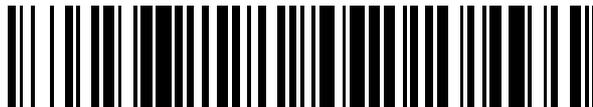


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 819**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2011 PCT/SE2011/050928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12008908**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11807152 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2593113**

54 Título: **Terapia celular**

30 Prioridad:

16.07.2010 US 364994 P

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

26.11.2019

73 Titular/es:

**TX MEDIC AB (100.0%)
Box 81
260 40 Viken, SE**

72 Inventor/es:

**KORSGREN, OLLE y
NILSSON, BO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 732 819 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 celular

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere en general a la administración de células y a técnicas para prevenir la captación no deseada de células inyectadas por vía intravenosa en los pulmones.

10 ANTECEDENTES

La inmunoterapia adoptiva para el cáncer metastásico se refiere a la transferencia autóloga o alogénica de células inmunes capaces de mediar un efecto antitumoral en el huésped portador de tumor. Los linfocitos T infiltrantes de tumores (TIL) se aíslan del tejido tumoral y se caracterizan y expanden ex vivo y se vuelven a infundir en los pacientes con cáncer. Hasta 10^9 células activadas se infunden después de un régimen de linfodepleción junto con factores de crecimiento para aumentar los efectos in vivo de las células transferidas. En pacientes con melanoma metastásico avanzado, refractarios a otros tratamientos, el 50 % ha demostrado una respuesta objetiva según los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) que se basan en mediciones radiológicas del tamaño de la lesión.

La dificultad para evaluar el tráfico celular y la distribución de células transferidas in vivo es una de las principales preocupaciones en la terapia adoptiva. El marcaje de células con radioisótopos es el método más común utilizado para estudiar las distribuciones de células in vivo. La ^{18}F -2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa ($[^{18}\text{F}]$ FDG) se ha utilizado ampliamente como un parámetro del metabolismo de la glucosa en varias células, lo que permite la visualización in vivo de células y tejidos mediante tomografía por emisión de positrones (PET) [3]. Los estudios de marcaje de los componentes de la sangre demuestran que los eritrocitos y los leucocitos incorporan y mantienen la $[^{18}\text{F}]$ FDG durante varias horas.

Inmunología Molecular (2010) 47: 2349-2358 divulga que el sulfato de dextrano de bajo peso molecular inhibió la maduración inducida por TLR4 de células dendríticas derivadas de monocitos humanos, evitó la regulación al alza de los marcadores de activación de células NK y la desgranulación de las células NK dependiente de la dosis y la secreción de $\text{IFN-}\gamma$. Se concluyó que el sulfato de dextrano de bajo peso molecular se puede usar para inhibir la activación mediada por TLR directa e indirecta de las células NK.

35 RESUMEN

Los presentes modos de realización se refieren en general a la administración de células y a técnicas para prevenir la captación no deseada de células inyectadas por vía intravenosa en los pulmones.

La invención se refiere a sulfato de dextrano para su uso tal como se define en la reivindicación 1 y a una composición de inyección intravenosa para su uso tal como se define en la reivindicación 8. Se definen modos de realización adicionales de la invención en las reivindicaciones dependientes.

La transferencia autóloga o alogénica de los linfocitos T infiltrantes de tumores es un tratamiento prometedor para los cánceres metastásicos, pero una preocupación importante es la dificultad de evaluar el tráfico y la distribución de células en la terapia celular adoptiva. Este documento presenta un método de seguimiento de la transfusión de linfoblastos T en un modelo porcino por $[^{18}\text{F}]$ FDG y tomografía por emisión de positrones.

Los linfoblastos T se marcaron con el trazador emisor de positrones $[^{18}\text{F}]$ FDG a través de la incubación. Los linfoblastos T se administraron en el flujo sanguíneo y la distribución vino seguida de una tomografía por emisión de positrones (PET) durante 120 minutos. Las células se administraron por vía intravenosa en la vena yugular interna (n=5) o por vía intraarterial en la aorta ascendente (n=1). Dos de los cerdos administrados por vía intravenosa fueron tratados previamente con sulfato de dextrano.

La cinética celular y la distribución fueron fácilmente cuantificables durante hasta 120 minutos. Una alta captación pulmonar heterogénea (78,6 % de las células administradas) se encontró después de completar la transfusión intravenosa. La captación pulmonar se redujo mediante la incubación previa y la administración conjunta de los linfoblastos T con sulfato de dextrano o administrándolos por vía intraarterial.

