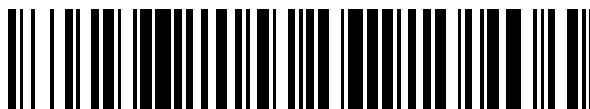


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 855 428**

51 Int. Cl.:

A61K 38/13	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 31/436	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 31/395	(2006.01) A61P 37/06	(2006.01)
A61K 31/365	(2006.01) A61K 31/00	(2006.01)
A61K 31/4427	(2006.01)	
A61K 31/506	(2006.01)	
A61K 38/18	(2006.01)	
A61K 38/19	(2006.01)	
A61P 1/16	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/US2010/059877**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11072216**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10836746 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 2509619**

54 Título: **Métodos de tratamiento que utilizan movilizadores de células madre y agentes inmunosupresores**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285602 P
22.03.2010 US 316180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2021

73 Titular/es:

MEDREGEN, LLC (100.0%)
5104 Glow Haven Way
Perry Hall, MD 21128, US

72 Inventor/es:

SUN, ZHAOLI y
WILLIAMS, GEORGE MELVILLE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 855 428 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

Métodos de tratamiento que utilizan movilizadores de células madre y agentes inmunosupresores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del trasplante de órganos.

10 **Antecedentes de la invención**

Ya que los resultados tempranos del trasplante de órganos humanos han mejorado drásticamente, el enfoque de la investigación se ha desplazado hacia la resolución de los problemas restantes asociados con la inmunosupresión crónica. Los inhibidores de la calcineurina siguen siendo el pilar de la inmunosupresión en el trasplante de órganos, pero están asociados con efectos secundarios importantes tales como infecciones, diabetes, hipertensión, nefrotoxicidad y neoplasia maligna que pueden influir en la calidad de vida y las tasas de supervivencia. El objetivo final del trasplante de órganos es lograr la tolerancia clínica, que se define como una función normal estable del injerto en ausencia de inmunosupresión. Muramatsu *et al.* (J. Orthopaedic Res, 2010, 28 (4): 457-61) evaluaron el uso de irradiación corporal total, factor de estimulación de colonias de granulocitos y tacrólimus (FK-506) después de un alotrasplante de extremidad completa de rata.

20 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que puede usarse la administración de un movilizador de células madre en combinación con un agente inmunosupresor para tratar a receptores de trasplantes de órganos. Como se describe en el presente documento, el régimen de tratamiento promueve la supervivencia del aloinjerto e induce la aceptación del aloinjerto a largo plazo. El régimen de tratamiento se puede aplicar a cualquier tipo de trasplante de órganos, incluyendo hígado, riñón, piel, corazón, pulmón, intestino y páncreas. El régimen de tratamiento también se puede aplicar al trasplante de tejido compuesto. El tejido compuesto puede ser la mano, la cara o cualquier otra parte anatómica. En realizaciones particulares, el régimen de tratamiento se puede utilizar para lesiones hepáticas tóxicas, tales como paracetamol o hepatitis fulminante. Por consiguiente, la invención proporciona plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso en un método de tratamiento de un receptor de trasplante de órgano para promover la supervivencia del aloinjerto e inducir la aceptación del aloinjerto, en donde el plerixafor (AMD3100) y el tacrólimus se administran al receptor en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La invención también proporciona plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso en un método de tratamiento de un receptor de trasplante de tejido compuesto para promover la supervivencia del aloinjerto e inducir la aceptación del aloinjerto, en donde el plerixafor (AMD3100) y el tacrólimus se administran al receptor en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El órgano trasplantado se puede seleccionar del grupo que consiste en hígado, riñón, piel, corazón, pulmón, intestino y páncreas. En una realización específica, el órgano es el hígado. En otra realización, el órgano es el riñón. En otra realización más, el órgano trasplantado es la piel. En determinadas realizaciones, el tacrólimus se administra en una cantidad de dosis baja.

La presente invención proporciona además la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de AMD3100 que moviliza células madre CD34⁺ y/o CD133⁺ y una dosis baja de tacrólimus para su uso en un método de tratamiento de un receptor de trasplante de órgano.

50 **Breve descripción de las figuras**

La fig. 1 presenta el protocolo experimental usado para el trasplante de hígado pequeño.

La fig. 2 muestra la estructura de células CD34⁺, c-Kit⁺, Thy-1⁺ y Sca1⁺ en sangre periférica en animales tratados con AMD en comparación con animales de control después del trasplante de hígado.

La fig. 3 muestra el análisis por PCR de la expresión de ARNm de SDF-1, SCF, c-Met, así como Foxp3 en AMD más grupo de dosis baja de FK-506 en comparación con otros grupos el día 7 después del trasplante parcial de hígado (TPH).

La fig. 4 muestra los resultados de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de hígado con DA pequeño trasplantado en tasas de receptores GFP-Lewis, el día 7 después del TPH.

La fig. 5 presenta los resultados de supervivencia del aloinjerto de piel e hígado pequeño en el modelo de rechazo agudo (DA en ratas Lewis).

La fig. 6 muestra imágenes de proteína verde fluorescente a los 3 meses después del trasplante de hígado.

La fig. 7 muestra la expresión de SDF en injerto de hígado pequeño después del trasplante (DA en ratas Lewis).

La fig. 8 presenta resultados de tinción de inmunohistoquímica dirigidos a la detección de células madre CD133⁺ en aloinjertos de hígado y bazo los días 3 y 7 después del trasplante.

La fig. 9 presenta resultados de tinción de inmunohistoquímica dirigidos a la detección de células CD133⁺ y c-Met⁺ en aloinjertos de hígado 7 días después del trasplante.

La fig. 10 muestra resultados de tinción inmunofluorescente dirigidos a la detección de células receptoras de fenotipo c-Met⁺ en aloinjertos de hígado 7 días después del trasplante.

La fig. 11 muestra resultados de tinción inmunofluorescente de experimentos que detectan la expresión de Foxp3 en aloinjertos de hígado y bazo 7 días después del trasplante.

La fig. 12 presenta el protocolo experimental usado para el trasplante de hígado completo.

La fig. 13 presenta los resultados de supervivencia del aloinjerto de hígado completo en el modelo de rechazo agudo (DA en ratas Lewis).

La fig. 14 muestra que el número absoluto de células c-Kit⁺, CD133⁺ o linaje negativo (Lin⁻) y triples positivas Thy1⁺c-Kit⁺CD133⁺ en sangre periférica aumentó significativamente en los animales tratados con AMD en comparación con los animales tratados con solución salina o G-CSF.

La fig. 15 muestra que el tratamiento con AMD3100 y tacrólimus induce la aceptación del aloinjerto renal a largo plazo.

La fig. 16 demuestra que una combinación de AMD3100 y tacrólimus promueve la repoblación de aloinjertos renales por células procedentes del receptor.

La fig. 17 muestra los resultados de supervivencia del xenoinjerto de piel de ratón en rata.

La fig. 18 presenta datos de expresión de GFP de experimentos de injertos de piel.

La fig. 19 muestra la repoblación del aloinjerto de piel por el receptor 36 días después del trasplante.

Descripción detallada de la invención

Se entiende que la presente invención no se limita a los métodos y componentes particulares, etc., descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento se usa con el fin único de describir realizaciones particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención. Cabe destacar que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a una "proteína" es una referencia a una o más proteínas e incluye equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Se describen métodos, dispositivos y materiales específicos, aunque puede usarse cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención.

Además, se proporciona el significado de determinados términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. No se pretende que las definiciones sean de naturaleza limitante y sirven para proporcionar una comprensión más clara de determinados aspectos de la presente invención.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que puede usarse la administración de un movilizador de células madre en combinación con un agente inmunosupresor para tratar a receptores de trasplantes de órganos. Como se describe en el presente documento, el régimen de tratamiento promueve la supervivencia del aloinjerto e induce la aceptación del aloinjerto a largo plazo. El régimen de tratamiento se puede aplicar a cualquier tipo de trasplante de órganos, incluyendo hígado, riñón, piel, corazón, pulmón, intestino y páncreas. El régimen de tratamiento también se puede aplicar al trasplante de tejido compuesto. El tejido compuesto puede ser la mano, la cara o cualquier otra parte anatómica. En realizaciones particulares, el régimen de tratamiento se puede utilizar para lesiones hepáticas tóxicas, tales como paracetamol o hepatitis fulminante. Aunque gran parte de la presente divulgación se realiza en el contexto del trasplante de órganos, debe reconocerse que los regímenes de tratamiento son de amplia aplicación, como se ha observado anteriormente, y no deben interpretarse como limitados al trasplante de órganos.

