

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 675**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/EP2014/050167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14106666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14700238 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2941257**

54 Título: **Terapia de enfermedad mediante el uso de una preparación farmacéutica tolerogénica**

30 Prioridad:

07.01.2013 EP 13305009

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

06.03.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (25.0%);
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ (25.0%) y
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
UNIVERSITAIRE DE BESANÇON (25.0%)**

72 Inventor/es:

**PERRUCHE, SYLVAIN;
SAAS, PHILIPPE y
BONNEFOY, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 675 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

Terapia de enfermedad mediante el uso de una preparación farmacéutica tolerogénica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas para tratar enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria patológica, a métodos de tratamiento mediante el uso de tales preparaciones y a procedimientos para preparar dichas preparaciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria patológica y a procedimientos de preparación de tales preparaciones farmacéuticas.

15 Las enfermedades caracterizadas por respuestas inmunitarias patológicas incluyen un gran número de enfermedades que están asociadas con mortalidad y morbilidad significativas, y para las que no se dispone de tratamientos satisfactorios. Tales enfermedades incluyen, en particular, enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide (AR) o enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedades relacionadas con trasplante tales como enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA).

20 Estas enfermedades son resultado de un conflicto del sistema inmunitario en el cual se han alterado mecanismos tolerogénicos que controlan la homeostasis. Muchos factores pueden ser fuente de tales enfermedades, en particular factores ambientales, predisposiciones genéticas e inflamación no resuelta. De hecho, las células inmunitarias tienen, por un lado, la capacidad de detectar bacterias, virus y otros antígenos extraños y desarrollar una fuerte respuesta inmunitaria y, por otro lado, pueden detectar antígenos autoderivados y tolerarlos.

25 Además de combatir infecciones, el sistema inmunitario cumple la función de mantener el estado normal de salud y función del cuerpo. Así pues, a lo largo de la vida de un organismo, los tejidos se remodelan, eliminándose zonas de células. Esto se logra mediante un proceso denominado muerte celular programada o apoptosis, las células apoptóticas se desintegran de una manera ordenada e inofensiva y son fagocitadas. Se considera a este proceso de apoptosis particularmente importante en el desarrollo y mantenimiento del propio sistema inmunitario, siendo destruidas y eliminadas mediante este proceso células inmunitarias que reconocen o atacan células normales del cuerpo.

30 A las células que eliminan tales células indeseadas se les denomina fagocitos profesionales. Dichos fagocitos profesionales son reclutados mediante diversos mecanismos y eliminan células indeseadas, con el fin de mantener la homeostasis y prevenir la inflamación.

35 Se ha demostrado que las células que experimentan muerte por apoptosis presentan propiedades inmunomoduladoras. La apoptosis es un mecanismo fisiológico que elimina células en exceso o células que se han vuelto indeseables, sin inducir una respuesta inflamatoria. La falta de inflamación asociada con la apoptosis se atribuye al hecho de que los fagocitos profesionales, tales como los macrófagos y las células dendríticas inmaduras, eliminan eficazmente las células o vesículas apoptóticas, impidiendo así la liberación de proteasas y otros mediadores inflamatorios como alarminas, y la necrosis secundaria de células apoptóticas, otro suceso proinflamatorio. Este proceso de eliminación eficaz de células apoptóticas está asociado con mecanismos para prevenir el inicio de respuestas inmunitarias. Estos mecanismos son críticos y actúan en paralelo, ya que deben prevenir la aparición de enfermedades autoinmunitarias. Se pueden distinguir dos tipos de mecanismos: los relacionados con células apoptóticas y los que están relacionados con su eliminación por fagocitos.

45 Se ha publicado que las células apoptóticas, durante el proceso de la apoptosis, segregan citocinas inmunosupresoras tales como IL-10 y TGF- β . El TGF- β , almacenado en una forma latente en compartimentos intracelulares, es liberado durante el proceso apoptótico. Estas citocinas ayudan a generar un microambiente inmunosupresor, inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- α o IL-1 β) por macrófagos y neutralizan la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz. Esto evita el inicio de una respuesta inmunitaria contra autoantígenos y evita el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria. Las células apoptóticas se unen a quimiocinas inflamatorias tales como CCL3 y CCL5 a través de la expresión de CCR5, evitando así la atracción de otros leucocitos. Estos mecanismos son transitorios hasta que las células apoptóticas son eliminadas o engullidas.

50 Publicaciones recientes han demostrado que las células apoptóticas también pueden permitir indirectamente la inducción de un microambiente inmunomodulador a través de fagocitos profesionales. De hecho, los fagocitos tales como los macrófagos pueden liberar o expresar moléculas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β , prostaglandina E2 o PGE-2, ligando Fas) durante el aclaramiento de células apoptóticas (Griffith, TS y Ferguson, TA, Immunity (2011) 35: 456).

55 Estos fagocitos ejercen efectos inmunomoduladores para prevenir el desarrollo de respuestas inmunitarias perjudiciales para el anfitrión. Además, los fagocitos que eliminan células apoptóticas también transmiten este

mensaje inmunomodulador a células de inmunidad adaptativa. Los macrófagos parecen ser los principales fagocitos efectivos que eliminan células apoptóticas.

De hecho, expresan una gran cantidad de receptores de membrana implicados en esta eliminación. La estimulación de estos receptores participa en las propiedades inmunomoduladoras asociadas con la eliminación de células apoptóticas. Se han descrito numerosos mecanismos inmunomoduladores. Se caracterizan principalmente por la liberación de factores solubles, citocinas tales como IL-10 o TGF- β . La respuesta de los macrófagos a los estímulos de peligro se inhibe una vez que han eliminado las células apoptóticas. Ciertas subpoblaciones de células dendríticas también están involucradas en la captura de células apoptóticas. Un estudio llevado a cabo en ratas demostró que una subpoblación de células dendríticas circulantes es responsable de capturar continuamente células y cuerpos apoptóticos procedentes de células epiteliales intestinales eliminadas diariamente tras la descamación. Después, las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos mesentéricos donde inactivan células T vírgenes autorreactivas. Otros estudios, en el modelo de ratón, también sugieren que la captura de células apoptóticas por células dendríticas conduce a tolerancia. Además, un estudio *in vitro* ha demostrado que células dendríticas que habían capturado células apoptóticas no respondían a lipopolisacáridos (Morelli, AE y Larregina, AT, Apoptosis (2010) 15: 1083).

Las consecuencias de la interacción célula apoptótica/fagocito influyen en la polarización de células T CD4+. Aunque el contacto con células apoptóticas inhibe la maduración de células dendríticas convencionales y su producción de citocinas, sus capacidades de migración no se ven afectadas. Así pues, estas células pueden adquirir expresión de CCR7 y migrar en respuesta a gradientes de CCL19 y CCL21 hacia los ganglios linfáticos más cercanos al sitio donde mueren las células. En los ganglios linfáticos, las células dendríticas que se han encontrado con células apoptóticas pueden interactuar con células T CD4+ vírgenes y, por lo tanto, favorecer su conversión a un fenotipo regulador en forma de células T reguladoras (Treg) a través de un "mensaje" inmunomodulador. Una característica principal de Treg generadas por células dendríticas "inmunomoduladoras" es su capacidad para aumentar la IL-10. También se ha sugerido que las células dendríticas plasmacitoides son células presentadoras de antígenos en el origen de las células Tr1. Sin embargo, estas células dendríticas también pueden promover la diferenciación de Treg FoxP3+, especialmente en un microambiente rico en células apoptóticas.

Los métodos tradicionales para tratar enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria patológica con fármacos inmunosupresores tales como corticosteroides, azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato y ciclosporina están lejos de ser tratamientos ideales. La terapia farmacológica va acompañada de graves efectos secundarios, entre ellos la supresión inmunitaria general, que conduce a altas tasas de morbilidad y es la causa principal de mortalidad prematura. Además, los fármacos inmunosupresores actualmente utilizados han mostrado poco o ningún impacto sobre el rechazo crónico, tal como el rechazo de aloinjertos y la enfermedad de injerto contra anfitrión y, por lo tanto, sobre la supervivencia global a largo plazo del aloinjerto. Es importante destacar que la inmunosupresión farmacológica a largo plazo está asociada con toxicidad y una mayor incidencia de tumores malignos y enfermedades infecciosas y metabólicas.

Por lo tanto, ha sido un objetivo importante durante muchos años el descubrimiento de formas alternativas para manipular el sistema inmunitario con el fin de tratar tales enfermedades inmunitarias.

Las células apoptóticas favorecen un microambiente inmunosupresor a través de diversos mecanismos, tal como se ha descrito en lo que antecede. Así pues, ya se han propuesto varias estrategias que utilizan células apoptóticas para manipular el sistema inmunitario. Por ejemplo, la solicitud de patente WO2006/117786 describe inyecciones de una preparación celular que comprende leucocitos moribundos o muertos para tratar enfermedades asociadas con respuestas inmunitarias patológicas.

Sin embargo, la inyección de células adolece de diversos inconvenientes, tales como la necesidad de administrar células apoptóticas alogénicas, que está asociada con el riesgo de aloinmunización que favorece el rechazo del injerto, ya que se ha demostrado que las células apoptóticas son una fuente de aloantígenos, y la falta de demostración de una seguridad adecuada con respecto a la posibilidad de efectos secundarios inflamatorios.

La solicitud de patente WO2010/070105 describe un enfoque que se supone evita el problema de inyectar células en un sujeto. La solicitud sugiere emplear el sobrenadante de células apoptóticas para manipular el sistema inmunitario de un sujeto. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el sobrenadante de células apoptóticas solo no activa, por ejemplo, células dendríticas plasmacitoides que son importantes para favorecer la inducción de tolerancia mediante mecanismos que incluyen la inducción de células T reguladoras (Treg) (Bonney F *et al.* J Immunol. 2011; 186(10):5696-705).

La patente WO2007/0559922 aborda este aspecto y utiliza el sobrenadante de células apoptóticas *ex vivo* para generar células T reguladoras que luego son administradas al sujeto que lo necesita, en especial sujetos que padecen enfermedades de injerto contra anfitrión. Sin embargo, esta aplicación también adolece de inconvenientes asociados con la inyección de material celular extraño en un sujeto, tales como la posibilidad de efectos secundarios inflamatorios.

Así pues, ninguno de los enfoques anteriores ha logrado proporcionar un tratamiento estandarizado y eficaz de

dichas enfermedades. De hecho, el efecto terapéutico de la inyección de células apoptóticas está fuertemente asociado con la eliminación de células apoptóticas y, por lo tanto, depende de la migración de células apoptóticas a tejidos fagocíticos, de la eficacia de los fagocitos para eliminar células apoptóticas y, de manera notable, de la capacidad de los fagocitos para generar este tipo de ambiente tolerogénico.

- 5 Por lo tanto, sería muy ventajoso proponer una preparación farmacéutica independiente de tales limitaciones.

Descripción de la invención

10 Los autores de la presente invención han demostrado *in vivo* que un sobrenadante obtenido de cocultivo de fagocitos con células apoptóticas es sorprendentemente eficaz en el tratamiento en modelos de ratón de enfermedades autoinmunitarias sistémicas y/o enfermedades autoinmunitarias mediadas por anticuerpos, tales como artritis reumatoide y enfermedades relacionadas con trasplante, tales como la enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA). El uso de este sobrenadante proporciona una posible alternativa a la inyección de células apoptóticas en la terapia de afecciones inmunitarias que es potencialmente más segura y más conveniente.

15 Así pues, la invención se refiere a una preparación farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de una respuesta inmunitaria patológica, que comprende un sobrenadante que se puede obtener del cocultivo de fagocitos con células apoptóticas.

Dicho sobrenadante se puede obtener mediante un método que comprende los siguientes pasos de a) proporcionar fagocitos, b) proporcionar células apoptóticas, c) opcionalmente lavar las células de los pasos a) y b), d) cocultivar las células de los pasos a) y b), y opcionalmente e) separar el sobrenadante de las células.

20 Se entiende por "célula apoptótica" cualquier célula elegida de cualquier tipo de célula de un sujeto o cualquier línea celular comercialmente disponible sometida a un método para inducción de apoptosis conocido por la persona experta en la técnica. Dicho método para inducción de apoptosis es, por ejemplo, hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH, irradiación con rayos X, irradiación con rayos gamma, irradiación UV, privación de suero, corticoides o combinaciones de los mismos, donde el método no está limitado a dichos ejemplos.

25 En una realización, dichas células apoptóticas son leucocitos.

En una realización, dichos leucocitos y/o fagocitos se derivan de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

En una realización, dichas células apoptóticas y fagocitos se cultivan individualmente antes del paso de cocultivo.

En una realización, el cocultivo de células apoptóticas y fagocitos tiene lugar en una solución fisiológica.

30 Durante dicho paso d) de cocultivo se cocultivan fagocitos y células apoptóticas, en un ejemplo se cocultivan en una proporción de 1:5 (fagocitos respecto a células apoptóticas), en donde el paso d) de cocultivo no está limitado a dicha proporción.

Se puede "inactivar" el sobrenadante antes de su uso, por ejemplo mediante irradiación. Por lo tanto, el método para preparar la preparación farmacéutica puede comprender un paso f) de irradiación adicional opcional.

35 En una realización, dicha preparación farmacéutica está adaptada para administración intracardiaca, administración intraarterial, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraorgánica o administración intravenosa.

También se proporciona una preparación farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de una respuesta inmunitaria patológica, que comprende dicho sobrenadante y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 En un ejemplo, se liofiliza dicha preparación, por ejemplo para almacenarla a -80°C.

Dicha respuesta inmunitaria patológica puede ser, pero sin limitación, una respuesta inmunitaria inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad relacionada con trasplante.

En un ejemplo, dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide [AR] o enfermedad inflamatoria intestinal [EII] y dicha enfermedad relacionada con trasplante es enfermedad de injerto contra anfitrión [EICA].

45 La memoria descriptiva proporciona además un método para tratar o prevenir una respuesta inmunitaria patológica que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho sobrenadante que se puede obtener del cocultivo de fagocitos con células apoptóticas tal como se describe en la presente memoria.

50 También se proporciona el uso de un sobrenadante que se puede obtener del cocultivo de fagocitos con células apoptóticas tal como se declara en la presente memoria, para preparar un medicamento para tratar o prevenir una

respuesta inmunitaria patológica.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica de la invención es una preparación farmacéutica tolerogénica, en donde "tolerogénico" significa que la preparación farmacéutica es capaz de inducir tolerancia inmunológica.

5 La "apoptosis" es un proceso de muerte celular distinto de la necrosis, y consiste en la eliminación fisiológica programada y ordenada de células que se produce, por ejemplo, durante el desarrollo normal de células y tejidos, la destrucción por linfocitos T de células infectadas con patógenos y la autoeliminación de células dañadas por mutación. Las células apoptóticas se caracterizan por claras alteraciones morfológicas en el citoplasma y el núcleo, escisión de la cromatina en posiciones separadas con regularidad y escisión endonucleolítica del ADN genómico en sitios internucleosómicos. En el contexto de la invención se debe distinguir la "apoptosis" de la "necrosis", que es, 10 por otro lado, un proceso de muerte celular inherentemente patológico y proinflamatorio causado, de manera típica pero no exclusiva, por la acción degradante, progresiva e incontrolada de enzimas consecuentes a una lesión celular letal. Las células necróticas se caracterizan típicamente por hinchazón mitocondrial, floculación nuclear, lisis celular, pérdida de integridad de la membrana y finalmente muerte celular. La necrosis se puede identificar mediante técnicas de microscopía óptica, microscopía de fluorescencia o microscopía electrónica, o mediante la absorción del 15 colorante azul tripán.

Las propiedades antes mencionadas de las células apoptóticas contrastan notablemente con las de las células necróticas, ya que la necrosis es intrínsecamente un proceso patológico que está asociado con la generación de "señales de peligro" proinflamatorias que sirven para estimular, en lugar de suprimir, respuestas inmunitarias para la defensa del organismo.

20 La apoptosis de una célula se puede confirmar mediante cualquiera de diversos métodos comúnmente empleados. Tales métodos incluyen electroforesis en gel de ADN celular para detectar patrones de fragmentos de ADN de tipo escalera específicos de apoptosis, tinción TUNEL para detectar la fragmentación de ADN específica de apoptosis, tinción con un conjugado de anexina-fluoróforo para detectar la reversión de la membrana celular que es específica de la apoptosis, por ejemplo tinción con anexina V, tinción con anticuerpo anti-caspasa 3 escindida, para detectar la 25 activación de caspasa específica de la apoptosis, inspección microscópica para detectar la fragmentación celular y formación de vesículas específicas de la apoptosis, exclusión de 7-ADD, y similares.

Preferiblemente, se pueden distinguir las células apoptóticas de otras células mediante la tinción con anexina V y la exclusión de 7-AAD. Las células apoptóticas no permiten la tinción con colorante azul tripán.