Los aspectos de los modos de realización están relacionados con una composición que comprende sulfato de dextrano

y linfocitos T infiltrantes de tumores proporcionados en un fluido o vehículo líquido farmacéuticamente aceptable. Esta composición es útil en el tratamiento del cáncer metastásico en un sujeto.

El presente trabajo muestra la viabilidad de supervisar y evaluar cuantitativamente el tráfico y la distribución de células después de la administración de linfoblastos T marcados con la [¹⁸F]FDG. El protocolo puede transferirse potencialmente al entorno clínico con pocas modificaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención, junto con los objetivos y ventajas adicionales de la misma, puede entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La fig. 1 ilustra la distribución pulmonar de los linfoblastos T marcados con [¹⁸F]FDG 30 minutos después de la administración intravenosa. De izquierda a derecha: vistas coronales, sagital y transaxial. El color denota la densidad celular que oscila entre 0-106 células/cc.

La fig. 2 ilustra la cinética de la captación pulmonar (como % de los linfoblastos T administrados) diferente según los modos de administración. La captación inicial fue menor cuando se administraron los linfoblastos T por vía intraarterial (n=1) o por vía intravenosa junto con sulfato de dextrano de bajo peso molecular (LMW-DS) (n=2), en comparación con la administración intravenosa (n=3). Los valores se dan como promedios ± SEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los presentes modos de realización en general están relacionados con el uso de sulfato de dextrano (DS) para inhibir o al menos reducir la captación pulmonar y la acumulación de células administradas por vía intravenosa.

La terapia celular puede encontrar aplicación en áreas muy diferentes del tratamiento médico en el cuerpo humano y animal, preferiblemente en los mamíferos. Por ejemplo, la terapia celular, en la que se administran linfocitos T u otras células inmunorreguladoras, es un tratamiento prometedor para los cánceres metastásicos. Dichas células pueden administrarse generalmente por vía intravenosa o intraarterial. Sin embargo, las inyecciones intraarteriales de células generalmente no son preferibles debido al riesgo de dañar la arteria, con graves riesgos de sangrado y complicaciones concomitantes. Por lo tanto, generalmente se prefiere la inyección intravenosa de células. Sin embargo, y como se ilustra adicionalmente en el presente documento, la inyección intravenosa de células típicamente da como resultado una alta captación pulmonar y la acumulación de las células inyectadas en los pulmones. A menudo, esto no es ventajoso a menos que las células estén destinadas a los pulmones. Por lo tanto, una gran cantidad, típicamente alrededor del 80 %, de las células inyectadas por vía intravenosa serán captadas en los pulmones y, por lo tanto, no contribuyen al efecto terapéutico deseado de las células.

Los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que el sulfato de dextrano se puede usar para reducir esta captación pulmonar en relación con la inyección intravenosa de células. De hecho, el tratamiento con sulfato de dextrano reducirá la captación pulmonar a niveles que se producen en relación con las inyecciones intraarteriales pero sin los riesgos para la salud asociados con las inyecciones intraarteriales.

Los presentes modos de realización pueden usarse en relación con cualquier inyección intravenosa de células independientemente del origen y el tipo de célula. Por lo tanto, los modos de realización pueden usarse tanto en relación con la inyección autóloga, alogénica o xenogénica de células, pero son particularmente adecuadas para la inyección intravenosa autóloga o alogénica de células.

Los ejemplos no limitativos de tipos de células que pueden inyectarse y a los que se pueden aplicar los presentes modos de realización incluyen células madre, tales como células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimáticas, células inmunorreguladoras y en particular células inmunorreguladoras aisladas del bazo. Dichas células inmunorreguladoras incluyen células T, tales como linfocitos T, células NK, células B, células reguladoras de antígenos, células presentadoras de antígenos, etc., células de médula ósea. Otros ejemplos incluyen células hepáticas, como hepatocitos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos. También las células modificadas y, en particular, las células modificadas genéticamente y las células madre modificadas genéticamente, podrían beneficiarse de la presente invención. Dichas células modificadas tienen entonces al menos un gen incorporado que codifica una proteína diana para ser expresada en un paciente por las células modificadas genéticamente. Otra variante del tipo de célula son las células a las que se unen moléculas terapéuticas, partículas, compuestos, virus, etc. Estas moléculas, partículas, compuestos, virus, etc. unidos pueden ejercer una función intencionada, como la función terapéutica, en el cuerpo del paciente. Los modos de realización pueden usarse realmente en conexión con cualquier tipo de célula que

se quiera administrar a un cuerpo humano o animal mediante inyección intravenosa. En general, cuanto mayor sea el tamaño de las células, es decir, el diámetro de las células, incluidas las fijaciones en la superficie de las células, mayor cantidad de células serán absorbidas por los pulmones. Por lo tanto, los presentes modos de realización son particularmente adecuados para su uso con dichos tipos de células más grandes.