La presente invención consiste en una estrategia novedosa para movilizar células madre receptoras que pueden promover la reparación y regeneración de aloinjertos rechazados después del trasplante y, con el tiempo, el aloinjerto se convierte en el propio receptor. Esto permite una inmunosupresión mínima y retirada rápida. Para los pacientes, esto se traduce en una mejor supervivencia y eliminación de las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión, tales como infecciones y neoplasias malignas.

En un modelo de trasplante de hígado alógeno de rata de aceptación crónica, los inventores demostraron que los hígados de donantes totales y parciales se reemplazan completamente por células procedentes del receptor al cabo de 1 año y de 3 meses, respectivamente. Los inventores han demostrado además que los hepatocitos procedentes del receptor resultan de la transdiferenciación celular, no de la fusión celular, y que estas células procedentes del receptor se originan en la médula ósea. Estos datos sugieren que el hígado quimérico se parece cada vez más al receptor y, por lo tanto, transmite tolerancia.

Como se describe en el presente documento, en un modelo de trasplante de hígado de rata de rechazo agudo, los presentes inventores han demostrado además que el tratamiento de un receptor de trasplante de hígado con un movilizador de células madre y un agente inmunosupresor facilita una repoblación más rápida de aloinjertos de hígado con células procedentes del receptor después del trasplante e induce la aceptación de aloinjertos de hígado a largo

plazo sin efectos secundarios.

Los presentes inventores también han investigado la inducción de la aceptación de aloinjertos de riñón, y han demostrado en el presente documento que el tratamiento con una combinación de un movilizador de células madre y un agente inmunosupresor previene el rechazo agudo e induce la aceptación de aloinjertos a largo plazo. Como se describen en los ejemplos, se realizaron trasplantes de riñón de ratas dark agouti (DA) a ratas Lewis y las ratas receptoras se trataron con movilizador de células madre (mozobil: AMD3100) y/o dosis baja de inmunosupresor (tacrólimus, FK-506). De hecho, la presente invención demuestra que los movilizadores de células madre y los agentes inmunosupresores pueden usarse para la inducción de la aceptación (tolerancia) de aloinjertos de riñón y la evitación de la inmunosupresión crónica en el trasplante de órganos.

La presente invención también es útil en el trasplante de piel. Según la Asociación Estadounidense de Quemaduras, hay aproximadamente 500 000 lesiones por quemaduras al año en los Estados Unidos, de las que aproximadamente 40 000 requieren hospitalización. Orgill *et al.*, 360 N. ENGL. J. MED. 893-901 (2009). Una opción de tratamiento que ha ayudado a disminuir la mortalidad durante los últimos diez años ha sido la escisión inmediata de la piel quemada con reemplazo por piel injertada. Véase Wang *et al.*, 28 J. BURN CARE RES. 182-86 (2007); Nakazawa *et al.*, 106 NIPPON GEKA GAKKAI ZASSHI 745-49 (2005); y Desai *et al.*, 211 ANN. SURG. 753-59 (1990). El material ideal para el injerto es piel autóloga, tomada de una región no quemada de la propia piel del paciente. El suministro de piel autóloga sana, sin embargo, está limitado en pacientes con quemaduras graves, incluso cuando se usan técnicas de expansión, tales como "mallado". Véase Lari *et al.*, 27 BURNS 61-66 (2001); y Vandeput *et al.*, 21 BURNS 364-70 (1995). La piel alogénica se considera el método de referencia para los injertos temporales. Orgill *et al.*, 360 N. ENGL. J. MED. 893-901 (2009).

La posibilidad de utilizar piel alogénica e inmunosupresión se ha explorado clínica y experimentalmente. Una quemadura extensa es en sí misma inmunosupresora; no obstante, la extrema antigenicidad de la piel da lugar inevitablemente al rechazo del aloinjerto. Como en otros alotrasplantes, se han realizado intentos de prolongar la aceptación del aloinjerto mediante inmunosupresión inducida farmacológicamente.

Los agentes utilizados con mayor frecuencia son ciclosporina y ciclosporina A. Black *et al.* informaron sobre el uso de la supervivencia a largo plazo de aloinjertos inducida por ciclosporina en 1987. 8 J. BURN CARE REHABIL. 531-35 (1987). Este trabajo experimental en modelos de ratas se evaluó adicionalmente a principios de la década de 1990. Cetinkale *et al.*, 19 BURNS 262-64 (1993). Una observación interesante en este estudio posterior fue que el efecto inmunosupresor de la quemadura se revirtió rápidamente después de la escisión y el injerto tempranos. Esto enfatiza la necesidad de inmunosupresión adicional si se va a intentar cubrir la quemadura solo con aloinjerto.

El resultado de los intentos de inmunosupresión de pacientes con grandes quemaduras y aloinjertos ha sido en general decepcionante. Aunque hay informes ocasionales de supervivencia prolongada, estos son poco habituales y, con mayor frecuencia, la experiencia ha sido que los pacientes sucumben a una septicemia posiblemente relacionada con la inmunosupresión.

Por consiguiente, la presente invención comprende métodos para movilizar células madre receptoras que pueden promover la reparación y regeneración de aloinjertos de piel rechazados después del trasplante y, con el tiempo, el aloinjerto se convierte en el propio receptor. Esto permitirá una inmunosupresión mínima y retirada rápida. Para pacientes quemados, esto se traduciría en una mejor supervivencia y eliminación de las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión, tales como infecciones. El aloinjerto de piel puede encontrar un nuevo papel como piel permanente en pacientes quemados.

Como se muestra adicionalmente en el presente documento, el régimen de tratamiento de la presente invención recluta linfocitos T reguladores al sitio de trasplante de órgano. Debido a que los linfocitos T reguladores están implicados en el control de enfermedades autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitación, diabetes de tipo 1, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental y enfermedad inflamatoria intestinal, la movilización de células madre (p. ej., con una combinación de AMD3100 y tacrólimus) puede tener aplicaciones clínicas más amplias que el trasplante.

I. Definiciones

"Agente" se refiere a todos los materiales que pueden usarse como o en composiciones farmacéuticas, o que pueden ser compuestos tales como compuestos orgánicos pequeños sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos, isoformas, variantes u otros materiales que puedan usarse de forma independiente para tales fines, todos de acuerdo con la presente invención.

"Antagonista" se refiere a un agente que regula negativamente (p. ej., suprime o inhibe) al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína y otra molécula, p. ej., un péptido diana o sustrato enzimático. Un antagonista también puede ser un compuesto que regula negativamente la expresión de un gen o que reduce la cantidad de proteína expresada presente.

"Hematopoyesis" se refiere al proceso muy orquestado de desarrollo y homeostasis de células sanguíneas. De forma prenatal, la hematopoyesis se produce en el saco vitelino, después el hígado y, con el tiempo, la médula ósea. En adultos normales, se produce en la médula ósea y los tejidos linfáticos. Todas las células sanguíneas se

desarrollan a partir de células madre pluripotentes. Las células pluripotentes se diferencian en células madre que están comprometidas a tres, dos o una ruta de diferenciación hematopoyética. Sin embargo, ninguna de estas células madre es distinguible morfológicamente.

Las expresiones "células madre" y "células madre hematopoyéticas" se usan indistintamente en el presente documento. Las células madre se distinguen de otros tipos celulares por dos características importantes. En primer lugar, las células madre son células no especializadas capaces de renovarse mediante división celular, en ocasiones después de largos periodos de inactividad. En segundo lugar, en determinadas condiciones fisiológicas o experimentales, se puede inducir que las células madre se conviertan en células específicas de órganos o tejidos con funciones especiales. En algunos órganos, tales como el intestino y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar tejidos desgastados o dañados. En otros órganos, sin embargo, tales como el páncreas y el corazón, las células madre solo se dividen en condiciones especiales.