En la presente memoria se denominan células apoptóticas a las células que experimentan apoptosis.

30 Se pueden proporcionar "células apoptóticas" mediante métodos conocidos por el técnico para producir células apoptóticas mediante la inducción de apoptosis. Dichos métodos de inducción de apoptosis incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH, irradiación con rayos X, irradiación con rayos gamma, irradiación UV, privación de suero, corticoides o combinaciones de los mismos.

35 Se puede emplear cualquier célula para obtener células apoptóticas. Por lo tanto, se pueden seleccionar células para la producción de células apoptóticas del siguiente grupo de células, sin limitación: células epiteliales secretoras exocrinas, células secretoras de hormona, células epiteliales queratinizantes, células transductoras sensoriales, células neuronales autónomas, células de los órganos de los sentidos y de soporte de neuronas periféricas, neuronas del sistema nervioso central y células gliales, células del cristalino, células del metabolismo y de almacenamiento, células con función de barrera, células de matriz extracelular, células contráctiles, células de la 40 sangre y del sistema inmunitario, células germinales, células nodriza, células intersticiales. Además, estas células se pueden derivar de cualquier línea celular comercialmente disponible.

La inducción de la apoptosis se puede llevar a cabo durante, por ejemplo, desde varias horas hasta varios días, por ejemplo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 horas, en un medio de cultivo apropiado.

45 Una preparación de células apoptóticas también puede comprender células no apoptóticas, ya que la inducción apoptótica podría ser incompleta. Las células apoptóticas representarán 20%-100% de las células totales, por ejemplo 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100%. Preferiblemente, las células apoptóticas representarán 70%-100% de las células totales, por ejemplo 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100%.

50 Se comprenderá que la elección del medio de cultivo para las células apoptóticas la decidirá la persona experta en la técnica dependiendo del tipo de células que se han sometido a una inducción de apoptosis. Por ejemplo, el medio de cultivo es, sin limitación, RPMI, DMEM, X-vivo o medios Ultraculture.

En una realización de la invención, las células apoptóticas son leucocitos.

55 Según una realización de la invención, se proporcionan las células apoptóticas seleccionando leucocitos no adherentes y someténdolos a inducción de apoptosis, seguida de un paso de cultivo celular en medio de cultivo.

- 5 Los "leucocitos" empleados para poner en práctica el método de la presente invención se pueden derivar de cualquier linaje o sublinaje de células nucleadas del sistema inmunitario y/o del sistema hematopoyético, incluidas, pero sin limitación, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, basófilos, células madre hematopoyéticas, células de la médula ósea, células asesinas naturales y similares. En el contexto de la presente invención, se pueden derivar u obtener leucocitos de cualquiera de diversas formas adecuadas, a partir de cualquiera de diversos compartimentos anatómicos adecuados, de acuerdo con cualquiera de diversos métodos habitualmente puestos en práctica, dependiendo de la aplicación y la finalidad, del linaje de leucocitos deseado, etc. Preferiblemente, los leucocitos fuente son leucocitos primarios, más preferiblemente leucocitos primarios de sangre periférica.
- 10 Lo más convenientemente, los linfocitos y monocitos primarios se pueden derivar de sangre periférica. Los leucocitos de sangre periférica incluyen 70-95 por ciento de linfocitos y 5-25 por ciento de monocitos.
- 15 Rutinariamente se ponen en práctica métodos para obtener tipos específicos de leucocitos fuente a partir de sangre. La obtención de linfocitos y/o monocitos fuente se puede conseguir, por ejemplo, extrayendo sangre en presencia de un anticoagulante, tal como heparina o citrato. Se centrifuga luego sobre un lecho de Ficoll la sangre extraída, para aislar linfocitos y monocitos en la interfaz del gradiente, y neutrófilos y eritrocitos en la pella. Se pueden separar entre sí los leucocitos mediante técnicas estándar de selección inmunomagnética o de citometría de flujo inmunofluorescente, en función de sus marcadores superficiales específicos, o mediante elutriación centrífuga. Por ejemplo, se pueden seleccionar monocitos como la fracción CD14+, se pueden seleccionar linfocitos T como la fracción CD3+, se pueden seleccionar linfocitos B como la fracción CD19+, y macrófagos como la fracción CD206+.
- 20 Los linfocitos y monocitos se pueden aislar entre sí sometiendo estas células a condiciones adherentes a sustrato, por ejemplo mediante cultivo estático en un recipiente de cultivo tratado con cultivo de tejido, lo que da como resultado la adherencia selectiva de los monocitos, pero no de los linfocitos, al sustrato adherente celular.
- También se pueden obtener leucocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), que se pueden aislar como se describe en la presente memoria.
- 25 Un experto ordinario en la técnica poseerá la experiencia necesaria para cultivar adecuadamente leucocitos primarios a fin de generar las cantidades deseadas de leucocitos fuente cultivados en el contexto de la presente invención, y en la bibliografía de la técnica se encuentra disponible una amplia guía para poner en práctica tales métodos de cultivo.
- 30 Un experto ordinario en la técnica poseerá además la experiencia necesaria para establecer, adquirir u obtener de cualquier otro modo líneas celulares de leucocitos establecidas adecuadas, para derivar de las mismas los leucocitos apoptóticos. Se pueden obtener líneas celulares de leucocitos adecuadas de proveedores comerciales, tales como la American Tissue Type Collection (ATCC).
- Será evidente para la persona experta en la técnica que los leucocitos fuente no se deben obtener a través de una técnica que interfiera significativamente con su capacidad para producir leucocitos apoptóticos.
- 35 En otra realización, las células apoptóticas son linfocitos apoptóticos. La apoptosis de linfocitos, por ejemplo linfocitos primarios, se puede inducir tratando los linfocitos primarios con privación de suero, un corticosteroide o irradiación. Preferiblemente, la inducción de apoptosis de linfocitos primarios mediante tratamiento con un corticosteroide se efectúa tratando a los linfocitos primarios con dexametasona, más preferiblemente con dexametasona a una concentración aproximadamente 1 micromolar. Preferiblemente, la inducción de apoptosis de linfocitos primarios por medio de irradiación se efectúa tratando a los linfocitos primarios con radiación gamma, más preferiblemente con una dosis de aproximadamente 66 rad. Este tratamiento da como resultado la generación de linfocitos apoptóticos adecuados para el paso de cocultivo con fagocitos.
- 40 En una realización adicional, las células apoptóticas son monocitos apoptóticos, por ejemplo monocitos primarios. Para generar monocitos apoptóticos, se somete a los monocitos a condiciones *in vitro* de adherencia a sustrato/superficie en condiciones de privación de suero. Tal tratamiento da como resultado la generación de monocitos apoptóticos no proinflamatorios adecuados para el paso de cocultivo con fagocitos.
- 45 El término "fagocitos" designa células que protegen al organismo al ingerir (fagocitar) partículas extrañas dañinas, bacterias y células muertas o moribundas. Los fagocitos incluyen, por ejemplo, células denominadas neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos, preferiblemente células dendríticas y monocitos/macrófagos. En el contexto de la invención, los fagocitos pueden ser células dendríticas (linaje BDCA1/BDCA3+ CD4+ HLA-DR+), macrófagos (CD14+ CD206+ HLA-DR+) o derivarse de monocitos (CD14+). Las técnicas para distinguir estos distintos fagocitos son conocidas por las personas expertas en la técnica.
- 50 En una realización, se obtienen monocitos mediante un paso de adherencia a plástico. Dichos monocitos se pueden distinguir de las células B y T con el marcador CD14+, mientras que las células B no deseadas expresan CD19+ y las células T, CD3+. Después de la maduración inducida por factor estimulante de colonias de macrófagos (FEC-M), los macrófagos obtenidos son preferiblemente positivos frente a los marcadores CD14+, CD206+, HLA-DR+.
- 55 Se pueden proporcionar fagocitos mediante cualquier método conocido en la técnica para obtener fagocitos. En una

realización, se pueden aislar fagocitos tales como macrófagos o células dendríticas directamente de un sujeto o bien derivarse de células precursoras mediante un paso de maduración.

En una realización, se aíslan directamente macrófagos de la cavidad peritoneal de un sujeto y se cultivan en medio RRPMI completo.

5 También se pueden aislar macrófagos del bazo.

También se pueden obtener fagocitos a partir de monocitos de sangre periférica. En dicho ejemplo, los monocitos se diferencian, cuando se cultivan, en macrófagos derivados de monocito tras la adición de, sin limitación, factor estimulante de colonias de macrófagos (FEC-M) al medio de cultivo celular.

10 Por ejemplo, se pueden derivar fagocitos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Por ejemplo, se pueden aislar CMSP de bolsas de citaféresis de un individuo mediante centrifugación en gradiente de Ficoll y extensión en placas, en un paso de adherencia celular durante 90 minutos en medio de cultivo RPMI completo (10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomina). Se eliminan las células no adherentes mediante un paso de adherencia a plástico y se cultivan las células adherentes en medio RPMI completo complementado con FEC-M humano recombinante. Después del período de cultivo, se obtienen macrófagos derivados de monocitos.

15 Se pueden seleccionar fagocitos mediante un paso de adherencia celular. Dicho "paso de adherencia celular" significa que se seleccionan fagocitos, o células que pueden madurar a fagocitos, mediante condiciones de cultivo que permiten la adhesión de las células cultivadas a una superficie, una superficie adherente celular (por ejemplo, una placa de cultivo de tejido, una matriz, un saco o bolsa con el tipo apropiado de nailon o plástico).

20 Las "superficies adherentes celulares" son preferiblemente hidrófilas y están cargadas negativamente, y se pueden obtener de cualquiera de diversas formas conocidas en la técnica, preferiblemente modificando una superficie de poliestireno mediante, por ejemplo, descarga en corona o plasma de gas. Estos procesos generan iones de oxígeno muy energéticos que se injertan en las cadenas de poliestireno superficiales de modo que la superficie se vuelve hidrófila y se carga negativamente. Los recipientes de cultivo diseñados para facilitar la adhesión celular a los mismos están disponibles de varios proveedores comerciales (por ejemplo, Corning, Perkin-Elmer, Fisher Scientific, Evergreen Scientific, Nunc, etc.).

25 La maduración celular de fagocitos tiene lugar durante el cultivo celular, por ejemplo, debido a la adición de factores de maduración a los medios. En una realización, dicho factor de maduración es FEC-M, que se puede utilizar, por ejemplo, para obtener macrófagos derivados de monocitos.

30 El paso de cultivo empleado para la maduración o selección de fagocitos puede requerir desde varias horas hasta varios días. Preferiblemente, dichos fagocitos premaduros se cultivan durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 horas en un medio de cultivo apropiado.

La persona experta en la técnica conoce el medio de cultivo para fagocitos y por ejemplo puede ser, pero sin limitación, RPMI, DMEM, X-vivo y medios Ultraculture.

35 Tras el cultivo celular, se pueden enriquecer las células en cuanto al tipo específico de fagocitos al que están dirigidas las condiciones de cultivo que las personas expertas en la técnica conocen. Dichos fagocitos pueden representar 20%-100% de las células totales, por ejemplo 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 y 100%. Dichos fagocitos representan preferiblemente 60%-100% de las células totales, más preferiblemente 60, 65, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 y 100%.

40 La preparación según la invención puede contener los inmunosupresores IL-10, TGF- β , prostaglandinas (por ejemplo E2, PGE-2), IL-1ra, TIMP-1, CXCL1/KC, CCL2/JE, CX3CL1 y/o MCP1.

Preferiblemente, la preparación no contiene mediadores proinflamatorios, por ejemplo IL-1, IL-6 y/o TNF.

En el contexto de la invención, "inmunosupresores" o "compuestos antiinflamatorios" son cualquier sustancia que realice una supresión inmunitaria del sistema inmunitario.

45 En la presente memoria, "cocultivo" significa un cultivo celular que contiene crecimientos del mismo tipo de células pero tratadas de manera distinta antes del cultivo celular o de al menos dos tipos distintos de células, preferiblemente de al menos dos tipos distintos de células.

En el caso del mismo tipo de células, "tratado de manera distinta" se refiere aquí a la inducción de apoptosis en una fracción de las células pero no en la otra.

50 Antes de este "cocultivo", se someten las células a un paso de lavado. Preferiblemente, se lavan los fagocitos y las células apoptóticas antes del paso de cocultivo. En una realización, se lavan las células con PBS.

Durante dicho cocultivo, se pueden mezclar fagocitos y células apoptóticas en una proporción de 10:1, 9:1; 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, más preferiblemente en una proporción de (fagocitos:células apoptóticas) 1:2, 1:3, 1:4,

ES 2 657 675 T3

1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10. En un ejemplo, la relación de fagocitos a células apoptóticas es 1:5.

El cocultivo de las células podría durar desde varias horas hasta varios días. Preferiblemente, se cultivan dichas células apoptóticas durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 horas.

- 5 Una persona experta en la técnica puede evaluar el tiempo óptimo para el cocultivo midiendo la presencia de compuestos antiinflamatorios, la cantidad viable de fagocitos y la cantidad de células apoptóticas que no se han eliminado hasta ese momento.

La eliminación de células apoptóticas por los fagocitos se puede observar con microscopía óptica debido a la desaparición de células apoptóticas.

- 10 Preferiblemente, el cocultivo tiene lugar en un medio de cultivo y/o en una solución fisiológica compatible con la administración, por ejemplo, inyección, a un sujeto.

Una "solución fisiológica" es, preferiblemente, una solución que no conduce a la muerte de fagocitos dentro del tiempo de cultivo. Preferiblemente, la solución fisiológica no conduce a la muerte en el transcurso de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 horas, preferiblemente 48 horas, más preferiblemente 30 horas.

- 15 Preferiblemente, los fagocitos y células apoptóticas se incuban en la solución fisiológica durante al menos 30 minutos. Este tiempo de cultivo permite el inicio de la fagocitosis y la secreción de citocinas y otras sustancias beneficiosas.

- 20 Si el número de fagocitos viables durante el cocultivo en la solución fisiológica disminuye en 75%, 80%, 85% o en 90% en el transcurso de una hora o 30 minutos, no se considera que la solución es una solución fisiológica tal como se define en la presente memoria.

Adicionalmente, una solución fisiológica de este tipo preferiblemente no inhibe la eliminación de leucocitos apoptóticos por macrófagos derivados de leucocitos.

- 25 Al final del paso de cocultivo, opcionalmente se separa el sobrenadante de las células cocultivadas. En la técnica se conocen técnicas para separar el sobrenadante de las células. Por ejemplo, se puede recoger y/o filtrar y/o centrifugar el sobrenadante para eliminar células y residuos. Por ejemplo, se puede centrifugar dicho sobrenadante a 3.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para separarlo de las células.

En una realización, se congela o se liofiliza el sobrenadante separado para su conservación y uso posterior.

Se puede irradiar el sobrenadante separado de las células.

- 30 Dicho paso de "irradiación" puede considerarse un método de desinfección que utiliza irradiación con rayos X (25-45 Gy) con una dosis suficiente para matar microorganismos, tal como se realiza rutinariamente para inactivar productos sanguíneos.

Para su conservación, el producto final se puede conservar o bien a +4°C, preferiblemente para el uso en las 48 horas siguientes, o bien liofilizarse para permitir el almacenamiento a -80°C.

- 35 La preparación de la invención puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende el sobrenadante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 40 En la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son aptos para la administración a un mamífero sin producir efectos fisiológicos indeseables tales como náusea, mareo, malestar gástrico y similares. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico, de cualquier tipo.

- 45 Naturalmente, la forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen de la afección a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, del peso y del sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intraorgánica, intracardiaca, intraarterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

En otra realización, la preparación farmacéutica según la invención comprende al menos otro inmunosupresor.

- 50 Para preparar una preparación farmacéutica, se puede disolver o dispersar en un vehículo o medio acuoso

farmacéuticamente aceptable una cantidad eficaz de una preparación liofilizada.

5 El "vehículo" puede ser también un disolvente o medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede conseguir una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Se preparan soluciones inyectables estériles, o bien solubilizando el sobrenadante liofilizado, en la cantidad requerida, en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados más arriba, según se requiera, seguido de esterilización por filtración, o bien esterilizando por filtración directamente la preparación farmacéutica que comprende el sobrenadante.

15 En el caso de polvos estériles para preparar soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y de secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional, a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

20 Tras la formulación, se administrarán las soluciones de una manera compatible con la formulación farmacéutica y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas farmacéuticas, por ejemplo el tipo de soluciones inyectables descritas más arriba, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Además de la preparación farmacéutica que comprende un sobrenadante formulado para administración parenteral, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración por vía oral, cápsulas de liberación temporizada y cualquier otra forma utilizada en la actualidad.

25 Dependiendo de la aplicación y de la finalidad, el tratamiento de la enfermedad se puede realizar ventajosamente conforme a las enseñanzas de la presente invención, juntamente con terapias estándar de la técnica anterior.