5

Las células generalmente se inyectan en un vehículo líquido o líquido, es decir, una solución inyectable. Según los modos de realización, se puede usar cualquiera de las soluciones de inyección conocidas y empleadas de este tipo que pueden usarse junto con células vivas. Los ejemplos de soluciones de inyección conocidas que se pueden usar incluyen solución salina fisiológica (NaCl (ac)), soluciones tampón, como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución tampón de ácido cítrico, etc. Por ejemplo, el sulfato de dextrano de los modos de realización se puede disolver en una solución salina, tal como una solución salina de 0,9 % de NaCl, y posteriormente se tampona con 75 mM de ácido cítrico y se ajusta el pH a aproximadamente 5,9 con hidróxido de sodio.

10

En el tratamiento terapéutico de mamíferos, y especialmente de seres humanos, el sulfato de dextrano y sus sales, pueden administrarse solos, pero generalmente se administrarán como una formulación farmacéutica en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que se puede seleccionar con la debida consideración a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Como se ha mencionado anteriormente, el sulfato de dextrano se añade ventajosamente a las soluciones de inyección con las células antes de la inyección y, por lo tanto, se coadministra junto con las células. En dicho caso, el sulfato de dextrano se premezclará e incubará junto con las células antes de la instancia de inyección real.

15

El sulfato de dextrano se puede administrar según diversos modos de realización. En una realización actualmente preferida, el sulfato de dextrano se añade a la solución de inyección junto con las células, de modo que las células se administran conjuntamente por vía intravenosa junto con el sulfato de dextrano. En un enfoque alternativo, las células se inyectan por vía intravenosa por separado de una inyección intravenosa de sulfato de dextrano disuelto en una solución adecuada, tal como la misma solución de inyección que se ha utilizado para las células. El sulfato de dextrano se inyecta entonces ventajosamente en sustancialmente el mismo sitio que las células y preferiblemente inmediatamente antes y/o inmediatamente después de la inyección intravenosa.

25

Además, o de forma alternativa, el sulfato de dextrano puede administrarse en forma de infusión continua a lo largo del tiempo, comenzando en el momento de la inyección celular, poco después de la inyección celular o incluso algún tiempo, como hasta una hora o unas pocas horas, antes de la inyección celular. La infusión puede durar, por ejemplo, de diez minutos a 10 horas, típicamente de 20 minutos a 5 horas o incluso menos, después de la inyección celular. En lugar de usar una infusión continua, el sulfato de dextrano puede administrarse en múltiples instancias de tiempo separadas, comenzando antes o en el momento de la inyección celular y, posteriormente, continuando con las administraciones separadas de sulfato de dextrano hasta unas pocas horas después de la inyección celular.

30

La administración conjunta de dextrano y las células se puede complementar con la administración de sulfato de dextrano antes y/o después de la inyección conjunta de sulfato de dextrano y las células, o se puede complementar con una infusión de sulfato de dextrano tal como se describe anteriormente.

35

El sulfato de dextrano, y sus sales, pueden administrarse por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, bucal, rectal, dérmica, nasal, traqueal, bronquial, tópica, por cualquier otra vía patentada o por inhalación, en forma de una preparación farmacéutica que comprende el ingrediente activo en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Los protocolos de administración preferidos incluyen inyecciones intravenosas e infusiones más largas.

40

El sulfato de dextrano, o sus sales, empleados según los modos de realización pueden tener un peso molecular desde sulfato de dextrano de bajo peso molecular (LMW-DS), por ejemplo, desde unos pocos cientos o miles de Dalton (Da), hasta sulfato de dextrano de alto peso molecular (HMW -DS), generalmente con un peso molecular promedio de más de 500 000 Da, por ejemplo, > 1 000 000 Da. El efecto ventajoso del sulfato de dextrano es especialmente importante para el LMW-DS. El LMW-DS generalmente tiene un peso molecular promedio inferior a 20 000 Da, tal como inferior a 10 000 Da y, por ejemplo, alrededor de 8 000 Da, 7 000 Da, 6 000 Da o preferiblemente alrededor de 5 000 Da. El contenido promedio de azufre para el LMW-DS puede ser de aproximadamente del 10 a 25 %, tal como del 15 a 20 %, por ejemplo, aproximadamente el 17 %, correspondiente a aproximadamente 2 grupos sulfato por residuo de glucosilo. Para el sulfato de dextrano con un peso molecular promedio superior a 20 000 Da, se podría emplear un mayor contenido de azufre. El experto en la materia sabe que un peso molecular para el sulfato de dextrano es un peso promedio. Esto implica que los pesos de las moléculas de sulfato de dextrano individuales se distribuirán alrededor del peso promedio.