La expresión "células madre" puede referirse a células madre multipotentes que son capaces de diferenciarse en todas las células sanguíneas, incluyendo los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Por ejemplo, las "células madre hematopoyéticas" o "células madre" como se usan en la invención están contenidas no solo en la médula ósea sino también en células procedentes de la sangre del cordón umbilical.

Un "movilizador de células madre", "movilizador de células madre hematopoyéticas o células progenitoras" o "movilizar", (usados indistintamente), como se describe en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, si es una molécula orgánica pequeña, sintético o de origen natural, o un polipéptido, tal como un factor de crecimiento o factor estimulante de colonias o un fragmento activo o mimético del mismo, un ácido nucleico, un hidrato de carbono, un anticuerpo o cualquier otro agente que actúe para mejorar la migración de células madre desde la médula ósea a la sangre periférica. Un movilizador de células madre puede aumentar el número de células madre hematopoyéticas o células progenitoras/precursoras hematopoyéticas en la sangre periférica, permitiendo de este modo una fuente más accesible de células madre para su uso en trasplantes. En realizaciones particulares, un movilizador de células madre se refiere a cualquier agente que movilice células madre CD34⁺ y/o CD133⁺.

Un "paciente", "sujeto", "hospedador" o "receptor de trasplante" para tratar mediante los presentes métodos se refiere a un ser humano o animal no humano, tal como primates, mamíferos y vertebrados.

Una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3 kilodaltons (kDa), menos de aproximadamente 1,5 kilodaltons o menos de aproximadamente 1 kilodaltons. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Una "molécula orgánica pequeña" es un compuesto orgánico (o compuesto orgánico en complejo con un compuesto inorgánico (p. ej., metal)) que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3 kilodaltons, menos de aproximadamente 1,5 kilodaltons o menos de aproximadamente 1 kDa.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratando", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Los términos también se utilizan en el contexto de la administración de una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, p. ej., un movilizador de células madre y/o un agente inmunosupresor. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de un resultado en particular, enfermedad o síntomas de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso que se puede atribuir a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en particular, en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, p. ej., provocar la regresión de la enfermedad, p. ej., para eliminar total o parcialmente los síntomas de la enfermedad. En realizaciones particulares, el término se usa en el contexto del tratamiento de receptores de trasplantes de órganos. Más en particular, el tratamiento de un receptor de trasplante de órgano incluye (a) lograr tolerancia clínica; (b) promover la reparación y regeneración de aloinjertos rechazados; (c) repoblar aloinjertos con células procedentes del receptor; (d) inducir la aceptación del aloinjerto a largo plazo sin efectos secundarios; (e) reducir o eliminar las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión, tales como infecciones.

II. Movilizadores de células madre

La presente invención se refiere al tratamiento de receptores de trasplantes de órganos con el movilizador de células madre AMD3100 en combinación con el agente inmunosupresor tacrólimus.

En realizaciones particulares, el movilizador de células madre comprende un antagonista de CXCR4 y el antagonista de CXCR4 es AMD3100. AMD3100 (1,1'-[1,4-fenilenbis(metilen)]bis-1,4,8,11-tetraazaciclo-tetradecano) es un biciclam simétrico, prototipo de antagonista no péptido del receptor de quimiocina CXCR4. Véanse las patentes de los Estados Unidos n.º 6.835.731 y n.º 6.825.351. El término "AMD" o "AMD3100" se usa indistintamente con Plerixafor, rINN, USAN, JM3100 y su nombre comercial, Mozobil™.

La presente divulgación también contempla el uso de miméticos de AMD3100. Sustituciones mutacionales en 16 posiciones ubicadas en TM-III, -IV, -V, -VI y -VII que recubren el bolsillo principal de unión a ligando del receptor CXCR4 han identificado tres restos ácidos: Asp¹⁷¹ (AspIV:20), Asp²⁶² (AspVI:23) y Glu²⁸⁸ (GluVII:06) como los principales puntos de interacción para AMD3100. El modelado molecular sugiere que un anillo de ciclam de AMD3100 interactúa con Asp¹⁷¹ en TM-IV, mientras que el otro anillo está intercalado entre los grupos de ácido carboxílico de

Asp²⁶² y Glu²⁸⁸ de TM-VI y -VII, respectivamente. En un estudio, se encontró que la introducción de solo un Glu en la posición VII:06 y la eliminación de un resto de Lys neutralizante en la posición VII:02 dio lugar a un aumento de 1000 veces de la afinidad de AMD3100 hasta un intervalo de 10 veces de su afinidad en CXCR4. Por tanto, pueden diseñarse miméticos, tales como, por ejemplo, antagonistas peptídicos o no peptídicos con biodisponibilidad oral mejorada para bloquear de manera eficaz y selectiva el receptor CXCR4.

III. Agentes inmunosupresores

La expresión "agente inmunosupresor" se refiere a un agente que inhibe, ralentiza o invierte la actividad del sistema inmunitario. Los agentes inmunosupresores actúan suprimiendo la función de las células inmunitarias que responden (incluyendo, por ejemplo, linfocitos T), directamente (p. ej., actuando sobre la célula inmunitaria) o indirectamente (actuando sobre otras células mediadoras). Se pueden administrar agentes inmunosupresores a un sujeto para evitar que el sistema inmunitario del sujeto genere una respuesta inmunitaria después de un trasplante de órgano o para tratar una enfermedad que está provocada por un sistema inmunitario hiperactivo.

Se usan varios agentes inmunosupresores que suprimen la función de las células inmunocompetentes para suprimir el rechazo inmunológico (rechazo del injerto) que acompaña a dichos trasplantes, debido a que el rechazo inmunológico provocado por el alotrasplante se debe principalmente a la inmunidad celular.

El agente inmunosupresor es tacrólimus. El tacrólimus (también FK-506 o Fujimycin) es un fármaco inmunosupresor que se usa principalmente después del trasplante alógeno de órganos para reducir la actividad del sistema inmunitario del paciente y así disminuir el riesgo de rechazo de órganos. Reduce la producción de interleucina-2 (IL-2) por linfocitos T. También se usa en una preparación tópica en el tratamiento de la dermatitis atópica grave (eccema), uveítis refractaria grave después de trasplantes de médula ósea y la afección cutánea vitíligo. Es una lactona de macrólido de 23 miembros descubierta en 1984 a partir del caldo de fermentación de una muestra de suelo japonés que contenía la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. El fármaco se vende con los nombres comerciales Prograf®, administrado dos veces al día, Advagraf®, una formulación de liberación sostenida que permite la dosificación una vez al día, y Protopic®, la formulación tópica.

IV. Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención contempla el uso de una cantidad eficaz de AMD3100 y tacrólimus. Como se usa en el presente documento, el término "eficaz", significa adecuado para lograr un resultado deseado, esperado o previsto. Más en particular, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa indistintamente y se refiere a una cantidad de AMD3100 y tacrólimus, quizás en combinación adicional con otro agente terapéutico más, necesario para proporcionar el "tratamiento" deseado (definido en el presente documento) o efecto terapéutico, p. ej., una cantidad que sea eficaz para prevenir, aliviar, tratar o mejorar síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se esté tratando. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a receptores de trasplantes de órganos. Como apreciaría un experto habitual en la materia, la cantidad exacta necesaria variará entre sujetos, dependiendo de la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se trate, el compuesto y/o composición particular administrado y similares. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" adecuada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la materia por referencia a los textos y la bibliografía pertinentes y/o usando experimentación rutinaria.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención están en una forma biológicamente compatible adecuada para su administración *in vivo* para los sujetos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que ha sido aprobado por un organismo de control del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales y, más en particular, en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra AMD3100 y/o tacrólimus. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, incluyendo, pero sin limitación, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua puede ser un transportador cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y la dextrosa acuosa pueden ser transportadores preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se pueden emplear como transportadores líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición farmacéutica también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores de pH.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y transportadores convencionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores convencionales, tales como calidades farmacéuticas de

manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En una realización específica, una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de AMD3100 y/o tacrólimus junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier vía de administración en particular, incluyendo, pero sin limitación, la oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, medios iontoforéticos o medios transdérmicos. Las vías más adecuadas son la administración oral o la inyección. En determinadas realizaciones, se prefiere la inyección subcutánea.