30 Durante y después del tratamiento de la enfermedad conforme al método de la presente invención, se monitorizará estrechamente el estado de la enfermedad con el fin de optimizar y modificar adecuadamente el tratamiento. Por ejemplo, se pueden monitorizar en el paciente los niveles de cualquiera de diversas citocinas proinflamatorias, quimiocinas u otras moléculas, con el fin de facilitar el seguimiento del tratamiento de la enfermedad. En el caso de enfermedades autoinmunitarias se pueden medir los niveles tisulares de autoanticuerpos relevantes, para monitorizar el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, en el caso de una enfermedad autoinmunitaria sistémica, tal como el lupus eritematoso sistémico, tales autoanticuerpos incluyen los específicos para ADN bicatenario y los específicos para fosfolípidos.

35 Un experto habitual en la técnica, tal como un médico, preferiblemente un especialista en la enfermedad a tratar, poseerá la experiencia necesaria para aplicar las enseñanzas de la presente invención con el fin de tratar eficazmente una enfermedad de la presente invención en un sujeto humano.

Una "respuesta inmunitaria patológica" puede ser una respuesta inmunitaria inflamatoria y otras enfermedades, incluidas enfermedades autoinmunitarias, enfermedades relacionadas con trasplantes y enfermedades asociadas a inflamación.

40 Se describen a continuación ejemplos de enfermedades caracterizadas por respuestas inmunitarias patológicas que se pueden tratar según la presente invención.

En la presente memoria, el término "enfermedad" se refiere a cualquier enfermedad médica, trastorno, afección o síndrome, o a cualquier estado y/o afección fisiológica, morfológica, cosmética y/o física no deseada y/o anormal.

45 En la presente memoria, el término "tratar", cuando está relacionado con una enfermedad de la presente invención, se refiere a prevenir la aparición de la enfermedad, aliviar, atenuar, paliar o eliminar los síntomas de una enfermedad, ralentizar, revertir o detener la progresión de la enfermedad, o curar la enfermedad

50 Según la invención, el término "sujeto" o la expresión "sujeto que lo necesita" designan un mamífero humano o no humano afectado o que pueda verse afectado por un trastorno inflamatorio. En particular, dicho sujeto puede ser un paciente del que se ha determinado que es susceptible a una preparación terapéutica según la invención, en particular a los componentes inmunosupresores presentes en la preparación farmacéutica según la invención, por ejemplo según un método como se describe en lo que sigue.

Los términos "sujeto", "individuo" o "anfitrión" pueden ser, por ejemplo, un mamífero humano o no humano. Por ejemplo, el sujeto es un murciélago; un hurón; un conejo; un felino (gato); un canino (perro); un primate (mono), un equino (caballo); un ser humano, incluido el hombre, la mujer y el niño.

Preferiblemente, las preparaciones y los métodos de la presente invención se emplean para tratar la enfermedad en un sujeto.

Se entiende por una "cantidad terapéuticamente efectiva" de la preparación farmacéutica una cantidad de la preparación farmacéutica suficiente para tratar dicha respuesta inmunitaria patológica, con una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, no obstante, que el uso diario total de la preparación farmacéutica y de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico tratante dentro del ámbito del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, entre ellos el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad de la preparación farmacéutica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración; la duración del tratamiento; de medicamentos utilizados en combinación o coincidentes con la preparación específica empleada; y de factores análogos bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, es bien sabido dentro de la pericia de la técnica comenzar las dosis de la preparación a niveles menores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que lograr el efecto deseado.

Según una realización, el tratamiento de una enfermedad en el contexto de la presente invención se realiza administrando al sujeto una preparación farmacéutica que comprende una dosis total o alícuota de sobrenadante derivado del cocultivo de aproximadamente 14×10^9 de células CD45+ obtenidas por citaféresis equivalente a aproximadamente 200 millones de células por kilogramo de peso corporal (para un sujeto de 70 kg). Preferiblemente, esta dosis total se administra en forma de dosis unitarias de sobrenadante derivadas de aproximadamente 100 millones de células por kilogramo de peso corporal, y/o se administra en forma de dosis unitarias a intervalos semanales, más preferiblemente ambas cosas. Las dosis totales adecuadas según esta realización incluyen dosis totales de sobrenadante derivado de aproximadamente 10 millones a aproximadamente 4 mil millones de células por kilogramo de peso corporal, más preferiblemente sobrenadante derivado de aproximadamente 40 millones a aproximadamente mil millones de células por kilogramo de peso corporal, más preferiblemente sobrenadante derivado de alrededor de 80 millones a aproximadamente 500 millones de células por kilogramo de peso corporal, y más preferiblemente sobrenadante derivado de aproximadamente 160 millones a aproximadamente 250 millones de células por kilogramo de peso corporal. Las dosis unitarias adecuadas según esta realización incluyen dosis unitarias de sobrenadante derivado de aproximadamente 4 millones a aproximadamente 400 millones de células por kilogramo de peso corporal, más preferiblemente sobrenadante derivado de aproximadamente 8 millones a aproximadamente 200 millones de células por kilogramo de peso corporal, más preferiblemente sobrenadante derivado de aproximadamente 16 millones a aproximadamente 100 millones de células por kilogramo de peso corporal, y más preferiblemente sobrenadante derivado de aproximadamente 32 millones a aproximadamente 50 millones de células por kilogramo de peso corporal.

Por lo tanto, las preparaciones y los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar cualquiera de diversos tipos de sujetos y cualquiera de diversas enfermedades asociadas con una respuesta inmunitaria patológica. Tales enfermedades incluyen, en particular, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades relacionadas con trasplantes y enfermedades asociadas con inflamación.

La enfermedad autoinmunitaria puede ser, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), una enfermedad autoinmunitaria sistémica y/o una enfermedad autoinmunitaria mediada por anticuerpos, por ejemplo artritis reumatoide (AR) o una enfermedad relacionada con trasplantes, por ejemplo enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA) u otra afección descrita en lo que sigue.

La enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria patológica puede ser cualquiera de diversas enfermedades inflamatorias o asociadas con inflamación.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias mediadas por anticuerpos incluyen, pero sin limitación, enfermedades reumatoides, enfermedades autoinmunitarias reumatoides, artritis reumatoide (Krenn V. *et al.*, *Histol Histopathol* 2000; 15(3): 791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel *et al.*, *Arthritis Res* 2001; 3(3): 189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Erikson J *et al.*, *Immunol Res.* 1998; 17(1-2): 49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau Y. *et al.*, *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(2): 156); Chan OT. *et al.*, *Immunol Rev* 1999; 169:107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunitarias glandulares, enfermedades autoinmunitarias pancreáticas, diabetes, diabetes de tipo 1 (Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 34 Suppl: S125), enfermedades tiroideas, enfermedades tiroideas autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29(2): 339), tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S. *J Immunol* 2000; 165(12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. *et al.*, *Nippon Rinsho* 1999; 57(8): 1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho.* 1999; 57(8): 1759); enfermedades reproductivas autoinmunitarias, enfermedades ováricas, autoinmunidad ovárica (Garza KM. *et al.*, *J Reprod Immunol* 1998; 37(2): 87), infertilidad autoinmunitaria antisperma (Diekman AB. *et al.*, *Am J Reprod Immunol.* 2000; 43(3): 134), pérdida fetal repetida (Tincani A. *et al.*, *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S107-9), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunitarias neurológicas, esclerosis múltiple (Cross AH. *et al.*, *J Neuroimmunol* 2001; 112(1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. *et al.*, *J Neural Transm Suppl.* 1997; 49: 77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E. *Int Rev Immunol* 1999; 18(1-2): 83), neuropatías motoras (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci.* 2000; 7(3): 191), síndrome de Guillain-Barré, neuropatías y

neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. *Am J Med Sci.* 2000; 319(4): 234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci.* 2000; 319(4): 204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofas cerebelosas, atrofas cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine JC. y Honnorat J. *J Rev Neural (Paris)* 2000; 156(1): 23); neuropatías, neuropatías disimunitarias (Nobile-Orazio E. *et al.*, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1999; 50: 419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. *et al.*, *Ann NY Acad Sci.* 1998; 841: 482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias cardiovasculares, aterosclerosis (Matsuura E. *et al.*, *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S132), trombosis (Tineani A. *et al.*, *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. *et al.*, *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112(15-16): 660); enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. *et al.*, *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(2): 157); vasculitis, vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis necrotizante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis en semilunas (Noel LH., *Ann Med Interne (Paris)* 2000; 151(3): 178); síndrome antifosfolípidos (Flamholz R. *et al.*, *J Clin Apheresis* 1999; 14(4): 171); insuficiencia cardíaca, anticuerpos adrenérgicos beta de tipo agonista en la insuficiencia cardíaca (Wallukat G. *et al.*, *Am J Cardiol.* 1999; 83(12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int.* 1999; 14(2): 114); anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmunitaria (Efernov DG. *et al.*, *Leuk Lymphoma* 1998; 28(3-4): 285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunitarias del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad intestinal inflamatoria crónica (García Herola A. *et al.*, *Gastroenterol Hepatol.* 2000; 23(1): 16), enfermedad celíaca (Landau YB. y Shoenfeld Y., *Harefuah* 2000; 138(2): 122), enfermedades autoinmunitarias de la musculatura, miositis, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren (Feist E. *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(1): 92); enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. *et al.*, *Biomed Pharmacother* 1999; 53(5-6): 234), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunitarias hepáticas, hepatitis autoinmunitaria (Manns MP. *J Hepatol* 2000; 33(2): 326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg CP. *et al.*, *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 11(6): 595). Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano/tejido comprenden enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conjuntivo y enfermedades sistémicas. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunitarias comprenden aterosclerosis (Matsuura E. *et al.*, *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S132), trombosis (Tincani A. *et al.*, *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. *et al.*, *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112(15-16): 660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. *et al.*, *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(2): 157), vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal pauciinmunitaria y en semilunas (Noel LH., *Ann Med Interne (Paris)* 2000; 151(3): 178), síndrome antifosfolípidos (Flamholz R. *et al.*, *J Clin Apheresis* 1999; 14(4): 171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. *et al.*, *Am J Cardiol* 1999; 83 (12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int* 1999; 14(2): 114; Semple JW. *et al.*, *Blood* 1996; 87(10): 4245), anemia hemolítica autoinmunitaria (Efernov DG. *et al.*, *Leuk Lymphoma* 1998 Jan; 28(3-4): 285; Sallah S. *et al.*, *Ann Hemato* 1997; 74(3): 139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. *et al.*, *J Clin Invest* 1996; 98(8): 1709) y autoinmunidad contra linfocitos T colaboradores (Caporossi AP. *et al.*, *Viral Immunol* 1998; 11(1): 9).

Los ejemplos de enfermedades reumatoides autoinmunitarias comprenden artritis reumatoide (Krenn V. *et al.*, *Histol Histopathol* 2000; 15(3): 791; Tisch R, McDevitt HO. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91(2): 437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel *et al.*, *Arthritis Res* 2001; 3(3): 189).

Los ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunitarias comprenden enfermedad pancreática, diabetes de tipo 1, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmunitaria antiesperma, prostatitis autoinmunitaria y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo 1. Las enfermedades comprenden enfermedades autoinmunitarias del páncreas, diabetes de tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth GS., *Ann. Rev. Immunol.* 8: 647; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 34 Suppl: S125), enfermedades tiroides autoinmunitarias, enfermedad de Graves (Orgiazzi J., *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29(2): 339; Sakata S. *et al.*, *Mol Cell Endocrinol* 1993; 92(1): 77), tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S., *J Immunol* 2000; 165(12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. *et al.*, *Nippon Rinsho* 1999; 57(8): 1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho* 1999; 57(8): 1759), autoinmunidad ovárica (Garza KM. *et al.*, *J Reprod Immunol* 1998; 37(2): 87), infertilidad autoinmunitaria antiesperma (Diekman AB. *et al.*, *Am J Reprod Immunol* 2000; 43(3): 134), prostatitis autoinmunitaria (Alexander RB. *et al.*, *Urology* 1997; 50(6): 893) y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo 1 (Hara T. *et al.*, *Blood* 1991; 77(5): 1127).

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunitarias comprenden enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (García Herola A. *et al.*, *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23(1): 16), enfermedad celíaca (Landau YB. y Shoenfeld Y., *Harefuah* 2000; 138(2): 122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunitarias comprenden enfermedades cutáneas bullosas

autoinmunitarias tales como, pero sin limitación, pénfigo vulgar, pénfigo ampollar y pénfigo foliáceo, lupus eritematoso discoide.

5 Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunitarias comprenden hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitaria (Franco A. *et al.*, Clin Immunol Immunopathol 1990; 54(3): 382), cirrosis biliar primaria (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996; 91(5): 551; Strassburg CP. *et al.*, Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11(6): 595) y hepatitis autoinmunitaria (Manns MP., J Hepatol 2000; 33(2): 326).

10 Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunitarias comprenden esclerosis múltiple (Cross AH. *et al.*, J Neuroimmunol 2001; 112(1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. *et al.*, J Neural Transm Suppl. 1997; 49: 77), miastenia grave (Infante AI y Kraig E. Int Rev Immunol 1999; 18(1-2): 83; Oshima M. *et al.*, Eur J Immunol 1990; 20(12): 2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000; 7(3): 191); síndrome de Guillain-Barré y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000; 319(4): 234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. 2000; 319(4): 204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS. *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA 2001; 98(7): 3988); síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofias cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine JC y Honnorat J. J Rev Neural (Paris) 2000; 156(1): 23); neuropatías disímunitarias (Nobile-Orazio E. *et al.*, Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999; 50: 419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. *et al.*, Ann NY Acad Sci. 1998; 841: 482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. *et al.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57(5): 544) y enfermedades neurodegenerativas.

15 Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunitarias comprenden miositis, miositis autoinmunitaria y síndrome de Sjogren primario (Feist E. *et al.*, Int Arch Allergy Immunol 2000; 123(1): 92) y enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. *et al.*, Biomed Pharmacother 1999; 53(5-6): 234).

25 Los ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunitarias comprenden nefritis y nefritis intersticial autoinmunitaria (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990; 1(2): 140).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la reproducción comprenden pérdida fetal repetida (Tincani A. *et al.*, Lupus 1998; 7 Suppl 2: S107-9).

30 Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias del tejido conjuntivo comprenden enfermedades del oído, enfermedades autoinmunitarias del oído (Yoo TI *et al.*, Cell Immunol 1994; 157(1): 249) y enfermedades autoinmunitarias del oído interno (Gloddek B. *et al.*, Ann NY Acad Sci 1997; 830: 266).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias sistémicas comprenden lupus eritematoso sistémico (Erikson J. *et al.*, Immunol Res 1998; 17(1-2): 49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. *et al.*, Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6(2): 156); Chan OT. *et al.*, Immunol Rev 1999 Jun; 169: 107).

35 Los ejemplos de enfermedades relacionadas con trasplantes incluyen, pero sin limitación, rechazo de injertos, rechazo crónico de injerto, rechazo subagudo de injerto, rechazo hiperagudo de injerto, rechazo agudo de injerto y enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA).

40 Los ejemplos de enfermedades inflamatorias o asociadas con inflamación incluyen, pero sin limitación, reestenosis posterior a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), reestenosis posterior a ACTP con implantación de *stent*, infarto de miocardio, inflamación asociada con lesión mecánica, enfermedades neurodegenerativas, úlceras, implantes protésicos, menstruación, choque séptico, choque anafiláctico, síndrome de choque tóxico, caquexia, gangrena, inflamación musculoesquelética, inflamación idiopática.

Además, la preparación de la presente invención se puede emplear para tratar inflamación en animales, por ejemplo artritis en caballos implicados en competición equina u otra enfermedad inflamatoria que se produzca en animales.

45 Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con pericia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o la prueba de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

50 A lo largo de la presente solicitud, se debe interpretar que la expresión "que comprende" abarca todas las características específicamente mencionadas, así como las opcionales, adicionales, no especificadas. En la presente memoria, el uso de la expresión "que comprende" describe también la realización en la que no están presentes características distintas de las características específicamente mencionadas (es decir, "que consiste en").

Figuras

5 Figura 1. Diagramas de puntos de macrófagos CD11b+ F4/80+ teñidos con anticuerpos específicos para CD11b y F4/80 y analizados mediante FACS, ya sea antes del paso de adherencia a plástico o después del paso de adherencia a plástico (A). Se sometieron células tíficas a inducción de apoptosis 6 horas antes del cultivo con macrófagos enriquecidos, y presentaron 57% de apoptosis (tinción con anexina V y exclusión de 7-AAD) y pocas células necróticas (células positivas a 7-AAD y anexina V) (B). Gráficos de puntos representativos de 5 experimentos independientes que muestran resultados similares.