45

El sulfato de dextrano según los modos de realización puede proporcionarse como una sal farmacéuticamente

50

55

60

aceptable de sulfato de dextrano. Dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen una sal de sodio de sulfato de dextrano.

- Los intervalos de dosis adecuados para el sulfato de dextrano pueden variar según el tamaño y el peso del paciente, la afección por la que se trata al paciente y otras consideraciones. El sulfato de dextrano se puede administrar a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg/kg, preferiblemente de 0,5 a 20 mg/kg. Los ejemplos no limitativos incluyen 1 a 2,5 mg/kg de peso corporal, tal como aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, también son posibles concentraciones mayores, tal como más de 5 mg/kg, por ejemplo, de 5 a 15 mg/kg.
- 10 El médico puede determinar la concentración pertinente de sulfato de dextrano en el medicamento administrado y la cantidad de sulfato de dextrano a administrar a un sujeto. Como es bien sabido en la técnica, el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) se usa como una representación de la concentración de sulfato de dextrano en el sujeto, tal como en la sangre o el plasma del sujeto. El APTT se puede usar como medida de seguridad para que la administración del sulfato de dextrano de la presente invención no exceda los niveles de APTT predefinidos que se consideran seguros. Por ejemplo, después de una administración de sulfato de dextrano, se logra con seguridad un APTT de aproximadamente 250 s en pacientes humanos. Además, en entornos de xenotrasplantes, las administraciones de sulfato de dextrano que causan un APTT muy superior a 250 s se han empleado en la técnica. Además, como se presenta en la sección experimental, la infusión de sulfato de dextrano para alcanzar un nivel de APTT de 150 s se puede emplear de manera segura incluso durante largos períodos de infusión de aproximadamente 5 horas.

Un aspecto de los modos de realización está relacionado con el sulfato de dextrano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en la reducción, prevención o inhibición de la captación pulmonar de células inyectadas o administradas por vía intravenosa.

- 25 En el presente trabajo se muestra que los linfoblastos T marcados con [¹⁸F]FDG infundidos se acumularon en los pulmones y que la captación podría reducirse ya sea cambiando el modo de administración o mediante la administración conjunta de LMW-DS. Se ha demostrado una adherencia similar de los linfocitos T al tejido pulmonar después de la transferencia adoptiva en un modelo murino, en el que se demostró que la localización pulmonar de las células Th1 es parcialmente dependiente de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) [4].

La gran captación inicial en los pulmones después de la administración intravenosa parece ser un efecto de primer paso. Los linfoblastos T administrados se retuvieron en los pulmones durante el paso inicial a través del sistema pulmonar antes de tener la posibilidad de distribuirse por todo el cuerpo. El modo de infusión intraarterial se diseñó para evitar este procedimiento, permitiendo así que una mayor cantidad de linfoblastos T se distribuyera en el resto del cuerpo. El hecho de que este modo de administración disminuya la acumulación en el pulmón apoya la hipótesis del efecto de primer paso.

Se obtuvo un efecto similar cuando los linfoblastos T se administraron conjuntamente por vía intravenosa junto con LMW-DS a un cerdo pretratado. Se especula que la adición de DS aumentó la expresión de ligandos relacionados con los receptores de alojamiento y quimiocinas en el plasma, lo que a su vez incrementó la expresión de los receptores de la superficie celular como CXCR4, VLA 4, 5 y P-selectina, entre otros, lo que conduce a una movilización celular mejorada. Esto podría explicar la retención pulmonar más corta de los linfoblastos T tratados con LMW-DS que se encuentran aquí.

45 Los linfocitos específicos del tumor expresan una multitud de quimiocinas y receptores de alojamiento y el precondicionamiento de las células con LMW-DS antes de la transferencia adoptiva podría ser una forma de mejorar las capacidades de alojamiento de las células efectoras en el tejido periférico.

50 Hubo dos niveles diferentes de heterogeneidad de la distribución pulmonar. En primer lugar, hubo una gran diferencia en la captación entre los aspectos ventral y dorsal de los pulmones. En segundo lugar, la captación dorsal no fue homogénea, sino que se encontró un porcentaje considerable de los linfoblastos T en los pulmones en los puntos críticos con alta densidad celular dependiendo del modo de administración.