15 En general, las composiciones farmacéuticas que comprenden AMD3100 y/o tacrólimus desveladas en el presente documento pueden usarse solas (es decir, AMD3100 administrado con tacrólimus) o junto con otros agentes terapéuticos en dosis adecuadas definidas por pruebas rutinarias para obtener una eficacia óptima, minimizando al mismo tiempo cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación que utiliza una composición farmacéutica de la presente invención puede seleccionarse de acuerdo con diversos factores, incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y la composición farmacéutica en particular empleada. Un médico con experiencia habitual puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica (y potencialmente otros agentes, incluyendo agentes terapéuticos) necesaria para prevenir, contrarrestar o detener la evolución de la afección.

25 La precisión óptima para lograr concentraciones del régimen terapéutico (p. ej., composiciones farmacéuticas que comprenden AMD3100 y/o tacrólimus en combinación con otro agente terapéutico) dentro del intervalo que produce la máxima eficacia con toxicidad mínima puede requerir un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de la composición farmacéutica a uno o más sitios diana. La distribución, el equilibrio y la eliminación de una composición farmacéutica pueden considerarse al determinar la concentración óptima para un régimen de tratamiento. Las dosis de una composición farmacéutica desvelada en el presente documento se pueden ajustar cuando se combinan para lograr los efectos deseados. Por otro lado, las dosificaciones de las composiciones farmacéuticas y diversos agentes terapéuticos pueden optimizarse y combinarse de manera independiente para lograr un resultado sinérgico en el que la patología se reduce más de lo que se reduciría si cualquiera de ellos se usara solo.

35 En particular, la toxicidad y la eficacia terapéutica de una composición farmacéutica desvelada en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan grandes índices terapéuticos excepto cuando la citotoxicidad de la composición es la actividad o el resultado terapéutico que se desea. Aunque pueden usarse composiciones farmacéuticas que muestren efectos secundarios tóxicos, un sistema de administración puede dirigir dichas composiciones al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a células sin infectar y, de este modo, reducir los efectos secundarios. En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera que maximice la eficacia y minimice la toxicidad.

50 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. Las dosificaciones de dichas composiciones se encuentran preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier composición usada en los métodos de la invención, se puede estimar la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación en plasma que incluye la CI_{50} (la concentración de la composición de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

60 Por otra parte, la administración de dosificaciones de las composiciones de la presente invención se puede optimizar usando un sistema de modelado farmacocinético/farmacodinámico. Por ejemplo, se pueden elegir uno o más regímenes de dosificación y se puede utilizar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o más regímenes de dosificación. A continuación, se puede seleccionar uno de los regímenes de dosificación para la administración que logre la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada en función del perfil farmacocinético/farmacodinámico en particular. Véase el documento WO 00/67776.

65 Más específicamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una única dosis diaria o la

dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. En el caso de la administración oral, la dosificación diaria de las composiciones se puede variar en un amplio intervalo de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 1000 mg por paciente, al día. El intervalo puede ser más en particular de aproximadamente 0,001 ng/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día, aproximadamente 0,1-100 µg, aproximadamente 1,0-50 µg o aproximadamente 1,0-20 mg al día para adultos (de aproximadamente 60 kg).

La dosificación diaria de las composiciones farmacéuticas se puede variar en un amplio intervalo de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 1000 mg por ser humano adulto al día. Para la administración oral, las composiciones se pueden proporcionar en forma de comprimidos que contienen de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 1000 mg de la composición o 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900 o 1000 miligramos de la composición para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Normalmente se administra una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un nivel de dosificación de aproximadamente 0,1 ng/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día. En una realización, el intervalo es de aproximadamente 0,2 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 0,5 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en un régimen de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces al día.

En el caso de las inyecciones, habitualmente es conveniente administrar por vía intravenosa en una cantidad de aproximadamente 0,0001 µg-30 mg, aproximadamente 0,01 µg-20 mg o aproximadamente 0,01-10 mg al día a adultos (a aproximadamente 60 kg). En el caso de otros animales, también se puede administrar la dosis calculada para 60 kg.

Las dosis de una composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir opcionalmente de 0,0001 µg a 1000 mg/kg/administración o de 0,001 µg a 100,0 mg/kg/administración, de 0,01 µg a 10 mg/kg/administración, de 0,1 µg a 10 mg/kg/administración, incluyendo, pero sin limitación, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos, o para lograr una concentración sérica de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 y/o 5000 µg/ml de concentración sérica por administración única o múltiple o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos.

Como ejemplo no limitante, el tratamiento de los sujetos se puede proporcionar como una dosificación única o periódica de una composición de la presente invención de 0,1 ng a 100 mg/kg, tal como 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o como alternativa o adicionalmente, al menos uno de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 o 52, o, como alternativa o adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 años, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis individuales, de infusión o repetidas.

Específicamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar al menos una vez a la semana durante el transcurso de varias semanas. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran al menos una vez a la semana durante varias semanas a varios meses. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana durante cuatro a ocho semanas. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana durante cuatro semanas.

Más específicamente, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al menos una vez al día durante aproximadamente 2 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 3 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 4 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 5 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 6 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 7 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 8 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 9 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 10 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 11 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 12 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 13 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 14 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 15 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 16 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 17 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 18 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 19 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 20 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 21 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 22 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 23 días, al menos una vez al día durante

aproximadamente 24 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 25 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 26 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 27 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 28 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 29 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 30 días o al menos una vez al día durante aproximadamente 31 días.

5 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez cada 2 días, aproximadamente una vez cada 3 días, aproximadamente una vez cada 4 días, aproximadamente una vez cada 5 días, aproximadamente una vez cada 6 días, aproximadamente una vez cada 7 días, aproximadamente una vez cada 8 días, aproximadamente una vez cada 9 días, aproximadamente una vez
10 cada 10 días, aproximadamente una vez cada 11 días, aproximadamente una vez cada 12 días, aproximadamente una vez cada 13 días, aproximadamente una vez cada 14 días, aproximadamente una vez cada 15 días, aproximadamente una vez cada 16 días, aproximadamente una vez cada 17 días, aproximadamente una vez cada 18 días, aproximadamente una vez cada 19 días, aproximadamente una vez cada 20 días, aproximadamente una vez cada 21 días, aproximadamente una vez cada 22 días, aproximadamente una vez cada 23 días, aproximadamente
15 una vez cada 24 días, aproximadamente una vez cada 25 días, aproximadamente una vez cada 26 días, aproximadamente una vez cada 27 días, aproximadamente una vez cada 28 días, aproximadamente una vez cada 29 días, aproximadamente una vez cada 30 días o aproximadamente una vez cada 31 días.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar, como alternativa, aproximadamente
20 una vez a la semana, aproximadamente una vez cada 2 semanas, aproximadamente una vez cada 3 semanas, aproximadamente una vez cada 4 semanas, aproximadamente una vez cada 5 semanas, aproximadamente una vez cada 6 semanas, aproximadamente una vez cada 7 semanas, aproximadamente una vez cada 8 semanas, aproximadamente una vez cada 9 semanas, aproximadamente una vez cada 10 semanas, aproximadamente una vez
25 cada 11 semanas, aproximadamente una vez cada 12 semanas, aproximadamente una vez cada 13 semanas, aproximadamente una vez cada 14 semanas, aproximadamente una vez cada 15 semanas, aproximadamente una vez cada 16 semanas, aproximadamente una vez cada 17 semanas, aproximadamente una vez cada 18 semanas, aproximadamente una vez cada 19 semanas, aproximadamente una vez cada 20 semanas.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar aproximadamente
30 una vez al mes, aproximadamente una vez cada 2 meses, aproximadamente una vez cada 3 meses, aproximadamente una vez cada 4 meses, aproximadamente una vez cada 5 meses, aproximadamente una vez cada 6 meses, aproximadamente una vez cada 7 meses, aproximadamente una vez cada 8 meses, aproximadamente una vez cada 9 meses, aproximadamente una vez cada 10 meses, aproximadamente una vez cada 11 meses o aproximadamente una vez cada 12 meses.