10 Figura 2. Se cuantificó SuperMApo (MApoSup) en cuanto a la presencia de TGF- β activo y total e IL-10 (A), IL-1 β y TNF (B) mediante ELISA, en comparación con los sobrenadantes obtenidos del cultivo de macrófagos (Macro) o células apoptóticas (Apo) solas, respectivamente. Media +/- e.e.m. de 3 a 11 experimentos independientes. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba t pareada y se consideró significativa una $p < 0,05$.

15 Figura 3. Se trataron con SuperMApo ratones artríticos en el día 30 y se demostró una reducción significativa en términos de puntuación patológica ($p < 0,001$; A). En otro experimento de artritis, ratones artríticos recibieron o bien el tratamiento SuperMApo estándar (B, D) o bien SuperMApo en 2 veces 1 ml o liofilizado (10 veces 200 μ l) (C, D). Estos tratamientos demostraron una resolución significativa de la puntuación artrítica (B, C; prueba t pareada). Media de 5 ratones por grupo +/- e.e.m. Resultados de experimentos independientes.

20 Figura 4. Se evaluaron mediante FACS los porcentajes (%) y cantidades ($\times 10^6$) de células Treg Foxp3+, Th1 IFN+ y Th17 IL-17+ de órganos linfoides y, en particular, en el bazo (A, B) en el momento del sacrificio (A) y después de un período de cultivo de reestimulación en presencia de colágeno (B). Las diferencias han sido evaluadas mediante la prueba t de Student. Datos obtenidos de 1 experimento representativo de 2 que muestran resultados similares.

25 Figura 5. Se sometió a ratones a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) y se evaluó la supervivencia (A), pérdida de peso (B), puntuación de Ferrara (C) y células Th1, Treg (D) y Tc1 (E) en los distintos grupos: ratones condicionados (Irrad), ratones que habían recibido solamente médula ósea (BM) con depleción de células T (TCD BM) o además de la inyección en el día 6 de células T (+ células T) con o sin tratamiento con SuperMApo, o bien comenzado en el día 0 (MApoSup d0) o en el día 6 (MApoSup d6). Media +/- e.e.m. de todos los ratones por grupo. Cinco ratones por grupo. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba t de Student, se consideró significativa $p < 0,05$.

30 Figura 6. Después de la recolección de la capa leucocitaria o citaféresis, se sometieron CMSP a adherencia a plástico y después se cultivaron en presencia o no de FEC-M. Se irradiaron en el día 2 las células no adherentes y en el día 4 se evaluó mediante FACS la apoptosis usando tinción con anexina V y exclusión de 7-AAD. Se evaluó el porcentaje de células T CD3+, células B CD19+, monocitos CD14+ CD206- y macrófagos CD14+ CD206+ como se indica y se indican en los cuadrantes los porcentajes de cada población.

35 Figura 7. Se cuantificó SuperMApo humano (MApoSup) en cuanto a la presencia de TGF- β latente, IL-1 β y TNF mediante ELISA y se comparó con sobrenadante obtenido del cultivo de células apoptóticas solamente (Apo) o macrófagos solamente (PBMCDMacro) o macrófagos estimulados con LPS (PBMCDMacro + LPS). Las diferencias se evaluaron utilizando la prueba t de Student y se consideró significativa una $p < 0,05$. Media +/- s.e.m. de 3 a 7 experimentos independientes.

40 Figura 8. Se evaluó la aparición de EICA xenogénica en ratones NOG tras inyección de CMSP empleando la puntuación de Ferrara, y se evaluó la supervivencia entre grupos: ratones que habían desarrollado xEICA sin tratar (xEICA) o tratados, o bien con SuperMApo bruto (+SuperMApo) o con SuperMApo liofilizado y resuspendido (+SuperMApo Lyo) o SuperMApo liofilizado y concentrado 5 veces (+SuperMApo Lyox5). De tres a 4 ratones por grupo.

45 Figura 9. Se trataron ratones artríticos con SuperMApo obtenido a partir de ratones DBA1 (círculos rojos, AIC + SuperMApo) o ratones C57Bl/6, fresco (círculos negros, AIC + SuperMApo B6), liofilizado y reconstituido (triángulos negros, AIC + SuperMApo B6 Lyo) o liofilizado y concentrado 5 veces (rombos negros, AIC + SuperMApo B6 Lyox5) en el día 38, y se demostró una reducción significativa y a largo plazo en términos de puntuación patológica en comparación con ratones artríticos no tratados (círculos huecos, AIC) (***) = $p < 0,001$; AIC frente a todos los grupos, ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey; A).

50 En otro experimento de artritis, ratones artríticos (AIC, círculos huecos) recibieron, o bien tratamiento con SuperMApo estándar (círculos negros, AIC + SuperMApo) o sobrenadante de cultivo de células apoptóticas (triángulos negros, AIC + ApoSup) o sobrenadante de cultivo de macrófagos (rombos negros, AIC + MacroSup) o los dos últimos tratamientos juntos (triángulos huecos, AIC + MacroSup + ApoSup) (B). Exceptuando el tratamiento con SuperMApo, los demás tratamientos no favorecieron una resolución significativa de la puntuación artrítica (***) = $p < 0,001$; AIC frente a AIC + SuperMApo, ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey). Media de 5 ratones por grupo +/- e.e.m. Resultados de 1 de 2 experimentos independientes que muestran diferencias similares.

55 Figura 10. A. Se trataron ratones artríticos (AIC, círculos huecos) en el día 34 con SuperMApo (AIC + SuperMApo,

rombos huecos) y recibieron o no anticuerpo bloqueante anti-TGF- β (α TGF- β). El anticuerpo anti-TGF- β inhibió fuertemente el efecto terapéutico de SuperMApo en la resolución de la artritis. *** = $p < 0,001$ AIC + SuperMApo frente a todos los grupos, ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. En otro experimento de artritis (B), se trataron ratones artríticos (AIC, círculos huecos) en el día 28 mediante SuperMApo (super, círculos negros) y recibieron o no anticuerpos bloqueantes anti-receptor de IL-10 (aIL10R). El anticuerpo anti-IL-10R inhibió fuertemente el efecto terapéutico de SuperMApo en la resolución de la artritis. *** = $p < 0,001$ AIC + SuperMApo frente a todos los grupos, ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. En otro experimento de artritis (C), se trataron ratones artríticos (AIC, círculos huecos) en el día 33 mediante SuperMApo (AIC + SuperMApo, círculos negros) y recibieron o no antagonista de receptor de ácido retinoico LE540 (LE540). El antagonista de ácido retinoico no inhibió el efecto terapéutico de SuperMApo en la resolución de la artritis. *** = $p < 0,001$ AIC + SuperMApo frente a todos los grupos; ** = $p < 0,01$ AIC + SuperMApo + LE540 frente a AIC + LE540; ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Media de 5 ratones por grupo +/- e.e.m.

Figura 11. Se cuantificó TGF- β en SuperMApo humano mediante ELISA y se comparó con los niveles de TGF- β en los sobrenadantes de cultivos de células apoptóticas (Apo Sup) o macrófagos (Macro Sup). Media +/- e.e.m., $n = 8$ experimentos independientes; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ (prueba t pareada).

Figura 12. Se estudió la aparición de EICA xenogénica (xEICA) en ratones NOG tras inyección de CMSP mediante la pérdida de peso entre ratones que desarrollaron xEICA sin tratar (medio; círculos negros) o que recibieron en los días 5 y 7 SuperMApo (SuperMApo; triángulos verdes) o sobrenadantes de cualquier macrófago (Macro Sup; cuadrados negros) o cultivo de células apoptóticas (Apo Sup; triángulos negros). Media +/- e.e.m., de 4 a 5 ratones por grupo. El tratamiento con SuperMApo permitió una protección contra la pérdida de peso en ratones que desarrollaron xEICA.

Figura 13. Se estudió la aparición de inflamación intestinal aguda xenogénica en ratones NOG tras inyección de CMSP y sensibilización e inyección de oxazolona, mediante la pérdida de peso entre ratones que desarrollaron colitis sin tratar (Oxa; triángulos rojos) o que habían recibido SuperMApo (SuperMApo; triángulos azules) en el momento de la inyección intrarrectal de oxazolona. Los grupos testigo son ratones que recibieron vehículo de oxazolona etanol (Eth, cuadrados negros) o PBS (círculos grises). Media +/- e.e.m., de 4 a 5 ratones por grupo. El tratamiento con SuperMApo permitió una importante prevención de la pérdida de peso en ratones que desarrollaron colitis.

Ejemplos

Se hará referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones precedentes ilustran la invención de una manera no limitante.

Ejemplo 1: Tratamiento de artritis mediante el uso de tratamiento con SuperMApo

Materiales y métodos

Inducción y puntuación de la artritis

Se inmunizaron ratones DBA/1 susceptibles por inyección subcutánea en la base de la cola con 100 μ L de colágeno bovino tipo II (200 μ g/mL; MD Bioproducts, Zurich, Suiza) emulsionado en CFA (4 mg de toxina de Mycobacterium resuspendida en 1 mL de IFA, Sigma-Aldrich). En todos los ratones se había desarrollado artritis el día 25-28 después de la inmunización con colágeno.

La gravedad de la artritis se determinó mediante examen visual diario de las patas de la manera siguiente: se puntuó cada miembro en una escala de 0-4, donde 0 = pata normal, 1 = hinchazón de un dedo, 2 = hinchazón de uno o más dedos, eritema e hinchazón grave que involucra toda la pata. La puntuación clínica para cada ratón fue el resultado de la suma de las 4 extremidades (puntuación máxima 16).

De cuatro a cinco días después de la aparición de los primeros síntomas, los ratones recibieron una dosis diaria por vía intraperitoneal de 200 μ L de SuperMApo (acrónimo de "sobrenadante de cocultivo de macrófagos y células apoptóticas", en inglés) durante 6 días consecutivos. A continuación, se evaluaron las inyecciones cada dos días. En algunos experimentos, se liofilizó SuperMApo y se reconstituyó con agua destilada concentrado 5 veces y, por lo tanto, se inyectó solo dos veces: la primera inyección al día siguiente de la aparición de los primeros síntomas y la segunda 48 horas después.

Se extrajeron los órganos linfoides en el momento del sacrificio para el análisis de células T CD4⁺ efectoras mediante FACS. También se estimularon las células T de los órganos linfoides durante 24 y 48 horas en cultivo, en presencia de colágeno (2 μ g/ml) y se evaluó mediante FACS la polarización de células T y se recogieron los sobrenadantes. La destrucción de articulaciones se determinó mediante inmunohistoquímica de las articulaciones del tobillo; se tomaron las extremidades posteriores, se descalcificaron mediante solución RDO (Eurobio, Les Ulis, Francia) y se fijaron con formalina neutra al 10%, se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m para tinción con H&S.

En algunos experimentos se neutralizó *in vivo* TGF- β utilizando anticuerpo clonal 1D11 anti-TGF- $\beta_{1,2,3}$ inyectado por vía intraperitoneal (150 μ g en el momento de la inyección de SuperMApo seguidos por 100 μ g 48 horas después), la señalización de IL-10 se neutralizó utilizando anticuerpo clonal 1 B1.2 anti-IL-10R por vía intraperitoneal (150 μ g en el momento de la inyección de SuperMApo seguidos por 100 μ g 48 horas después), la señalización de ácido retinoico se neutralizó utilizando antagonista de LE540 (6 veces cada 2 días comenzando el día del tratamiento con SuperMApo, 30 μ g cada vez, por vía oral).

Producción de SuperMApo

Se utilizaron células tímicas como células apoptóticas. Tras el aislamiento, se sometieron las células tímicas a una irradiación de 35 X-Gray y se cultivaron en medio de cultivo DMEM completo durante 6 horas para permitir que se produjera la apoptosis. Paralelamente, se aislaron macrófagos de la cavidad peritoneal, se lavaron y se cultivaron en RPMI completo (10% de FBS, Peni-Strepto, EAA, Hepes, NaP y 2-mercaptoetanol). Después se lavaron los macrófagos y las células apoptóticas y se cocultivaron durante otro período de 48 horas en medio X-vivo exento de fenol, con una proporción 1/5 de macrófagos/células apoptóticas. Luego se recogió el sobrenadante, se centrifugó para eliminar residuos y se congeló o liofilizó para conservarlo. El enriquecimiento de macrófagos se confirmó mediante FACS empleando tinción positiva para F4/80. La apoptosis se confirmó mediante FACS utilizando tinción positiva para anexina V y exclusión de 7AAD.

Cuantificación de citocinas

Se cuantificaron citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA, empleando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante: IL-1 β (eBiosciences), IL-6 (R&D Systems), TGF- β 1 (Promega, Madison, WI) y TNF (Biolegend).

Resultados

Se enriquecieron mediante adherencia a plástico (de 32 a >67% de macrófagos F4/80+, Figura 1A) y cultivo con timocitos apoptóticos, macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones. Los timocitos apoptóticos se obtuvieron a partir de células tímicas sometidas a radiación de rayos X de 40 Gray e incubadas en medio completo durante 6 horas para permitir que se produjera la apoptosis (Figura 1B). Tal como se muestra en la Figura 1B, los timocitos apoptóticos demostraron apoptosis (57%), determinada por expresión de anexina V y exclusión de 7-AAD. Se evaluó en paralelo mediante microscopía fluorescente, utilizando células apoptóticas marcadas con CFSE y macrófagos acoplados a PE y marcados con F4/80, el engullimiento de células apoptóticas por macrófagos. En el t0, se observaron macrófagos en número parecido a las células apoptóticas debido a la proporción 1/5. Más adelante, transcurridas 24 horas de cultivo, la mayoría de las células apoptóticas habían sido eliminadas. Este hecho se atestiguaba por la presencia de interacciones entre células apoptóticas y macrófagos de una manera tan temprana como ya al cabo de 6 horas de cocultivo, seguidas de engullimiento de células apoptóticas por macrófagos (6-12 horas) y de la presencia dentro de los macrófagos de restos derivados de células apoptóticas, al cabo de 24 horas.

Transcurridas 48 horas, se recogió el sobrenadante de cultivo de macrófagos/células apoptóticas (= SuperMApo) y se cuantificó en cuanto a la presencia de citocinas. Tal como se muestra en la Figura 2A, el sobrenadante estaba significativamente enriquecido en niveles de TGF- β , tanto en formas activas como latentes de TGF- β , en comparación con los sobrenadantes obtenidos, o bien de macrófagos o bien de células apoptóticas cultivadas por separado. Además, el nivel de IL-10 también se había incrementado en comparación con macrófagos cultivados solos y había aumentado drásticamente en comparación con células apoptóticas cultivadas solas (Figura 2A). En marcado contraste, las citocinas inflamatorias eran indetectables, como en el caso de IL-6, o bien se podían detectar en niveles muy bajos, como en el caso de IL-1 β y TNF (Figura 2B).

Para determinar la composición en términos de citocinas, principalmente, se realizó una matriz de citocinas en busca de la presencia de 40 factores presentados en SuperMApo. Se comparó esta con los sobrenadantes obtenidos, o bien de macrófagos cultivados solos o bien de células apoptóticas cultivadas solas, con los mismos tiempos y condiciones de medio. Así, SuperMApo reveló que la presencia de niveles acrecentados de IL-1ra, TIMP-1, CXCL1/KC y CCL2/JE/MCP1 podría estar implicada en el papel tolerogénico de SuperMApo para controlar la inflamación, además de TGF- β y IL-10. Se determinó entonces si la administración de SuperMApo sería eficaz para tratar a ratones sometidos a artritis inducida por colágeno (AIC). Así, se indujo artritis en ratones sensibles BDA1 mediante la inyección de colágeno bovino de tipo II. Al cabo de 25-26 días, se produjo artritis, atestiguada por el hinchamiento de dedos y patas. Después, en el día 30 para asegurarse de que se estaba desarrollando artritis, se inició el tratamiento con SuperMApo. Así, cuando los ratones presentaban una puntuación artrítica de 5, recibieron por vía intraperitoneal 200 μ L de SuperMApo diariamente durante 6 días y luego cada dos días, sumando un volumen total de 2 ml de SuperMApo por ratón. Este volumen corresponde al sobrenadante obtenido del cultivo de 1.10e6 macrófagos con 5.10e6 células apoptóticas. A los ratones testigo de AIC se les inyectó PBS. Se realizó un seguimiento diario de todos los ratones con AIC, y se puntuó su artritis en una escala de 0 a 4 para cada pata, como se ha descrito (Bonnefoy F *et al.*, J Immunol. 2011; 186(11): 6157).