55 La asimetría ventral-dorsal se debió simplemente a efectos gravitatorios, ya que el animal está en posición supina durante el procedimiento de examen. El segundo tipo de heterogeneidad, la tendencia a que los linfoblastos T se acumulen en los puntos críticos, aumentó proporcionalmente con la captación pulmonar total y puede estar relacionado con una propiedad intrínseca de los mecanismos de adhesión celular al tejido pulmonar.

60 Aunque la amplitud de la captación pulmonar varió entre los modos de administración, la cinética del lavado fue similar

y dependiente de la concentración. El lavado de los pulmones se debió principalmente a los linfoblastos T que abandonaron el tracto pulmonar a través del flujo sanguíneo por pérdida de adherencia, suponiendo que la retención de [¹⁸F]FDG en los linfoblastos T transfundidos fuera tan alta como la que se midió in vitro.

5 En conclusión, al considerar estos resultados en relación con la transferencia adoptiva de TIL, la reducción de la captación pulmonar inicial da como resultado un mayor porcentaje de células distribuidas en el resto del cuerpo. Esto es especialmente importante cuando se consideran tejidos diana distintos de las metástasis pulmonares, así como para reducir el riesgo potencial de efectos respiratorios adversos. El protocolo puede transferirse potencialmente al entorno clínico con pocas modificaciones.

10

Por lo tanto, un aspecto adicional de los modos de realización se refiere a una composición que comprende sulfato de dextrano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y linfocitos T infiltrantes de tumores proporcionados en un fluido o vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como una solución de inyección farmacéuticamente aceptable. Esta composición es adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer metastásico y, por lo tanto, puede

15 usarse para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer metastásico.

Los ejemplos no limitativos de cánceres metastásicos en los que se puede usar o tratar la composición incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), síndromes mielodisplásicos (MDS), trastornos mieloproliferativos (MPD), linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin
20 (EH), leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), leucemia mieloide crónica juvenil, neuroblastoma, cáncer de ovario y tumores de células germinales. Otras enfermedades del cáncer incluyen la leucemia de células pilosas (HCL), la leucemia promielocítica aguda (APL) y otros mielomas, leucemias y linfomas.

Otras variantes de cánceres metastásicos pueden seleccionarse de entre los ejemplos que se presente a continuación,
25 que incluyen, entre otros, sarcomas humanos o carcinomas, p. ej. fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma
30 papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, hemangioblastoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y
35 leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia linfocítica crónica); policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, o enfermedad de cadena pesada.

40 El tratamiento o la inhibición de un cáncer metastásico también abarca la capacidad de la composición de reducir el número de células cancerosas metastásicas y/o la capacidad de división metastásica y/o celular de estas células cancerosas.

EXPERIMENTOS

45

En este estudio, presentamos un método para supervisar la transfusión de linfoblastos T in vivo en un modelo porcino mediante imágenes de PET. Los linfoblastos T porcinos se marcaron con [¹⁸F]FDG antes de la administración, y la cinética y la biodistribución de las células se supervisaron durante hasta 2 horas. La [¹⁸F]FDG es un análogo funcional a la glucosa, pero no puede ser metabolizada más allá de la fosforilación inicial por la hexocinasa y está atrapada en
50 el citoplasma celular. Nuestro grupo ha aplicado el mismo concepto al trasplante de imágenes de islotes de Langerhans en un modelo porcino [1] y en el entorno clínico [2, 3].

En el presente trabajo, se compararon tres modos de administración; administración intravenosa con o sin coadministración del complemento e inhibidor de la coagulación de sulfato de dextrano de bajo peso molecular (LMW-
55 DS), y administración intraarterial.

Materiales y métodos

Aislamiento de linfoblastos T porcinos

60

Los bazos de cerdos de tres meses de edad se resecaron quirúrgicamente y se almacenaron en PBS para su preparación inmediata. Los bazos se cortaron en fragmentos más pequeños y se trituraron primero contra una malla de acero de 1 mm y, por segunda vez, con un émbolo de goma para jeringa contra una malla de nailon fina. El tejido se resuspendió en PBS y los linfoblastos T se aislaron utilizando la centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). Todos los linfoblastos T se activaron con PHA (1 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para simular el entorno clínico de los linfocitos infiltrantes de tumores transferidos de forma adoptiva.