35 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al menos una vez a la semana durante aproximadamente 2 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 3 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 4 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 5 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 6 semanas, al menos una vez a la semana durante
40 aproximadamente 7 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 8 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 9 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 10 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 11 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 12 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 13 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 14 semanas, al menos una vez a la semana durante
45 aproximadamente 15 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 16 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 17 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 18 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 19 semanas o al menos una vez a la semana durante aproximadamente 20 semanas.

50 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al menos una vez a la semana durante aproximadamente 1 mes, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 2 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 3 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 4 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 5 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 6 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 7 meses, al menos una vez a
55 la semana durante aproximadamente 8 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 9 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 10 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 11 meses o al menos una vez a la semana durante aproximadamente 12 meses.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar simultánea o secuencialmente por
60 la misma o diferentes vías de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden combinar además con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La determinación de la identidad y cantidad de las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos de la presente invención puede ser realizada fácilmente por médicos con experiencia habitual usando técnicas convencionales conocidas en este campo. En realizaciones específicas, AMD3100 se puede administrar en combinación con una cantidad eficaz de tacrólimus. En otras realizaciones
65 específicas, AMD3100 y tacrólimus se pueden administrar en combinación con una cantidad eficaz de otro movilizador de células madre, otro agente inmunosupresor u otro agente terapéutico.

En diversas realizaciones, AMD3100 en combinación con tacrólimus (y opcionalmente otro movilizador de células madre, otro agente inmunosupresor u otro agente terapéutico) se puede administrar aproximadamente al mismo tiempo, con menos de 1 minuto de diferencia, con menos de 2 minutos de diferencia, con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, con 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, con aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, con 18 horas a 24 horas de diferencia, con 24 horas a 36 horas de diferencia, con 36 horas a 48 horas de diferencia, con 48 horas a 52 horas de diferencia, con 52 horas a 60 horas de diferencia, con 60 horas a 72 horas de diferencia, con 72 horas a 84 horas de diferencia, con 84 horas a 96 horas de diferencia o con 96 horas a 120 horas de diferencia. En realizaciones particulares, se administran dos o más terapias dentro de la misma visita de patente.

En determinadas realizaciones, AMD3100 en combinación con tacrólimus (y opcionalmente otro movilizador de células madre, otro agente inmunosupresor u otro agente terapéutico) se administran de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (p. ej., el movilizador de células madre) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (p. ej., el agente inmunosupresor) durante un periodo de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de quizás una tercera terapia durante un periodo de tiempo y así sucesivamente, y repitiendo esta administración secuencial, p. ej., el ciclo, para reducir el desarrollo de resistencias a una de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia de las terapias. En determinadas realizaciones, la administración de la terapia de combinación de la presente invención se puede repetir y las administraciones pueden estar separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

Por tanto, en un aspecto, AMD3100 se administra en combinación con tacrólimus. En realizaciones particulares, el movilizador de células madre AMD3100 y el agente inmunosupresor tacrólimus se administran por separado durante un periodo de tiempo después del trasplante y/o la lesión. Por ejemplo, el régimen de tratamiento para un receptor de trasplante de hígado puede comprender lo siguiente: AMD3100

(1 mg/kg) y tacrólimus (0,1 mg/kg) el día 0, 1, 2, 3 y 7 (inyección subcutánea). El régimen de tratamiento puede comprender, como alternativa, lo siguiente: AMD (1 mg/kg) y tacrólimus (0,1 mg/kg) el día 0, 1, 2, 3, 7, 10 y 15 (inyección subcutánea).

Como ejemplo no limitante en el trasplante de riñón, el régimen de tratamiento puede comprender AMD3100 (1 mg/kg) después de la reperusión y el día 2, 4, 6 y 10 después del trasplante, y tacrólimus (0,05 mg/kg) después de la reperusión y el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 después del trasplante (inyección subcutánea). En realizaciones que implican trasplante de piel, el régimen de tratamiento puede comprender lo siguiente: AMD3100 (1 mg/kg) inmediatamente después del trasplante y cada dos días a partir de entonces, y tacrólimus (0,1 mg/kg) todos los días después del trasplante (inyección subcutánea).

Sin una elaboración adicional, se cree que un experto en la materia puede, usando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no limitan el resto de la divulgación de ninguna manera.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo se elaboran y evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos descritos y reivindicados en el presente documento, y se pretende que sean puramente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en grados Celsius o es una temperatura ambiente y la presión es la presión atmosférica o próxima a esta. Existen numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, p. ej., concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones y otros intervalos y condiciones de reacción que pueden usarse para optimizar la pureza del producto y el rendimiento obtenido del proceso descrito. Solamente será necesaria una experimentación razonable y rutinaria para optimizar dichas condiciones de proceso.

Ejemplo 1: Inducción de la aceptación del aloinjerto hepático mediante la movilización de células madre de la médula ósea

Materiales y métodos

Cepas de rata y cuidados. Se adquirieron ratas DA (RT1A^a) de Harlan ague-Dawley (Indianápolis, IN) y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. La cepa de ratas Lewis (RT1¹) transgénica para proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvo del Centro de Investigación y Recursos para Ratas (RRRC) financiado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Universidad de Misuri, Columbia, MO. Los animales se mantuvieron en las instalaciones específicas sin patógenos de las Instituciones Médicas Johns Hopkins. Los animales fueron cuidados según las pautas de los NIH y bajo un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad Johns Hopkins.

Trasplante de hígado. Se realizó trasplante ortotópico de hígado (TOH) con anestesia por inhalación de isoflurano (Abbott laboratories, North Chicago, IL) según un método modificado del descrito anteriormente. El trasplante de hígado pequeño consistió en la extirpación del lóbulo lateral izquierdo, la parte izquierda del lóbulo mediano y los lóbulos caudados anterior y posterior. Esto redujo la masa del hígado en aproximadamente 50 %. Los hígados se lavaron *in situ* con 10 ml de solución salina fría a través de la vena porta, se explantaron y se sumergieron en solución salina fría. El hígado del hospedador se extirpó mediante ligadura y división de las venas suprarrenales y lumbares derechas. La arteria hepática se ligó y se dividió. El conducto biliar se canuló mediante la inserción de un tubo de 2 mm de longitud (diámetro exterior, 1,2 mm) mediante coledocotomía y se fijó con una sutura de seda circunferencial 8-0. La vena cava inferior y la vena porta se pinzaron de forma cruzada con clips de microvasos. La vena cava suprahepática se bajó usando una cinta de algodón que se pasó alrededor del hígado del hospedador y se pinzó de forma cruzada con una pinza Statinsky para bebés. Los vasos se dividieron y se extrajo el hígado. La vena cava suprahepática del donante se anastomosó de extremo a extremo con la vena cava suprahepática del hospedador con prolene 8-0 continuo. La vena porta y la vena cava infrahepática se anastomosaron mediante la técnica del manguito descrita anteriormente. Se canuló el conducto biliar común del donante con el tubo pequeño que se encontraba en el conducto biliar del hospedador y se ató en su sitio. La arteria hepática no se reconstruyó.

Grupos experimentales y tratamiento de animales. Las ratas trasplantadas se dividieron en cuatro grupos: (1) grupo de control (tratado con el mismo volumen de solución salina); (2) dosis baja de inmunosupresor (FK-506, 0,1 mg/kg/día); (3) movilizador de células madre (AMD3100, 1 mg/kg/día); y (4) combinación de dosis bajas de FK-506 y AMD3100. Se inyectaron AMD3100 y/o FK-506 por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión y los días 1, 2, 3 y 7 después del trasplante de hígado (fig. 1). Algunos de los animales fueron sacrificados el día 3, 7 y 10 después del trasplante y se recogieron tejido hepático, bazo y sangre periférica.