Sorprendentemente, se observó que el tratamiento con SuperMApo era muy eficaz para controlar la gravedad de la AIC en ratones y redujo significativamente la puntuación artrítica ($p < 0,001$, prueba t pareada) (Figura 3A). Es

importante señalar que, incluso después de finalizado el tratamiento (día 44) la artritis no aumentó, y se mantuvo controlada (Figura 3A). Se repitió el mismo experimento empleando una nueva producción de SuperMApo para comparar la posología de la administración de SuperMApo. Una vez más, el efecto de SuperMApo en el desarrollo de la artritis fue sorprendente, mostrando una fuerte reducción de la patología, hasta la casi ausencia de puntuación en algunos ratones (Figura 3B). En el mismo experimento se compararon dos inyecciones (2 veces 1 ml frente a 10 veces 200 μ L) (Figura 3B, C). Además, se evaluó si la liofilización de SuperMApo podía afectar a su efecto terapéutico. Así, otro grupo de ratones con AIC recibió el mismo tratamiento que en la Figura 3B, pero obtenido de SuperMApo que había sido liofilizado, congelado y reconstituido para 10 inyecciones. Estos datos demostraron, en primer lugar, que el tratamiento con SuperMApo administrado en dos dosis es eficaz para prevenir la enfermedad (Figura 3C, D), pero no tan bueno como diez inyecciones ($p=0,008$). De manera análoga, el tratamiento con SuperMApo "liofilizado" demostró una eficacia significativa para disminuir la puntuación de AIC, en comparación con los ratones no tratados (Figura 3C, D). Sin embargo, el tratamiento liofilizado demostró una capacidad reducida en comparación con el tratamiento con SuperMApo fresco. Los autores de la presente invención también han evaluado la protección a largo plazo y la eficacia terapéutica de SuperMApo obtenido a partir de ratones C57Bl/6 para tratar ratones DBA1 que habían desarrollado AIC. Como se muestra en la Figura 9A, los ratones que recibieron SuperMApo "DBA1" liofilizado demostraron un control a largo plazo de la artritis más de 60 días después del tratamiento efectuado con solo dos inyecciones de SuperMApo liofilizado. Además, el SuperMApo "C57Bl/6" fresco, liofilizado o concentrado fue tan eficaz como el SuperMApo "DBA1" para promover un control a largo plazo de la artritis. Para determinar los factores responsables del efecto terapéutico de SuperMApo, los autores de la presente invención han comparado el tratamiento con SuperMApo con el sobrenadante obtenido a partir de cultivo de células apoptóticas, cultivo de macrófagos y la adición de estos dos últimos. Los ratones artríticos que habían recibido la suma de sobrenadantes de células apoptóticas y de macrófagos no demostraron disminución alguna de su puntuación artrítica, en comparación con los ratones que recibieron SuperMApo, lo que sugiere que los factores que presentan una actividad terapéutica se obtienen de macrófagos que eliminan células apoptóticas y no de cada tipo de célula cultivado solo (Figura 9B).

Se determinó después si las células inmunitarias implicadas en la fisiopatología de la artritis, tales como las células T, resultaban afectadas por el tratamiento. Se extrajeron leucocitos de órganos linfoides, bazo, ganglios linfáticos (GL) drenantes y GL no drenantes, y se analizaron *ex vivo* en cuanto a la presencia de células Th1, Th17 o Treg, así como después de 48 horas adicionales de cultivo en presencia de colágeno. *Ex vivo*, el porcentaje de Treg dentro de las células T CD4⁺ en el bazo había aumentado significativamente ($p=0,007$; prueba t de Student) y este aumento también se observó en la cantidad total de Treg en el bazo. En paralelo, las células Th1 y Th17 demostraron una ligera disminución tanto en porcentaje como en cantidad (Figura 4A). Esas diferencias no son evidentes en los ganglios linfáticos drenantes y no drenantes (datos no mostrados). Para observar las células T patogénicas, se cultivaron las células en presencia de colágeno durante 48 horas y se analizaron mediante FACS en cuanto a expresión de Foxp3, IFN e IL-17. Tal como se muestra en la Figura 4B, las Treg (células T Foxp3⁺ CD4⁺) habían aumentado significativamente en el bazo y las células patogénicas Th1 y Th17 demostraron una reducción porcentual también en el bazo.

Dado que las Treg habían aumentado después del tratamiento con SuperMApo, se evaluó el papel de TGF- β , IL-10 y ácido retinoico (AR) en dicho proceso. Así, se neutralizó TGF- $\beta_{1,2,3}$ empleando anticuerpo bloqueante, se neutralizó IL-10 empleando anticuerpo bloqueante de IL-10R y se neutralizó ácido retinoico empleando el antagonista de receptor de AR LE540. Tal como se muestra en las Figuras 10A, B, la neutralización de la señalización de TGF- β e IL-10 inhibió fuertemente el efecto del tratamiento con SuperMApo sobre la AIC. Sin embargo, la inhibición de la señalización de ácido retinoico (AR) no afectó al efecto terapéutico de SuperMApo (Figura 10C). Los datos sugirieron que la eficacia terapéutica de SuperMApo dependía de la inducción directa o indirecta de mecanismos dependientes de TGF- β e IL-10.

Conclusión

Estos datos demostraron que el sobrenadante de cultivo SuperMApo, obtenido a partir del cultivo de macrófagos con células apoptóticas, disminuye la inflamación cuando se inyecta en ratones. Los ratones artríticos que habían recibido dicho tratamiento demostraron una importante reducción de la patología en términos de puntuación clínica y lesiones histológicas. Esta disminución significativa está asociada con un aumento de las células T reguladoras, especialmente en el bazo. Tal tratamiento podría depender de la presencia de IL-1ra, TIMP-1, CXCL1/KC y CCL2/JE/MCP1, como se demuestra por el análisis de proteoma, así como de TGF- β e IL-10, como se demuestra mediante ELISA. En conjunto, los datos demuestran que el tratamiento con SuperMApo de enfermedades inflamatorias tales como la artritis es un tratamiento eficaz para controlar la patología. Es importante señalar que parece que se puede alcanzar la remisión completa después de optimizar el tratamiento con SuperMApo.

Ejemplo 2: El tratamiento con SuperMApo el día del trasplante retrasó la aparición de EICA y disminuyó la gravedad de la EICA

La enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA) es un efecto tóxico, y la mayoría de las veces sin salida, del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas. Este suceso se produce cuando las células T del donante, ayudadas por células presentadoras de antígeno del receptor, reconocen y destruyen tejidos del receptor. La EICA aguda se considera un proceso inflamatorio que puede conducir

a una forma crónica de EICA más asociada con características autoinmunitarias. En este contexto, se ensayó si el tratamiento con SuperMApo podría contrarrestar la inflamación y prevenir o retrasar la EICA.

Material y métodos

Modelo experimental de ratones y EICA

- 5 Tras un régimen de acondicionamiento mieloablativo (7 Gy, irradiación con rayos X) el día -1, ratones Balb/c recibieron células de médula ósea C57Bl/6 (10.10e6 células/ratón) con depleción de células T mediante el uso de tecnología MACS. Seis días después se inyectaron a los ratones receptores células T C57Bl/6 (1.10e6 células/ratón) para favorecer la aparición de EICA. Los ratones estaban alojados en jaulas microaisladoras estériles dentro de un animalario libre de patógenos, recibiendo alimentos y agua estériles a voluntad, agua que estaba complementada con neomicina (1,1 g/l), 1 día antes de la irradiación. Se realizó un seguimiento diario de los ratones receptores en cuanto a supervivencia y aparición de signos de EICA según la puntuación de Ferrara (Cooke KR *et al.* Blood. 1996; 88(8): 3230). La puntuación de Ferrara incluye la evaluación del peso, la actividad, la postura, la integridad de la piel y el pelaje de los ratones. Los ratones receptores recibieron tratamiento con SuperMApo el día del trasplante (d0) o el día de la inyección de células T (d6), comprendiendo cada 2 días inyecciones por vía intraperitoneal de 200 µL de SuperMApo, con un total de 10 inyecciones. Se produjo SuperMApo tal como se describe en el Ejemplo 1. Se sacrificaron algunos ratones el día 13 para evaluar las poblaciones inmunitarias en el bazo y los ganglios linfáticos.

Resultados y conclusión

- Los datos demostraron que los ratones que habían recibido células T desarrollaron EICA en comparación con los ratones que habían recibido médula ósea (BM) con depleción de células T (TCdBM), como atestiguan una disminución de la tasa de supervivencia (Figura 5A), la pérdida de peso (Figura 5B) y una puntuación de Ferrara superior (Figura 5C) el día 12 después del TCMH. Contrariamente a los ratones que desarrollaron EICA, los ratones tratados con SuperMApo el d0 demostraron una mejor curva de supervivencia (Figura 5A) comparable a los ratones que recibieron solamente TCdBM, una pérdida de peso menos intensa ($p < 0,05$; Figura 5B) y una disminución en la puntuación de la EICA ($p < 0,05$; Figura 5C). Así pues, el tratamiento con SuperMApo el día del trasplante favorece un entorno inmunomodulador, así como una menor sensibilidad a la EICA inducida por células T el día 6. Esto contrasta con el tratamiento con SuperMApo el día 6, con el que no se mejoró la supervivencia (Figura 5A). De hecho, los ratones demostraron una pérdida de peso y puntuación similares en comparación con los ratones que desarrollaron EICA (Figura 5B, C). Estos datos sugieren que el tratamiento con SuperMApo controla mejor la aparición de EICA cuando se inyecta antes de la inyección de células T, mientras que el tratamiento con SuperMApo en el momento de la inyección de células T parece no ser eficaz para prevenir la aparición de EICA. La mejor supervivencia y mejora de la puntuación de EICA en ratones tratados con SuperMApo en el día 0 se asocia con menos células Th1 en el bazo y un incremento de Treg dentro de los ganglios linfáticos (Figura 5D) en comparación con los ratones que habían recibido células T TCdBM+. Además, se podían observar menos células Tc1 IFN⁺ CD8⁺ en el bazo y en los ganglios linfáticos de estos ratones, en comparación con ratones que habían desarrollado EICA (Figura 5E). Los datos demuestran claramente la eficacia del tratamiento con SuperMApo para moderar la EICA.

Ejemplo 3: El tratamiento con SuperMApo humano retrasa la EICA xenogénica

- Para demostrar que el SuperMApo producido a partir de células humanas (hSuperMApo) presenta la misma eficacia para tratar la inflamación que el SuperMApo de ratón, se evaluó si el tratamiento con hSuperMApo era eficaz para contrarrestar la aparición de enfermedad de injerto contra anfitrión (EICA) en un modelo experimental xenogénico de EICA. En primer lugar se cualificó el hSuperMApo en términos de contenido de citocinas, y después se ensayó en cuanto a eficacia *in vivo*. Posteriormente se evaluó si el tratamiento con hSuperMApo podía inhibir la EICA inducida por leucocitos humanos en ratones inmunodeficientes.

Materiales y métodos

Producción de hSuperMApo

- 45 Se obtuvo SuperMApo humano del cocultivo de macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) cultivadas con CMSP apoptóticas. Para ello, se aislaron CMSP de bolsas de citaféresis de voluntarios sanos, mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. A continuación se extendieron en placas las CMSP durante 90 minutos, en medio de cultivo RPMI completo (10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomocina). Después se eliminaron las células no adherentes y se transformaron en apoptóticas mediante una dosis de 35 Gy de irradiación con rayos X, y se cultivaron en medio RPMI completo durante 4 días (incluido lavado de las células después de las primeras 48 horas de cultivo) para permitir que se produjese la apoptosis. Se cultivaron en paralelo las células adherentes en medio RPMI completo complementado con 50 µg/mL de FEC-M humano recombinante durante 4 días, incluido lavado de las células después de las primeras 48 horas. Al final del período de cultivo de 4 días se lavaron los macrófagos derivados de monocitos y las células apoptóticas, y se cultivaron juntos en medio X-vivo durante 48 horas más, con una proporción de un macrófago por 5 células apoptóticas. Después se recogió el sobrenadante de este último cultivo, se centrifugó para eliminar las células y los residuos y se congeló o liofilizó para su conservación y uso posterior.

EICA xenogénica

5 Se sometieron ratones NOG de seis a 8 semanas de edad (NOD.Cg-*Prkdc*^{3scid} *Il2rg*^{tm1Sug}/JicTac; Taconic) a una irradiación de 2 Gy por rayos X 24 horas antes de recibir una inyección por vía intravenosa de 10.10⁶ CMSP aisladas de donantes sanos. Los ratones estaban alojados en jaulas microaisladoras estériles dentro de un animalario libre de patógenos, recibiendo alimentos y agua estériles a voluntad, agua que estaba complementada con neomicina (1,1 g/l), 1 día antes de la irradiación. Se evaluó a diario la aparición de EICA según la puntuación de Ferrara (Cooke KR *et al.* Blood. 1996; 88(8): 3230). Cuando los ratones presentaron una puntuación EICA moderada se inició el tratamiento con hSuperMApo, consistente en una inyección diaria de 200 µL de hSuperMApo durante 5 días seguido de una inyección cada 2 días durante los siguientes 10 días, sumando un total de 10 inyecciones.

10 Cuantificación de citocinas

Se cuantificaron citocinas en hSuperMApo, sueros o sobrenadantes de cultivo mediante ELISA, utilizando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante: IL-1β (eBiosciences), TGF-β1 (Promega, Madison, WI) y TNF (eBiosciences).

Resultados y Conclusión

15 Este proceso permitió a los autores de la presente invención obtener hSuperMApo en 6 días a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se necesitan cuatro días para obtener macrófagos derivados de CMSP mediante la adición de FEC-M al cultivo y se necesitan 2 días más para el cocultivo de macrófagos derivados de CMSP con células apoptóticas, correspondientes a las CMSP no adherentes aisladas en el día 0. El proceso de los autores de la presente invención demostró su eficacia para producir un hSuperMApo estandarizado con independencia del donante o de la fuente de CMSP (citaféresis o capa leucocítica, datos no mostrados). En primer lugar se demostró que el paso de adherencia a plástico era suficiente para obtener una población de partida significativa de monocitos enriquecidos (de 20 a 93% de células CD14+ después de la adherencia en una placa de cultivo de plástico; Tabla 1 y Figura 6). Además, estas células adherentes demostraron una presencia muy baja de células B y T (1,0% de células B CD19+ y 12,8% de células T CD3+, Tabla 1 y Figura 6). Tras 4 días de cultivo de células adherentes en presencia de FEC-M, la proporción de macrófagos derivados de monocito había aumentado significativamente de 0,1% a 77,7% de macrófagos CD14+ CD206+ HLA-DR+ (Tabla 1). En ese momento se cocultivaron los macrófagos derivados de monocito con CMSP no adherentes apoptóticas (47,6% de apoptosis, determinado mediante tinción con anexina V y exclusión de 7AAD, Figura 6) para producir SuperMApo durante 48 horas. Se cuantificó a continuación el sobrenadante recogido, es decir, SuperMApo, en cuanto a citocinas inflamatorias y antiinflamatorias. Como se muestra en la Figura 7, SuperMApo contenía una cierta cantidad de TGF latente, significativamente más que en el sobrenadante de cultivo de macrófagos derivados de monocito solos o de macrófagos derivados de monocito tratados en condiciones inflamatorias (+ LPS). Esto se confirmó y se encontró significativo en comparación con los sobrenadantes de cultivo de células apoptóticas o macrófagos en un nuevo conjunto de producción de hSuperMApo (n = 8 producciones independientes; Figura 11). Por el contrario, SuperMApo contenía niveles traza o bajos de citocinas inflamatorias tales como IL-1β o TNF (Figura 7). En comparación con el sobrenadante obtenido a partir de macrófagos derivados de monocitos estimulados con LPS, SuperMApo contenía una cantidad significativamente menor, cercana al límite de detección, de estas citocinas inflamatorias (Figura 7). Para evaluar la eficacia de SuperMApo en la disminución de inflamación en entornos humanos, se administraron CMSP humanas a ratones NOG con el fin de inducir xenoEICA (xEICA). En el día 16 después de la inyección, 9 ratones de 24 habían muerto por EICA. Se dividieron entonces los otros 15 ratones con xEICA en 4 grupos y el día 17 se iniciaron los tratamientos con SuperMApo. Los grupos de tratamiento incluían el grupo de xEICA tratado con PBS (n= 3), tratado con SuperMApo (n=4), tratado con SuperMApo liofilizado (n=4) y grupo de xEICA tratado con SuperMApo liofilizado + concentrado 5 veces (n=4). Durante los días posteriores a los tratamientos, todavía murieron por xEICA algunos ratones en los distintos grupos (Figura 8). No obstante, en comparación con otros grupos sobrevivieron durante más de 15 días después de la aparición de xEICA 50% de los ratones en el grupo de ratones con xEICA que habían recibido SuperMApo liofilizado 5 veces (Figura 8). Este resultado sugiere que los factores que permiten la reducción/prevenición de la inflamación en el SuperMApo, quizás no estaban lo suficientemente concentrados en el SuperMApo crudo y sí suficientemente en el SuperMApo liofilizado 5 veces, lo que permite su eficacia en la prevención de xEICA. En el momento del sacrificio, había sobrevivido 1 ratón en el grupo que había recibido SuperMApo liofilizado 5 veces (Figura 8). De hecho, en un experimento adicional, los ratones que habían recibido SuperMApo concentrado demostraron una recuperación del peso que atestigua una mejor supervivencia (Figura 12). Los ratones que habían desarrollado EICA y que habían recibido sobrenadante de cultivo de macrófagos o sobrenadante de cultivo de células apoptóticas no estaban protegidos, y demostraron una continua pérdida de peso durante los días posteriores a la inyección del tratamiento correspondiente (Figura 12). En conjunto, los datos sugirieron que el tratamiento con SuperMApo demostrará ser eficaz para disminuir la inflamación en seres humanos, en particular para prevenir la aparición de EICA y aumentar la supervivencia después de TCMH.