Transfusión de linfoblastos T

Los linfoblastos T se suspendieron en 10-15 ml de PBS y se administraron durante 10 minutos por vía intravenosa en la vena yugular interna (n=5) o por vía intraarterial en la aorta ascendente (n=1). Dos de los cerdos administrados por vía intravenosa fueron tratados previamente con LMW-DS (4,5 mg/kg) (Apoteket AB, Umeå, Suecia). Los linfoblastos T fueron en estos dos casos coadministrados por vía intravenosa junto con LMW-DS (9 mg/kg, seguido de una infusión continua de 7,2 mg/kg/h).

Marcaje de linfoblastos T y retención in vitro

La [¹⁸F]FDG (t_{1/2}=109,8 min) se preparó según los procedimientos estándar (TRACERlab FxFDG, GE Medical Systems, EE. UU.). Las células se incubaron con [¹⁸F]FDG en 7-10 ml de PBS durante 60 minutos a 37°C antes de lavarse para eliminar el exceso de radioactividad.

La retención (la tasa de lavado del trazador a través de los GLUTS después de la desfosforilación de la [¹⁸F]FDG-6P) se midió por triplicado en 6 puntos de tiempo diferentes durante 120 minutos y la semivida de retención se estimó ajustando los datos a una curva monoexponencial.

Exámenes por PET

Se examinaron seis cerdos por PET después de la administración de linfoblastos marcados con [¹⁸F]FDG. Se usó un escáner GE Discovery ST PET/CT (n=3) o un escáner Hamamatsu SHR-7700 (n=3). Las secuencias dinámicas se adquirieron sobre los pulmones y el hígado hasta durante 120 minutos. Los datos cinéticos obtenidos se expresaron como el número absoluto de células o el porcentaje de células administradas. Los resultados se dan como promedios ± SEM.

Resultados

Aislamiento, marcaje y retención in vitro de linfoblastos T

Hasta 10⁹ linfoblastos T podrían recuperarse de cada bazo con el método descrito. 500-1000 millones de linfoblastos T fueron marcados con [¹⁸F]FDG de 10,6-53,1 MBq, con un promedio de 25,6±6,7 MBq. Los linfoblastos T porcinos tenían una semivida de retención de [¹⁸F]FDG de 319 minutos (R²=0,99). Por ejemplo, el 94 % del marcaje estaba contenido a los 30 minutos y el 77 % a los 120 minutos.

Examen por PET de los linfoblastos T transfundidos

Después de las 6 transfusiones, la mayor parte de la captación inicial se encontró principalmente en los pulmones. La distribución de los linfoblastos T marcados en los pulmones fue heterogénea después de 30 minutos con partes del injerto ubicadas en pequeños puntos críticos con alta densidad celular (Fig. 1). Los puntos críticos se mantuvieron después de 120 minutos, aunque la captación total había disminuido. La mayor captación pulmonar se encontró dorsalmente y esta asimetría en la distribución se encontró similar para todos los modos de administración.

La cinética de los linfoblastos T marcados en los pulmones después de las transfusiones se presenta en la Fig. 2. La captación pulmonar relativa varió entre los modos de administración, con la captación promedio más alta después de la administración intravenosa (78,6 % de los linfoblastos T administrados) en la transfusión completa. La administración conjunta de LMW-DS durante la administración intravenosa redujo la captación a un promedio del 36,6 %. La captación pulmonar de linfoblastos T fue más baja (29,4 %) después de la administración intraarterial.

La concentración y la cantidad total de células atrapadas en el tejido pulmonar podrían cuantificarse. La tabla 1 presenta la cantidad de linfoblastos T en los pulmones a los 30 minutos. Entre 80 y hasta 635 millones de células (de 16 a 79 % de los injertos) quedaron atrapadas en el tejido pulmonar después de la administración. Para cuantificar la

cantidad de células atrapadas en los puntos críticos, definimos dos niveles de densidad: puntos críticos con una densidad celular de más de 250,000 celdas/cc (densidad moderada) o de más de 500,000 celdas/cc (alta densidad).

Tabla 1 - La densidad y la heterogeneidad de los linfoblastos T en los pulmones a los 30 minutos variaron con el modo de administración. La presencia de puntos críticos aumentó en paralelo con la captación pulmonar total.