Citometría de flujo. Se analizaron suspensiones unicelulares (5×10^5) de monocitos de sangre periférica para determinar la expresión de CD34, CXCR4, c-Kit, Thy-1 y Sca-1. Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con suero de cabra y rata (Sigma) durante 30 minutos.

Estudios histológicos. Se evaluaron los cambios histológicos en las secciones de tejido hepático mediante tinción con H&E. Se analizaron las células positivas para GFP procedentes del receptor en secciones de tejido hepático mediante microscopía de fluorescencia confocal.

Análisis por RT-PCR. La expresión de ARNm de CD34, CXCR4, SDF-1, SCF, c-Kit, c-Met y Foxp3 en hígados y bazos se analizó mediante RT-PCR.

Resultados

El tratamiento con AMD aumenta significativamente las poblaciones de células madre en sangre periférica después del trasplante. La fig. 2 muestra que el porcentaje de células CD34⁺, c-Kit⁺, Thy-1⁺ y Sca1⁺ en sangre periférica aumentó significativamente en animales tratados con AMD en comparación con animales de control después del trasplante de hígado.

Una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 no solo aumentó la expresión de factores de células madre, sino también Foxp3 (marcador T-regulador) en aloinjertos hepáticos y bazos. El análisis por PCR muestra que la expresión de ARNm de SDF-1, SCF, c-Met, así como Foxp3 aumentaron significativamente en el grupo de AMD más dosis baja de FK-506 en comparación con otros grupos el día 7 después del trasplante (fig. 3).

Una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 aumenta las células procedentes del receptor y reduce la infiltración inflamatoria en aloinjertos de hígado el día 7 después del trasplante. La tinción con H&E muestra que en rechazo agudo de aloinjertos hepáticos 7 días después del trasplante, se había establecido una infiltración celular mononuclear intensa en las áreas portales expandidas con alteración de la arquitectura del hígado. El patrón de infiltración celular fue similar en los grupos tratados con AMD o dosis baja de FK-506, pero el número de células infiltrantes fue menor (fig. 4 paneles superior e intermedio). Por el contrario, había muchas menos células inflamatorias en las áreas portales en el grupo tratado con AMD más dosis baja de FK-506. Resulta interesante que hubo muchas más células positivas para GFP procedentes del receptor en el parénquima de aloinjertos de hígado en el grupo tratado con AMD más dosis baja de FK-506 en comparación con el grupo de AMD o FK-506 solo el día 7 después del trasplante (fig. 4, paneles inferiores). Estos resultados sugieren que una combinación de AMD y tratamiento con dosis bajas de FK no solo reduce el rechazo agudo, sino que también promueve la repoblación de aloinjertos de hígado por los

receptores.

La movilización de células madre en receptores con inmunosupresión a dosis bajas induce la aceptación del aloinjerto de hígado a largo plazo y prolonga la supervivencia del aloinjerto de piel del mismo donante. En el grupo de control, los aloinjertos de hígado se rechazaron en los 12 días posteriores al trasplante. El tratamiento con AMD o dosis baja de FK-506 no prolongó significativamente la supervivencia del receptor, aunque uno de los cinco receptores tratados con FK-506 sobrevivió durante más de 1 mes. Resulta interesante que una combinación de tratamiento con AMD y dosis baja de FK-506 indujo la aceptación (tolerancia) del aloinjerto a largo plazo sin efectos secundarios. En estos animales con aceptación del hígado, el aloinjerto de piel del mismo donante puede sobrevivir más de un mes después del trasplante.

Conclusión

La movilización de células madre de la médula ósea del receptor por AMD promueve la aceptación del aloinjerto de hígado y una combinación de AMD e inmunosupresores de dosis baja induce la aceptación del aloinjerto a largo plazo sin efectos secundarios. Pueden usarse agentes movilizadores de células madre de médula ósea para la inducción de tolerancia al trasplante de órganos.

Datos detallados complementarios

Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la movilización de células madre de médula ósea receptoras facilitará una rápida repoblación de aloinjertos de hígado en el modelo de rechazo agudo y reducirá o eliminará la necesidad de inmunosupresión. Para probar esta hipótesis, se realizaron trasplantes de hígado de ratas dark agouti (DA) a ratas Lewis, es decir, el modelo de rechazo. Las ratas receptoras se trataron con un movilizador de células madre hematopoyéticas (plerixafor) y/o dosis baja de inmunosupresor (tacrolimus). Las ratas trasplantadas se dividieron en cuatro grupos: 1) un grupo de control tratado con solución salina, 2) tratamiento con inmunosupresor de dosis baja (tacrolimus, 0,1 mg/kg/día), 3) movilizador de células madre (plerixafor (AMD3100), 1 mg/kg/día) solo o 4) una combinación de dosis baja de tacrolimus y plerixafor.

En ratas con trasplante de hígado pequeño, se inyectaron plerixafor y/o tacrolimus por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión y los días 1, 2, 3 y 7 después del trasplante. En ratas con trasplante de hígado completo, se inyectaron plerixafor y/o tacrolimus por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión y los días 1, 2, 3, 7, 10 y 15 después del trasplante. Los animales de cada grupo se sacrificaron los días 3, 7 y 10 después de la operación y se recogieron tejido hepático, bazo y sangre periférica.

La movilización eficaz de células madre de BMD receptoras con dosis bajas de IS y plerixafor induce la aceptación de aloinjerto de hígado pequeño a largo plazo y prolonga la supervivencia de un aloinjerto de piel del mismo donante. La fig. 2 muestra que el porcentaje de células CD34⁺, c-Kit⁺, Thy-1⁺ y Sca1⁺ en sangre periférica aumentó significativamente en animales tratados con plerixafor en comparación con animales de control después del trasplante de hígado. En el grupo de control, como anteriormente, todos los aloinjertos de hígado se rechazaron en los doce días posteriores al trasplante. El tratamiento con plerixafor o dosis baja de tacrolimus solo no prolongó significativamente la supervivencia del receptor (aunque uno de los cinco receptores tratados solo con dosis baja de tacrolimus sobrevivió 4 meses). Resulta interesante que la combinación de tratamiento con plerixafor y dosis baja de tacrolimus indujo la aceptación del aloinjerto a largo plazo (>6 meses) sin efectos secundarios evidentes (fig. 5A). En estos animales, un aloinjerto de piel posterior de la misma cepa donante sobrevivió durante más de un mes después del trasplante (fig. 5B) mientras que el aloinjerto de piel de ratas Brown-Norway (BN) (de terceros) fue rechazado en 6 días, lo que sugiere falta de respuesta específica del donante.

Una combinación de plerixafor y dosis baja de tacrolimus aumenta las células procedentes del receptor y reduce la infiltración inflamatoria en aloinjertos de hígado el día siete después del trasplante. La tinción H&E muestra que en los aloinjertos de hígado del grupo de control que experimentaron rechazo agudo siete días después del trasplante, estaba presente una infiltración celular mononuclear intensa en áreas portales expandidas con alteración de la arquitectura del hígado. Este patrón de infiltración celular fue similar en los animales tratados con plerixafor o dosis baja de tacrolimus, pero el número de células infiltrantes se redujo (fig. 4, paneles superior e intermedio). Por el contrario, hubo muchas menos células inflamatorias en las áreas portales de animales tratados tanto con plerixafor como con tacrolimus. Resulta interesante que hubo muchas más células positivas para GFP procedentes del receptor en el parénquima de aloinjertos de hígado de animales que recibieron ambos fármacos en comparación con el tratamiento con un solo fármaco el día 7 después del trasplante (fig. 4, paneles inferiores).

Tres meses después del trasplante, la fig. 6A muestra la regeneración del conducto biliar y muchos hepatocitos de tamaño pequeño en las áreas de las venas centrales. Se midió la fluorescencia de GFP de órganos completos usando el sistema Xenogen. Como se muestra en la fig. 6B, el hígado de DA donante no tiene expresión de GFP, como cabía esperar. Sin embargo, el injerto de hígado de donante trasplantado muestra un alto grado de fluorescencia a los tres meses del trasplante en un receptor de GFP-Lewis que fue tratado con plerixafor y tacrolimus. La microscopía fluorescente confirmó estos hallazgos (fig. 6C). Estos resultados sugieren que una combinación de tratamiento con plerixafor y tacrolimus no solo redujo el rechazo agudo, sino que también promovió la repoblación de aloinjertos de

hígado por células madre receptoras movilizadas.