Tabla 1.

	CMSP	Células adherentes, d0	Células no adherentes, d0	Células adherentes, d4
células T CD3 ⁺	51,1% ± 6,0	12,8% ± 8,9	63,3% ± 6,3	15,0% ± 2,4
células B CD19 ⁺	4,1% ± 1,0	1,0% ± 0,6	4,0% ± 1,2	0,1% ± 0,1
monocitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ CD206 ⁻	23,7% ± 2,6	75,2% ± 16,1	20,3% ± 4,0	4,4% ± 0,2
macrófagos CD206 ⁺ CD14 ⁺ LA-DR ⁺	0,2% ± 0,1	0,3% ± 0,3	0,1% ± 0,0	77,7% ± 2,4

se evaluaron mediante FACS las células T, B, monocitos y macrófagos en los diferentes pasos de producción de SuperMApo y se han expresado los datos como porcentaje dentro de la población total. Media +/- e.e.m. de 2 a 4 experimentos distintos.

Ejemplo 4: El tratamiento con SuperMApo humano alivió la inflamación intestinal aguda

5 Para evaluar si SuperMApo humano era capaz de controlar la inflamación en otro modelo de ratón "humanizado", se evaluó el tratamiento con SuperMApo en colitis inducida por oxazolona y etanol en ratones NOG injertados con células mononucleares de sangre periférica humana.

Materiales y métodos

Se produjo SuperMApo humano tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se controló la presencia de TGF-β en SuperMApo antes del uso.

Modelo experimental de colitis:

10 Se extrajo sangre periférica de pacientes sanos, utilizando centrifugación por densidad de Ficoll. Se aislaron CMSP humanas, se lavaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 20.10e6/ml. Se injertaron ratones NOG, de 6-16 semanas de edad, con 200 ml de la suspensión celular por inyección intravenosa. Los animales descansaron durante 7 días antes de la primera sensibilización con oxazolona.

15 Entonces se anestesiaron con isoflurano ratones NOG (5 ratones por grupo) 7 días después del injerto, se rasuró y se depiló el día 1 una zona de piel (región lumbar) de 2 x 2 cm. Se presensibilizó a los animales por aplicación tópica de 20 ml de oxazolona (4-etoximetilen-2-fenil-oxazolin-5-ona) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) al 5% en etanol al 100%. El día 8 se expuso a los ratones a 150 ml de oxazolona al 1% en etanol al 50%/H₂O mediante aplicación rectal con un catéter de balón bajo anestesia con isoflurano. Al grupo testigo se le trató con etanol en el caso de la presensibilización o etanol al 50%/H₂O en el caso de la aplicación rectal. A un grupo testigo adicional se le trató con PBS. Se inspeccionó a los ratones dos veces al día, y se les sacrificó el día 16.

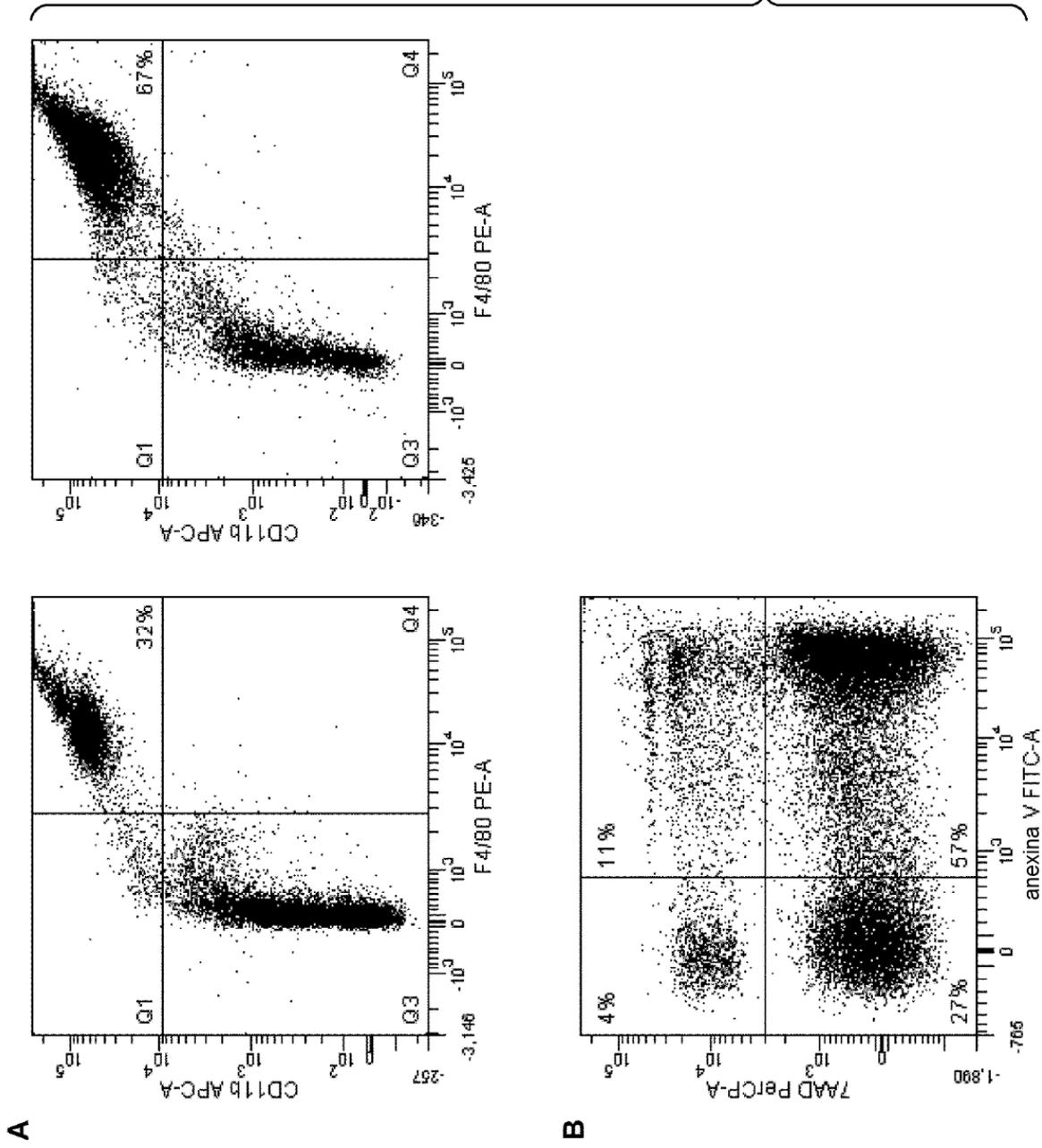
Resultados y conclusión

25 Los ratones recibieron la primera inyección de SuperMApo (PBS en el grupo testigo) una hora después de la administración intrarrectal de oxazolona, y luego cada 24 horas, con un total de 4 inyecciones (300 μl de SuperMApo o PBS en cada inyección). Los ratones que habían recibido SuperMApo demostraron una protección contra la pérdida de peso en comparación con los ratones que habían recibido PBS (Figura 13). Estos datos demostraron que SuperMApo permitió el control de la inflamación en un modelo de colitis intestinal aguda. Esto abre el área de aplicación de SuperMApo, por ejemplo en enfermedades inflamatorias intestinales para controlar la inflamación.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de una respuesta inmunitaria patológica, que comprende un sobrenadante que se puede obtener del cocultivo de fagocitos con células apoptóticas.
- 5 2. La preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en donde dicho sobrenadante se puede obtener mediante un método que comprende los pasos de:
 - a) proporcionar fagocitos,
 - b) proporcionar células apoptóticas,
 - c) lavar las células de los pasos a) y b)
 - d) cocultivar las células de los pasos a) y b),
 - 10 e) separar el sobrenadante de las células.
3. La preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde las células apoptóticas se han obtenido por inducción de apoptosis seleccionada del grupo de hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH, irradiación con rayos X, irradiación con rayos gamma, irradiación UV, privación de suero, corticoides o combinaciones de los mismos.
- 15 4. La preparación farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cocultivo tiene lugar en una solución fisiológica.
5. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células apoptóticas son leucocitos.
- 20 6. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los fagocitos y/o leucocitos se derivan de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).
7. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los fagocitos son macrófagos o células dendríticas.
8. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde se irradia el sobrenadante del paso e) en un paso adicional f).
- 25 9. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha preparación está adaptada para administración intracardíaca, administración intraarterial, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraorgánica o administración intravenosa.
10. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha preparación comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. La preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha preparación está liofilizada.
12. La preparación farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha respuesta inmunitaria patológica es una respuesta inmunitaria inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad relacionada con trasplante.
- 35 13. La preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide [AR], enfermedad inflamatoria intestinal [EII].
14. La preparación farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad relacionada con trasplante es enfermedad de injerto contra anfitrión [EICA].

FIG.1



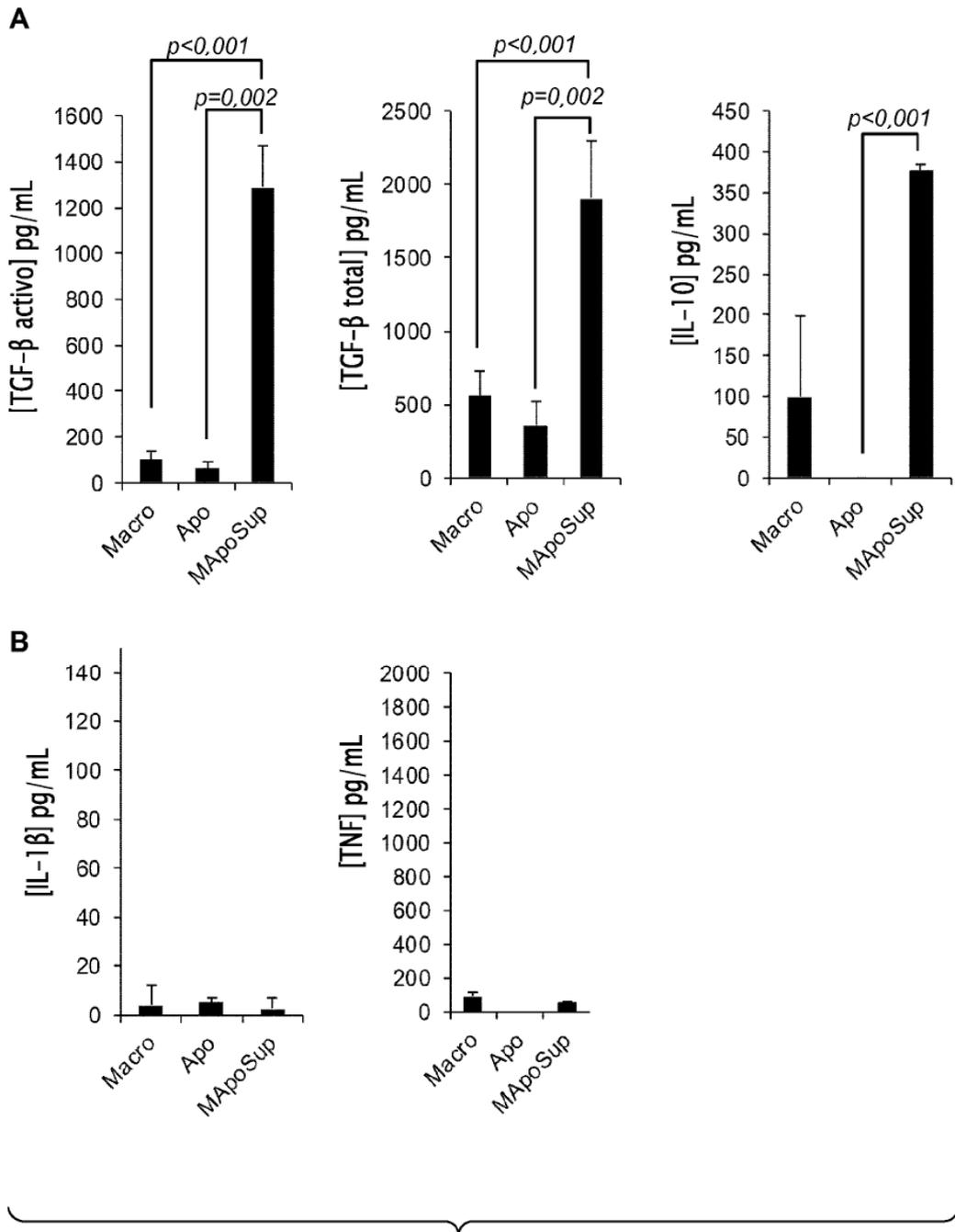
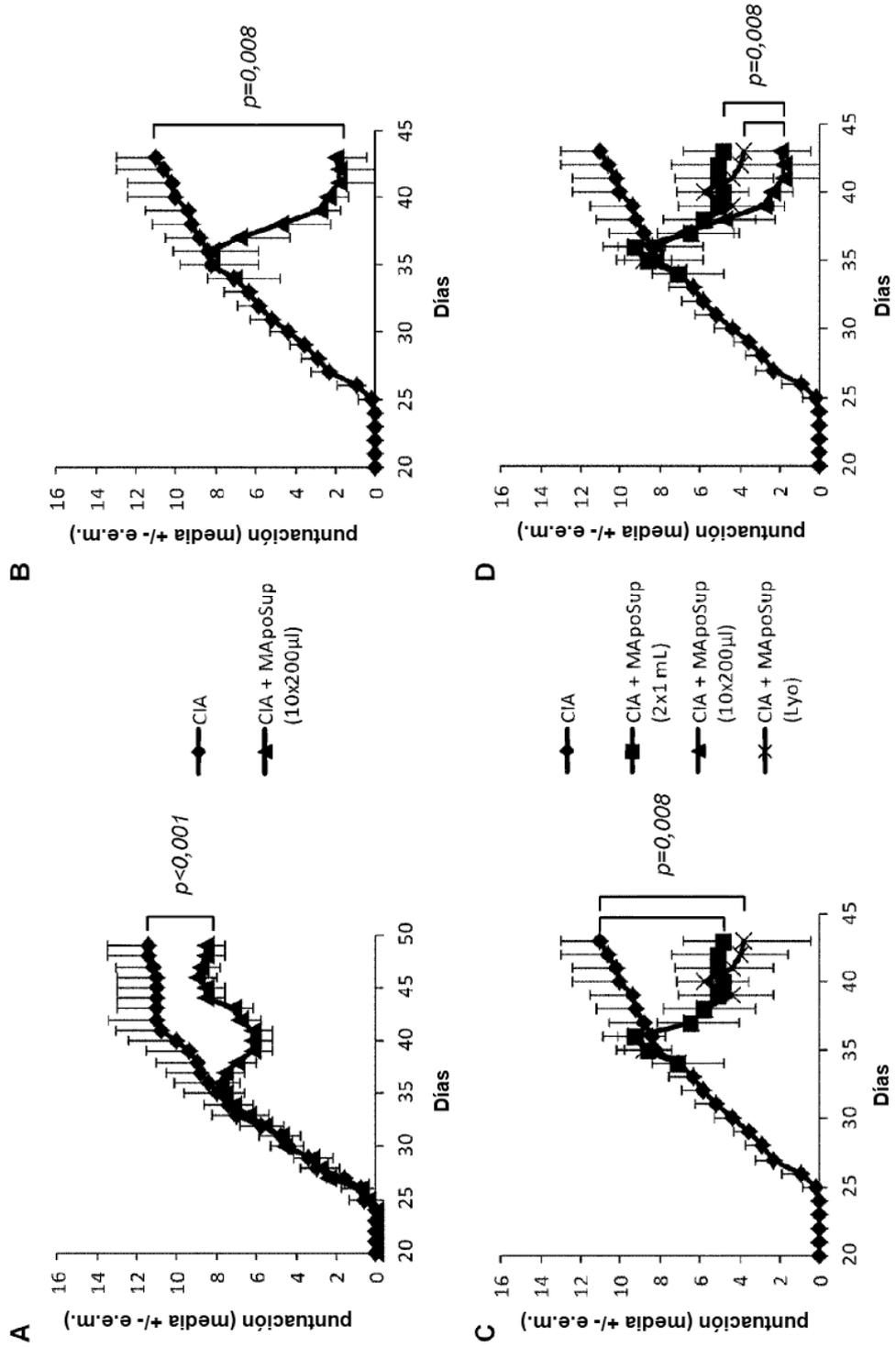


