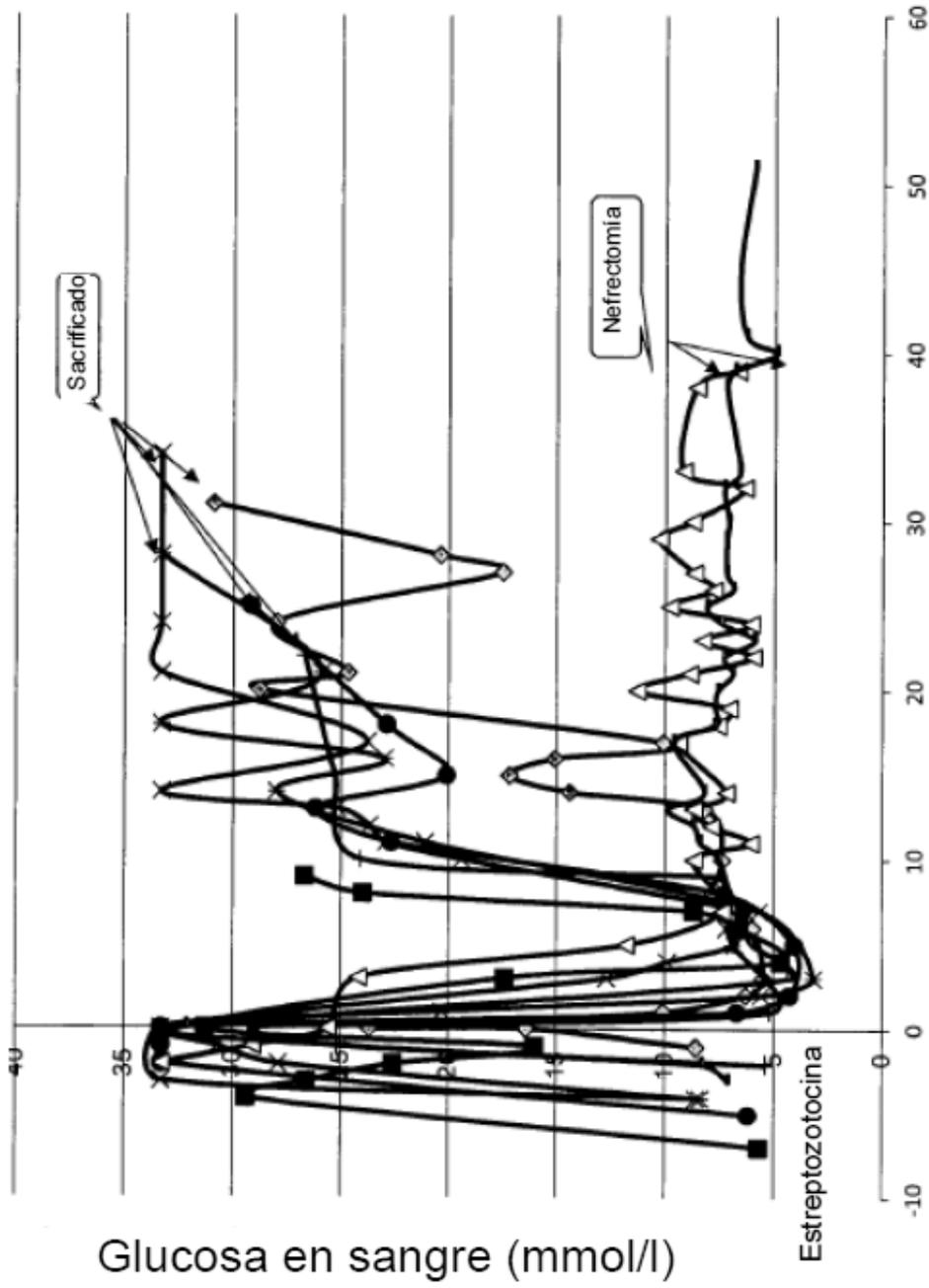


Fig. 15

Controles



Días después del trasplante

Fig. 16
Ratas tratadas con zebularina