El tratamiento con plerixafor y tacrólimus aumenta la expresión de factores de células madre, así como la tinción de Foxp3 (un marcador de linfocitos T reguladores) en aloinjertos hepáticos y bazo. El análisis de PCR muestra que la expresión de ARNm de SDF-1, SCF, c-Met, CD133 así como Foxp3 aumentaron significativamente en el grupo de tratamiento dual en comparación con todos los demás grupos el día 7 después del trasplante (Figura 3). Resulta interesante que IFN- γ (una citocina de Th1), IL-17 (una citocina de Th17) así como IL-6 (un promotor del desarrollo de Th17) disminuyeron significativamente en el grupo de tratamiento doble, aunque TGF- β (que es necesario para el desarrollo tanto de iTreg como de Th17) permaneció igual.

La expresión de la proteína SDF-1 se determinó adicionalmente mediante análisis de transferencia de Western. La fig. 7 muestra que los niveles de SDF-1 en aloinjertos de hígado recuperados de animales en el grupo de plerixafor más tacrólimus fueron significativamente mayores en comparación con otros grupos, especialmente a los 7 días después del trasplante.

La tinción de inmunohistoquímica (IHC) mostró que el número de células CD133⁺ en secciones tisulares de hígado y bazo del grupo de tratamiento doble se incrementó significativamente los días 3 y 7 después del trasplante (fig. 8). De forma similar, el número de células c-Met⁺ también se incrementó en el grupo de tratamiento doble. Resulta interesante que los patrones de tinción de CD133 y c-Met en secciones de tejido hepático fueron similares, lo que sugiere que estos marcadores pueden teñir muchas de las mismas células (fig. 9).

El número de células positivas (rojas) para c-Met derivadas de receptor (GFP⁺) determinado por tinción de inmunofluorescencia fue significativamente mayor en secciones tisulares de hígado y bazo en el grupo de tratamiento doble en comparación con los animales de control después del trasplante (DA en Lewis transgénicas para GFP) (fig. 10). La tinción por inmunofluorescencia también mostró que el número de células positivas para Foxp3 fue significativamente mayor en secciones tisulares de aloinjertos de hígado y bazo en el grupo de tratamiento doble (fig. 11).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con plerixafor y tacrólimus (dosis baja) facilita la movilización de células madre y la migración a aloinjertos hepáticos mediante mayor expresión de SDF-1 y también puede promover la diferenciación de linfocitos T reguladores Foxp3⁺. Es muy probable que la presente invención (activación de linfocitos T reguladores mediante la movilización de células madre de la médula ósea) también se pueda usar en otros trasplantes de órganos, tales como riñón, páncreas, corazón, pulmón, manos y rostros.

Una combinación de tratamiento con plerixafor y dosis baja de tacrólimus induce la aceptación del aloinjerto de hígado completo. En ratas con trasplante de hígado completo, se inyectaron plerixafor y/o tacrólimus por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión y los días 1, 2, 3, 7, 10 y 15 después del trasplante (fig. 12). La fig. 13 muestra que, en el grupo de control, todos los aloinjertos de hígado se rechazaron en los doce días posteriores al trasplante. El tratamiento solo con plerixafor o dosis baja de tacrólimus no prolongó significativamente la supervivencia del receptor. Resulta interesante que la combinación de tratamiento con plerixafor y dosis baja de tacrólimus indujo la aceptación del aloinjerto a largo plazo (>4 meses) sin efectos secundarios evidentes.

Ejemplo 2: Inducción de la aceptación del aloinjerto de riñón mediante la movilización de células madre de la médula ósea

Materiales y métodos

Cepas de rata y cuidados. Se adquirieron ratas DA (RT1A^a) de Harlan agree-Dawley (Indianápolis, IN) y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. La cepa de ratas Lewis (RT1^l) transgénica para proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvo del Centro de Investigación y Recursos para Ratas (RRRC) financiado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Universidad de Misuri, Columbia, MO. Los animales se mantuvieron en las instalaciones específicas sin patógenos de las Instituciones Médicas Johns Hopkins. Los animales fueron cuidados según las pautas de los NIH y bajo un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad Johns Hopkins.

Trasplante de riñón ortotópico. Se realizó un trasplante de riñón ortotópico en ratas con anestesia por inhalación de isoflurano (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) según la técnica descrita por Daniller (1968). Específicamente, se estudió el modelo de rechazo agudo de DA a Lewis. En resumen, se lavaron riñones de donantes obtenidos de ratas DA macho con 10 ml de solución salina fría y se almacenaron a 4 °C mientras se preparaba el receptor. El tiempo total de isquemia en frío no superó los 40 minutos. Los receptores masculinos de Lewis recibieron trasplantes después de una nefrectomía nativa izquierda. La arteria renal, la vena y el uréter del donante se anastomosaron a la arteria renal, vena y uréter del receptor. La anastomosis se completó utilizando suturas de seda 10-0. Se extrajo el riñón nativo derecho antes de cerrar el abdomen.

Grupos experimentales y tratamiento de animales. Las ratas trasplantadas se dividieron en cuatro grupos, incluyendo el grupo de control (tratado con el mismo volumen de solución salina), dosis baja de inmunosupresor (FK-506, 0,05 mg/kg/día), movilizador de células madre (AMD3100, 1 mg/kg/día) y una combinación de dosis baja de FK-506 y

AMD3100. Se inyectaron AMD3100 por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión (día 0) y el día 2, 4 y 6 después del trasplante de riñón. Se inyectó FK-506 por vía subcutánea inmediatamente después de la reperusión (día 0) y el día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 después del trasplante. Los tratamientos se repitieron en el grupo tratado con combinación a los 1, 2 y 3 meses después del trasplante. Algunos de los animales fueron sacrificados el día 7 y 30 después del trasplante y se recogieron tejido renal, bazo y sangre periférica.

Citometría de flujo. Se analizaron suspensiones unicelulares (5×10^5) de monocitos de sangre periférica para determinar la expresión de CD34, CD133, Thy1 y c-Kit de linaje negativo. Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con suero de cabra y rata (Sigma) durante 30 minutos.

Estudios histológicos. Se evaluaron los cambios histológicos en las secciones de tejido renal mediante tinción con H&E. Se analizaron las células positivas para GFP procedentes del receptor en secciones de tejido renal mediante microscopia de fluorescencia.

Análisis de imágenes de Xenogen para aloinjertos de riñón. La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en aloinjertos de riñón se analizó mediante el sistema de captura de imágenes Xenogen.

Resultados

El tratamiento con AMD y dosis baja de FK aumenta significativamente las poblaciones de células madre en la sangre periférica. Se aislaron células de sangre periférica de animales a las 3 horas después de la inyección con AMD y/o FK. Se midió el hemograma completo (CBC) y se cuantificaron los marcadores de células madre mediante citometría de flujo. El número absoluto de células madre se calculó como glóbulos blancos ($\text{mil}/\mu\text{l}$) $\times$ % de células madre. La fig. 14 muestra que el número absoluto de células c-Kit⁺, CD133⁺ o linaje negativo (Lin⁻) y triples positivas Thy1⁺c-Kit⁺CD133⁺ en sangre periférica aumentó significativamente en los animales tratados con AMD en comparación con los animales tratados con solución salina o G-CSF. Sorprendentemente, el tratamiento con dosis baja de FK (0,1 mg/kg) pero no dosis altas de FK aumenta significativamente las células c-Kit⁺ y CD133⁺ en sangre periférica. Resulta interesante que la elevación de células Thy1⁺c-Kit⁺CD133⁺ fue más drástica en animales tratados con una combinación de AMD y dosis baja de FK-506. Estos resultados sugieren una función sinérgica de AMD y dosis baja de FK-506 en la movilización de células madre de la médula ósea.