FIG.2

FIG.3



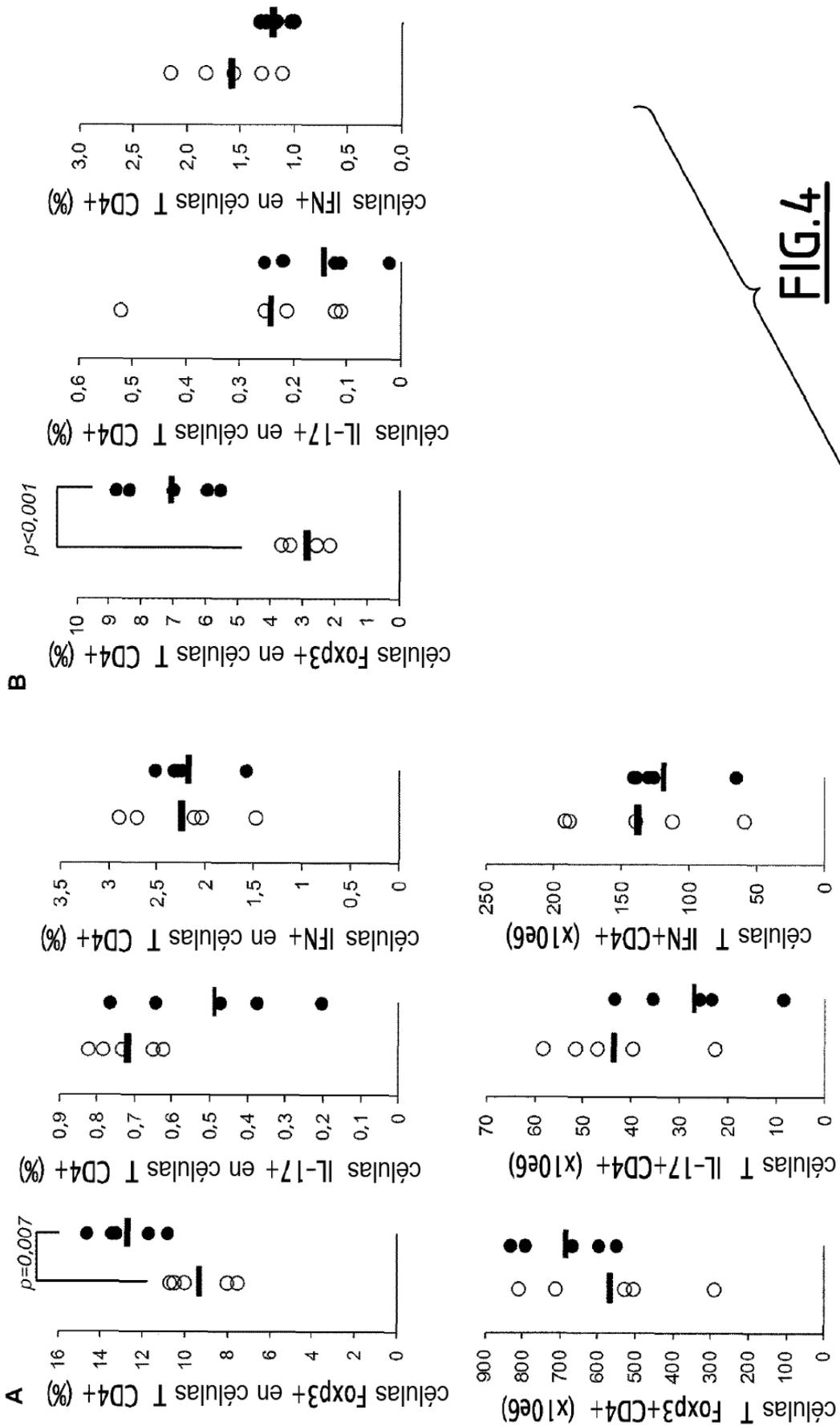
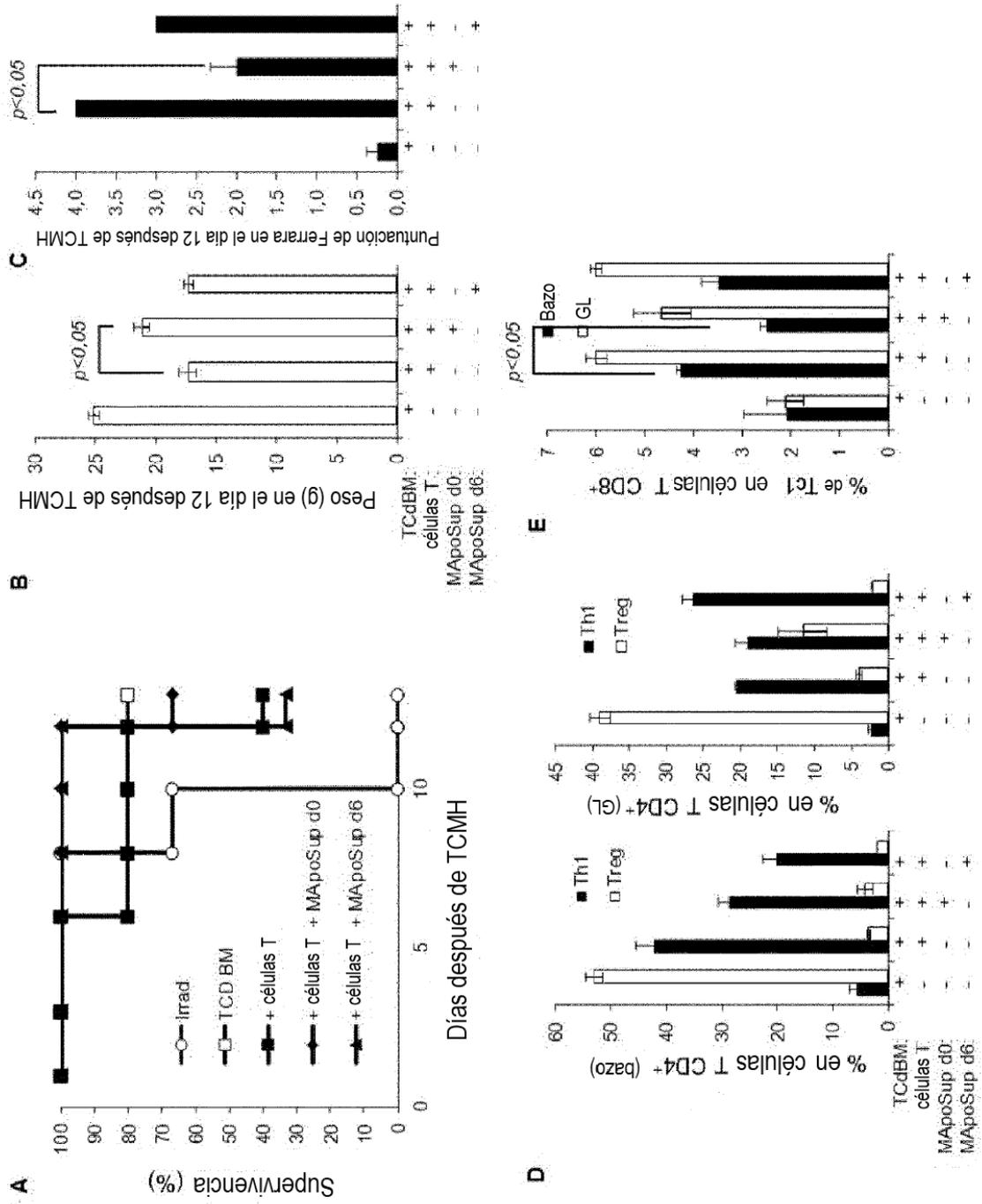