Modo	Administrado (10 ⁶ células)	Cantidad total en pulmones (10 ⁶ células)	% de células en los pulmones	Zonas con densidad moderada (10 ⁶ células)	Zonas de alta densidad (10 ⁶ células)	Densidad máxima (10 ⁶ células/cc)
Intravenoso	520	411,51	79,1	184,6	170,62	2,05
Intravenoso	1000	635,43	63,5	441,79	389,55	2,23
Intravenoso	560	172,36	30,8	101,74	67,75	0,99
Intraarterial	560	96,68	17,3	26,08	0	0,42
LMW-DS	500	81,47	16,3	27,7	0	0,49
LMW-DS	900	285,77	31,8	155,21	111,3	1,14

Se encontraron entre 67-389 millones de células (39-61 % de la captación pulmonar) en los puntos críticos de alta densidad después de la administración intravenosa. La cantidad de células en los puntos críticos de alta densidad fue menor después de la administración conjunta de LMW-DS (0-111 millones de células, o 0-39 %) y no existió después de la administración intraarterial. Se observó un patrón similar para los puntos críticos de densidad moderada. La densidad máxima observada fue de más de 2 millones de células/cc.

Los modos de realización descritos anteriormente han de entenderse como unos pocos ejemplos ilustrativos de la presente invención. Los expertos en la técnica entenderán que pueden hacerse diversas modificaciones, combinaciones y cambios en los modos de realización sin apartarse del alcance de la presente invención. En particular, pueden combinarse diferentes soluciones parciales en los diferentes modos de realización en otras configuraciones, cuando sea técnicamente posible.

20 REFERENCIAS

- [1] Eich, T., Eriksson, O., Sundin, A., y col., Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. *Transplantation*, 2007. 84(7): págs. 893-8
- [2] Eich, T., O. Eriksson, y T. Lundgren, Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography. *N Engl J Med*, 2007. 356(26): págs. 2754-5
- [3] Eriksson, O., Eich, T., Sundin, A., y col., Positron Emission Tomography in Clinical Islet Transplantation. *Am J Transplant*, 2009. 9(12): págs. 2816-24
- [4] Dixon, AE, Mandac, JB, Martin, PJ, y col., Adherence of adoptively transferred alloreactive Th1 cells in lung: partial dependence on LFA-1 and ICAM-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279(3): págs. L583-91

REIVINDICACIONES

1. Sulfato de dextrano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en la reducción del riesgo de efectos respiratorios adversos causados por la captación pulmonar de células inyectadas por vía intravenosa en un sujeto.
2. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que dichas células inyectadas se seleccionan de entre células autólogas inyectadas y células alogénicas inyectadas.
3. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dichas células inyectadas se seleccionan de entre el grupo que consiste en células madre, tales como células madre hematopoyéticas o células madre mesenquimáticas; células inmunorreguladoras, tales como células T, linfocitos T, células Nk, células B, células reguladoras de antígeno y células presentadoras de antígeno; y células de la médula ósea.
4. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sujeto es un sujeto humano.
5. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un peso molecular promedio inferior a 20 000 Da, preferiblemente inferior a 10 000 Da, tal como 8 000 Da, 7 000 Da, 6 000 Da o 5 000 Da.
6. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un promedio de contenido de azufre de 10 a 25 %, preferiblemente de 15 a 20 %. tal como alrededor del 17 %.
7. Sulfato de dextrano o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo es una sal de potasio de sulfato de dextrano.
8. Una composición de inyección intravenosa que comprende sulfato de dextrano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y linfocitos T infiltrantes de tumores proporcionados en un fluido o vehículo líquido farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer metastásico, en el que dicha composición de inyección intravenosa se inyecta por vía intravenosa.

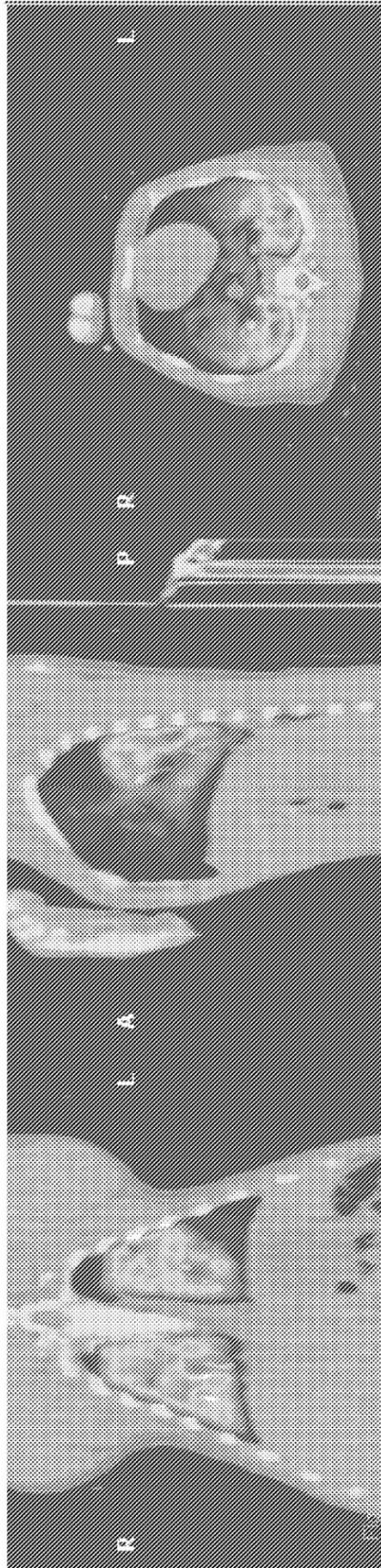


Fig. 1

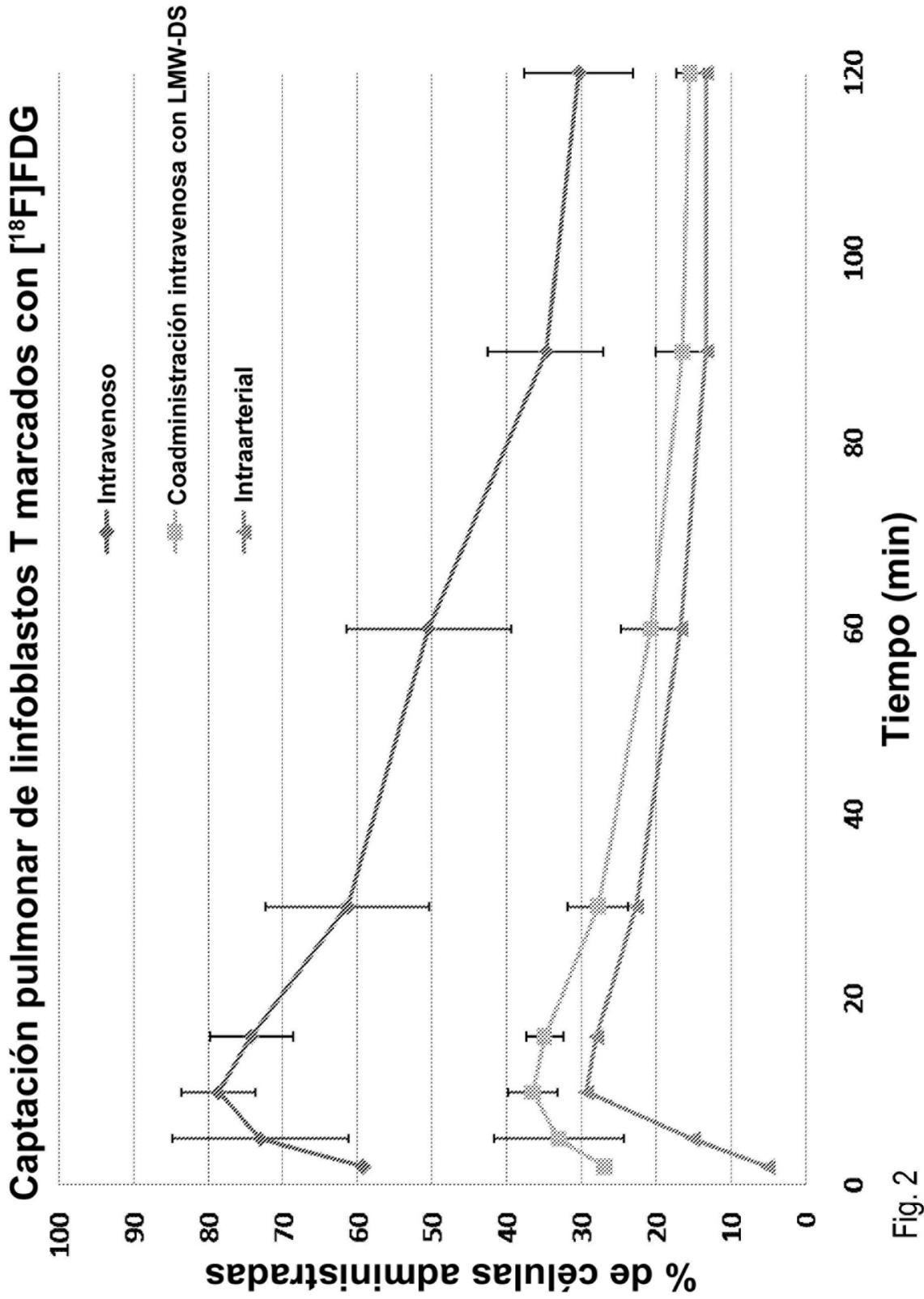


Fig. 2