FIG.5



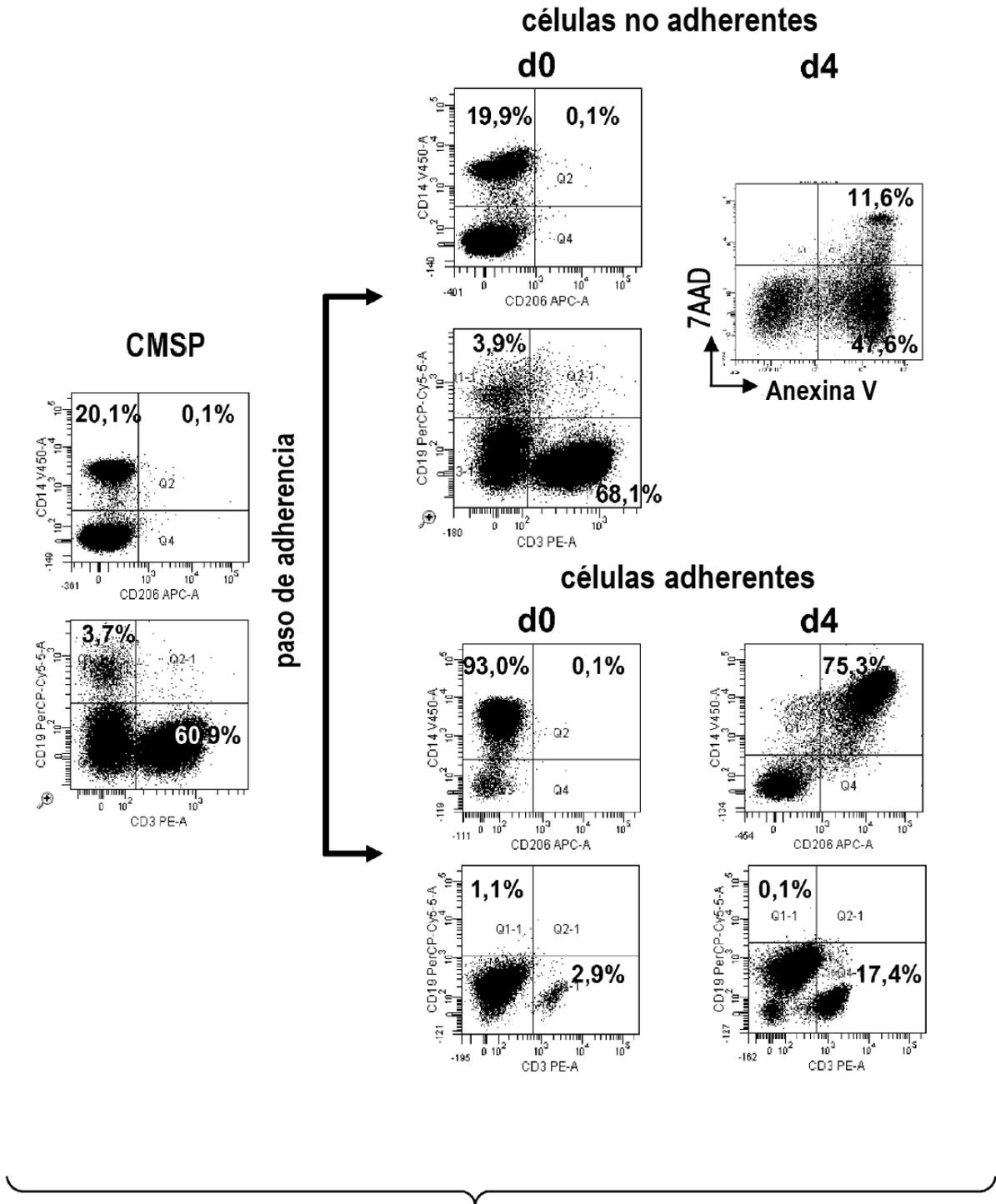


FIG.6

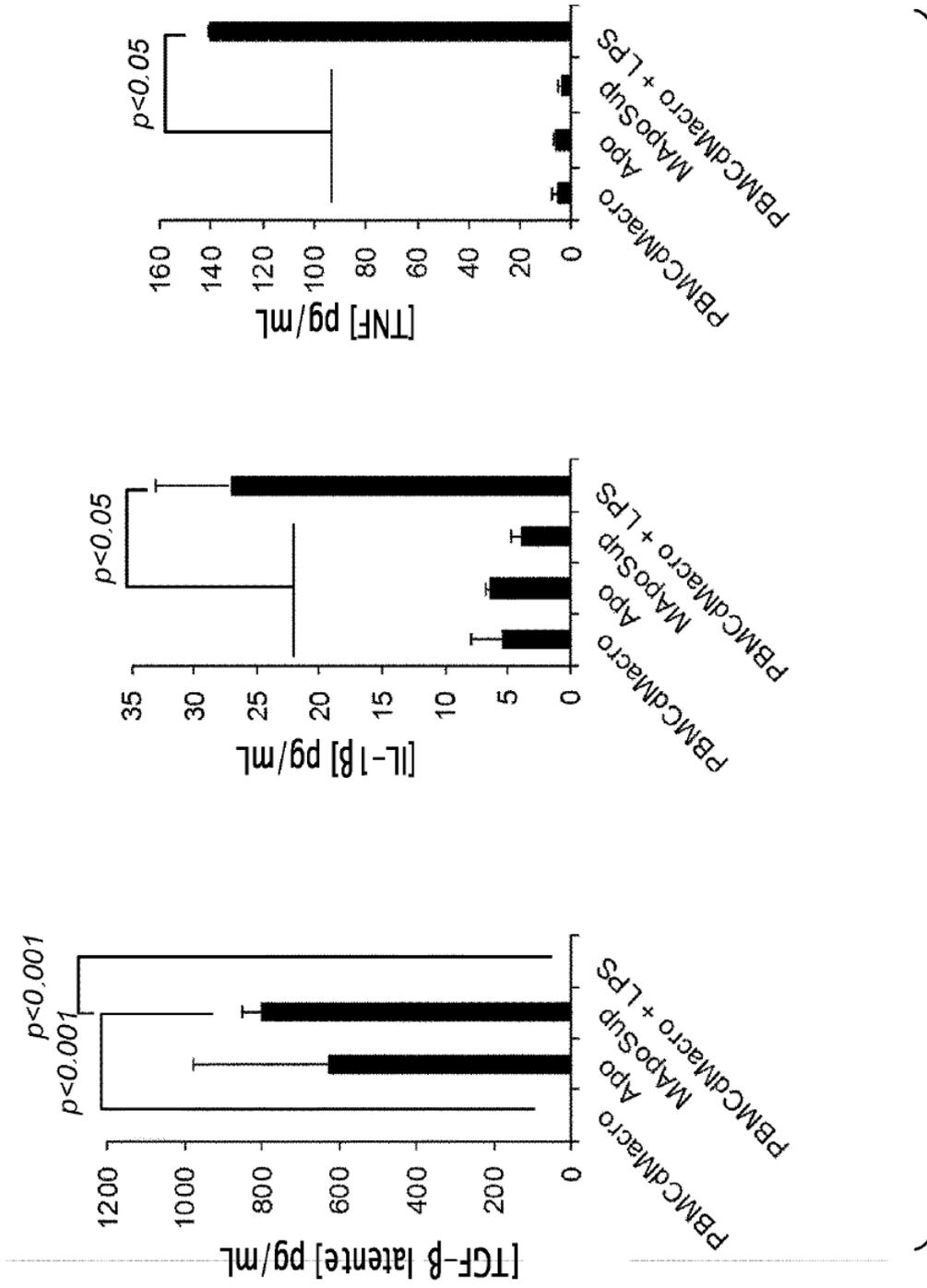


FIG.7

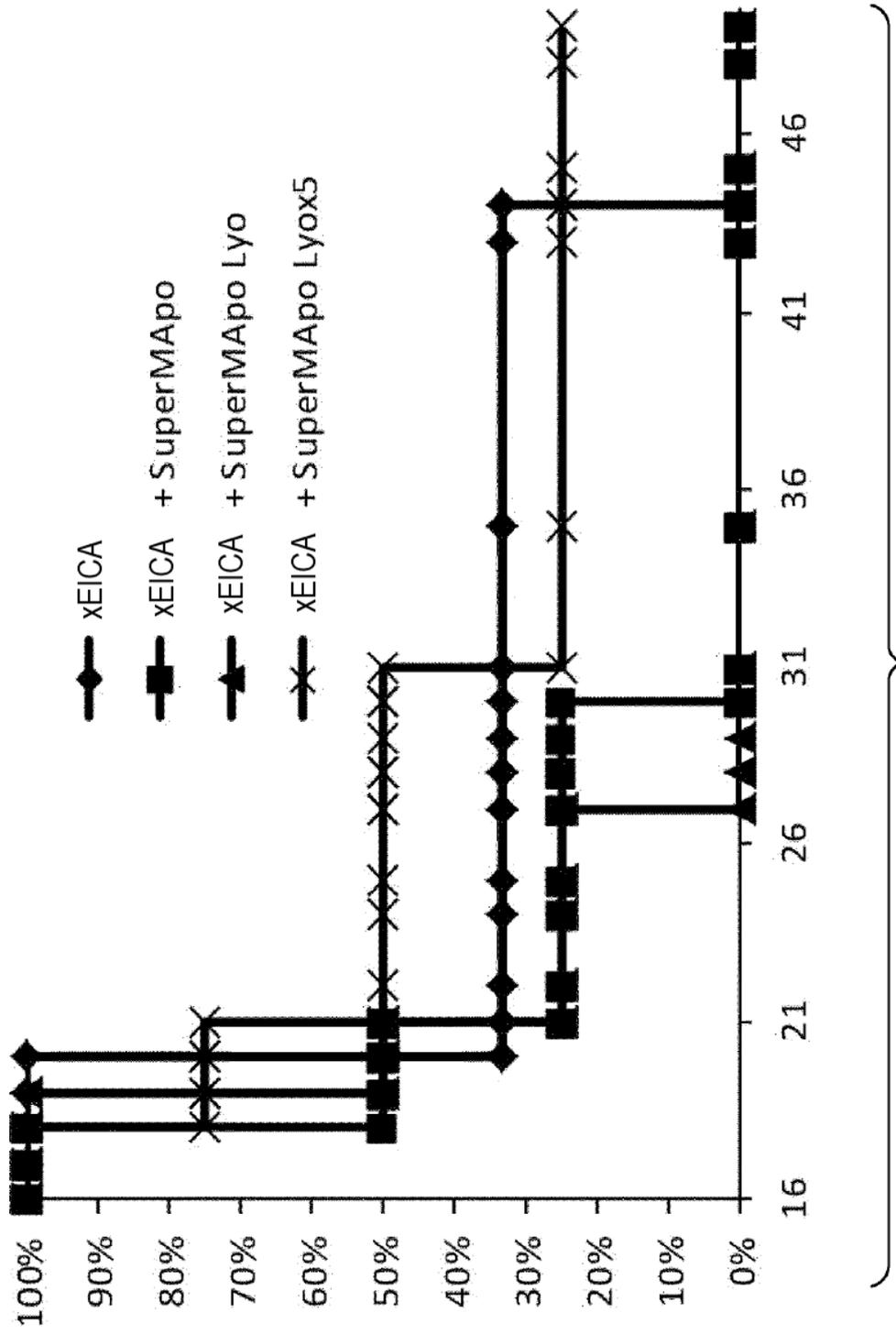


FIG.8

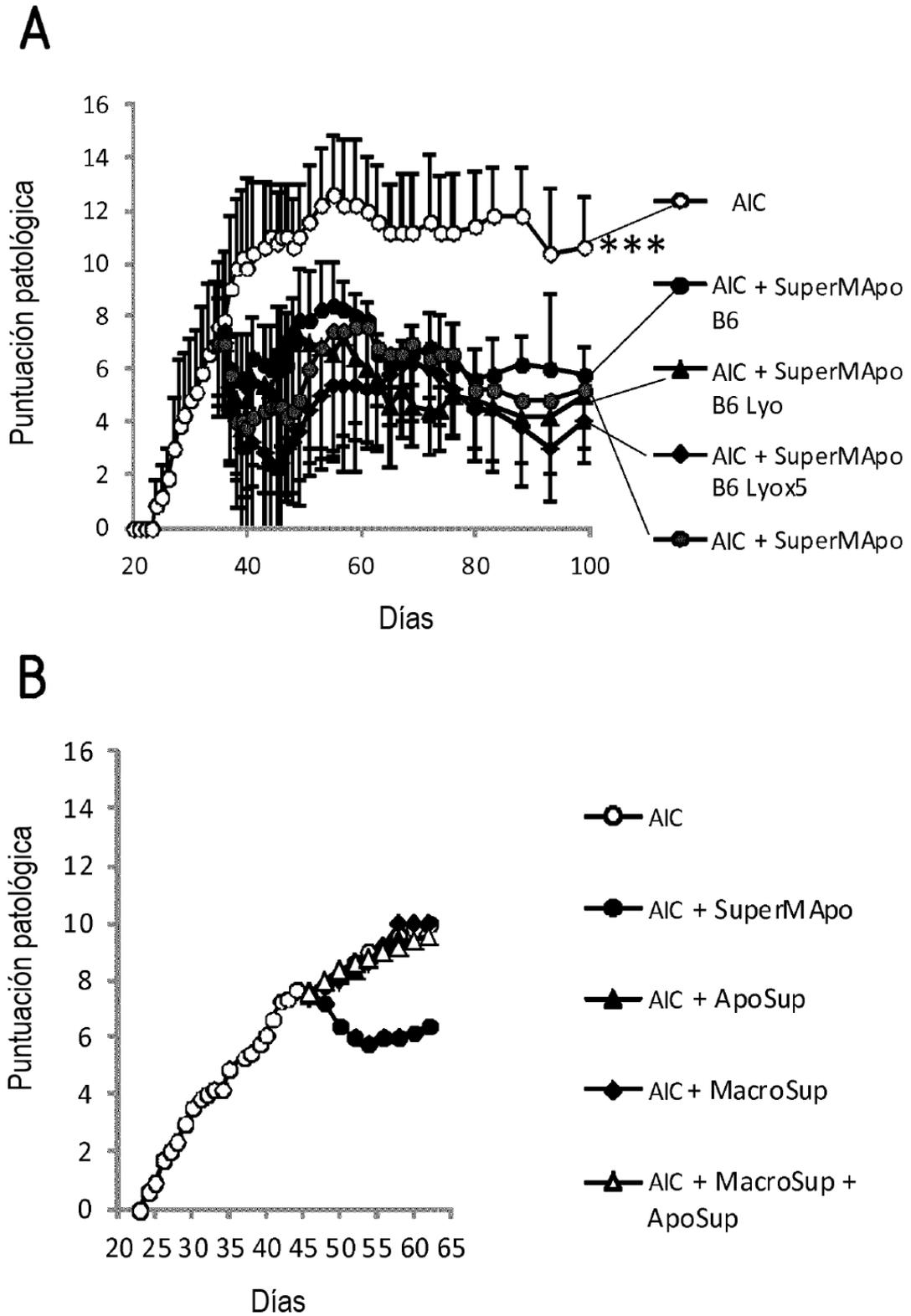


FIG.9

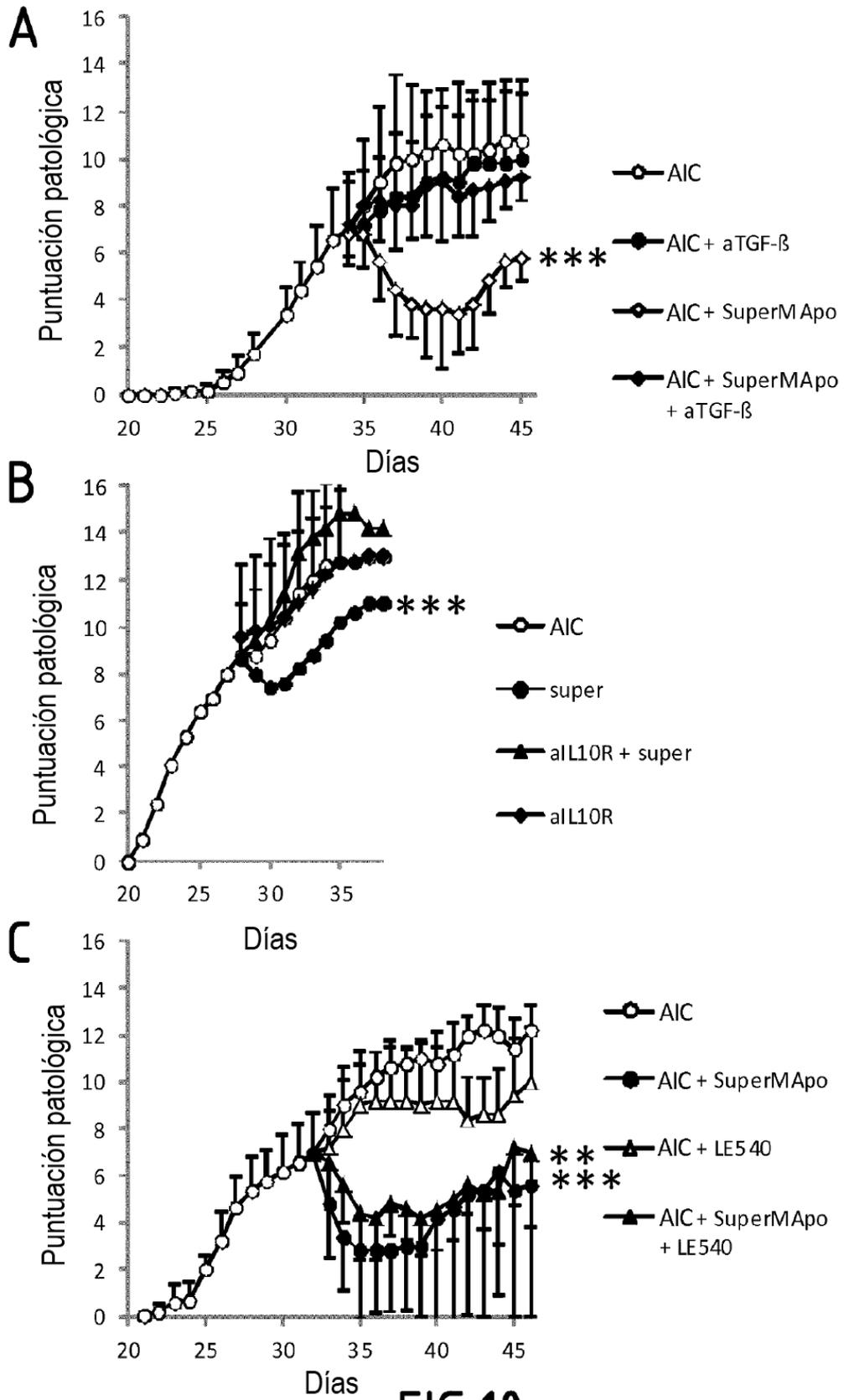


FIG.10

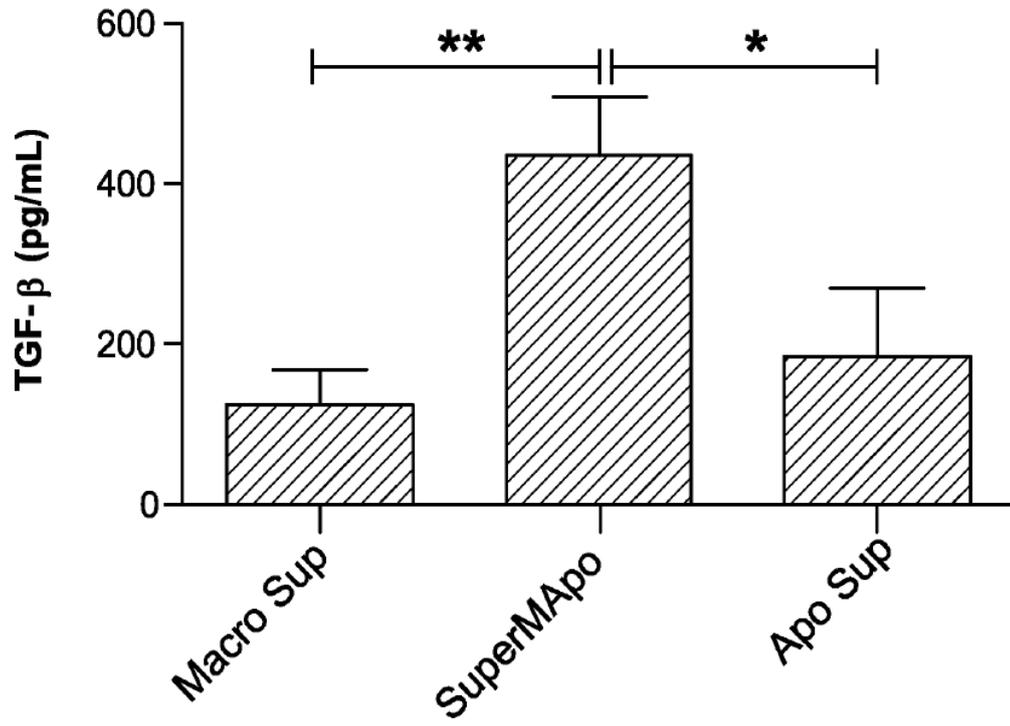


FIG.11

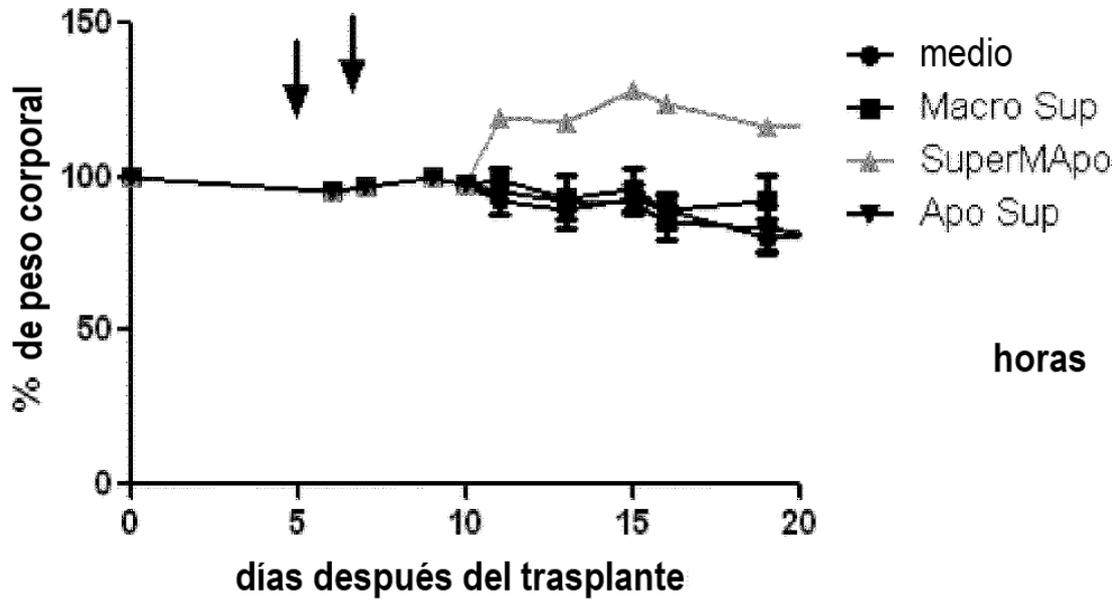


FIG.12

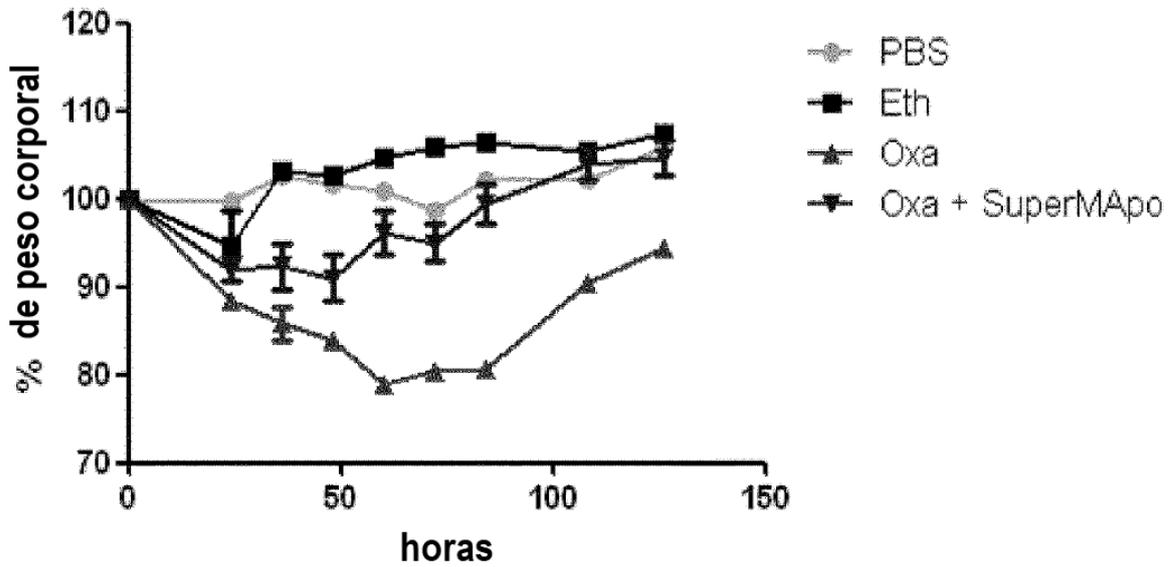


FIG.13