La movilización de células madre en receptores con AMD y dosis baja de FK-506 induce la aceptación del aloinjerto de riñón a largo plazo. En el grupo de control (fig. 15), los aloinjertos de riñón se rechazaron en los primeros 10 días después del trasplante. El tratamiento con AMD o dosis baja de FK (0,05 mg/kg) no prolongó la supervivencia del receptor. Resulta interesante que una combinación de tratamiento con AMD y dosis baja de FK-506 (0,05 mg/kg) indujo la aceptación del aloinjerto a largo plazo sin efectos secundarios. Todos los receptores (100 %) tratados con AMD y dosis baja de FK sobreviven durante más de tres meses.

Una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 promueve la repoblación de aloinjertos de riñón por células procedentes del receptor. Se trasplantaron riñones de ratas DA a receptores de GFP-Lewis. Se midió la fluorescencia de GFP de órganos completos usando el sistema Xenogen. Como se muestra en la fig. 16, el riñón de DA donante no tiene expresión de GFP, como cabía esperar. Sin embargo, el injerto de riñón de donante trasplantado muestra un alto grado de fluorescencia 1 mes después del trasplante en un receptor de Lewis transgénico para GFP que fue tratado con AMD y tacrólimus (0,1 mg/kg). Aunque las células inflamatorias del receptor podrían haber explicado esto, se encontró que las células positivas para GFP procedentes del receptor aparecían en los túbulos del aloinjerto y las propias células epiteliales de los túbulos eran positivas para GFP. Estos resultados sugieren que las células madre procedentes del receptor pueden ayudar a regenerar los túbulos y una combinación de tratamiento con AMD y dosis baja de FK no solo reduce el rechazo agudo, sino que también promueve la repoblación de aloinjertos de riñón por los receptores.

Conclusión

La movilización de células madre de la médula ósea del receptor por AMD promueve la aceptación del aloinjerto de riñón y una combinación de AMD y dosis baja de tacrólimus induce la aceptación del aloinjerto de riñón a largo plazo sin efectos secundarios. Pueden usarse agentes movilizadores de células madre de médula ósea para la inducción de tolerancia al trasplante de riñón.

Ejemplo 3: Inducción de la aceptación del aloinjerto de piel mediante inmunosupresión a dosis bajas y movilización de células madre de la médula ósea

La piel alogénica ha tenido una función importante en el cuidado de las quemaduras agudas durante más de 100 años y es el método de referencia para los sustitutos temporales de la piel. El principal obstáculo para el uso prolongado es su inmunogenicidad.

Basándose en los datos descritos en el presente documento, se plantea además la hipótesis de que la movilización de células madre de la médula ósea del receptor facilitará una repoblación de aloinjertos de piel con células

procedentes del receptor y reducirá o eliminará la necesidad de inmunosupresión en esta población de pacientes donde la infección desempeña un papel importante en la mortalidad. Para probar esta hipótesis, se realizaron trasplantes de piel de ratas DA a ratas Lewis y las ratas receptoras se trataron con movilizador de células madre (mozobil: AMD3 100) y/o dosis baja de inmunosupresor (tacrólimus, FK-506).

Materiales y métodos

Cepas de rata y cuidados. Se adquirieron ratas DA (RT1A^a) y ratones C57/B6 de Harlan ague-Dawley (Indianápolis, IN) y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. La cepa de ratas Lewis (RT1^l) transgénica para proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvo del Centro de Investigación y Recursos para Ratas (RRRC) financiado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Universidad de Misuri, Columbia, MO. Los animales se mantuvieron en las instalaciones específicos sin patógenos de las Instituciones Médicas Johns Hopkins. Los animales fueron cuidados según las pautas de los NIH y bajo un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad Johns Hopkins.

Trasplante de piel. Se utilizaron ratas DA o ratones C57/B6 como donantes de piel y ratas Lewis transgénicas para GFP como receptores. Se preparó un lecho de injerto (2,5 × 3 cm) en el lomo de una rata receptora; se prestó especial atención a la conservación del panículo carnoso. Se trasplantó un injerto de 2,5x3 cm², que se había preparado a partir del tronco del cuerpo de un donante, con suturas interrumpidas de seda 5-0. El injerto se cubrió con una cinta protectora y la primera inspección se realizó 2 días después del injerto de piel y se siguió de una inspección diaria. El rechazo se definió como el día en que el injerto de piel desarrolló un color marrón rojizo y una consistencia dura.

Grupos experimentales y tratamiento de animales. Las ratas trasplantadas se dividieron en cuatro grupos, incluyendo el grupo de control (tratado con el mismo volumen de solución salina), dosis baja de inmunosupresor (FK-506, 0,1 mg/kg/día), movilizador de células madre (AMDS 100, 1 mg/kg/día) y una combinación de dosis baja de FK-506 y AMD3100. Se inyectaron AMD3100 por vía subcutánea inmediatamente después del trasplante y cada dos días después del trasplante de piel. Se inyectó FK506 por vía subcutánea todos los días después del trasplante.

Biopsias. En momentos seleccionados, se tomaron biopsias en sacabocados de espesor completo de 2,0 mm para la evaluación histológica de muestras congeladas y en formalina y el análisis por imágenes de Xenogen de la expresión de GFP.

Resultados

La movilización de células madre en receptores con AMD y dosis baja de FK-506 induce la aceptación a largo plazo del aloinjerto de piel y prolonga la supervivencia del xenoinjerto de piel. En el grupo de control (tabla 1), los aloinjertos de piel se rechazaron en los primeros 7 días después del trasplante. El tratamiento con AMD o dosis baja de FK (0,1 mg/kg) no prolongó significativamente la supervivencia del aloinjerto. Resulta interesante que una combinación de tratamiento con AMD y dosis baja de FK-506 (0,1 mg/kg) indujo la aceptación del aloinjerto de piel a largo plazo sin efectos secundarios. Todos los aloinjertos de piel en receptores tratados con AMD y dosis baja de FK sobreviven durante más de un mes. De forma similar, el tratamiento con AMD o dosis baja de FK no prolongó la supervivencia del xenoinjerto. Sin embargo, una combinación de AMD y dosis baja de FK prolongó significativamente la supervivencia del xenoinjerto (tabla 1 y fig. 1).

Tabla 1. Supervivencia del injerto de piel

Donantes	Receptores	Tratamiento	Número	Supervivencia del injerto (días)
DA	Lewis	Solución salina	3	6, 6, 7
		FK (0,1 mg/kg)	3	7, 8, 9
		AMD (1 mg/kg)	4	6, 7, 7, 8
		AMD+FK	6	>30 (6)
C57/B6	Lewis	Solución salina	3	5 (3), 6
		FK (0,1 mg/kg)	3	5, 6, 6
		AMD (1 mg/kg)	3	5 (2), 6
		AMD+FK	4	17, 18 (2), 20

Una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 promueve la repoblación de injertos de piel por células procedentes del receptor. Se midió la fluorescencia de GFP de biopsias cutáneas usando el sistema Xenogen. Como se muestra en la fig. 18A, la piel del receptor de GFP expresa una fluorescencia fuerte y la piel del donante DA o C57/b6 no tiene expresión de GFP, como cabía esperar. Sin embargo, el injerto de piel de donante trasplantado muestra un alto grado de fluorescencia 7 días después del trasplante en un receptor de Lewis transgénico para GFP que fue tratado con

- AMD y tacrólimus (0,1 mg/kg). Resulta interesante que el grado de fluorescencia en los aloinjertos de piel es mayor en comparación con los xenoinjertos. Permanece un alto nivel de fluorescencia en los aloinjertos de piel a los 28 días después del trasplante (fig. 18B). La fig. 19 muestra una piel recién regenerada con pelo blanco que sugiere la repoblación del aloinjerto de piel por el receptor. Estos resultados sugieren que las células madre procedentes del receptor pueden repoblar el injerto de piel y una combinación de tratamiento con AMD y dosis baja de FK no solo reduce el rechazo agudo, sino que también promueve la repoblación de aloinjertos de piel por los receptores.

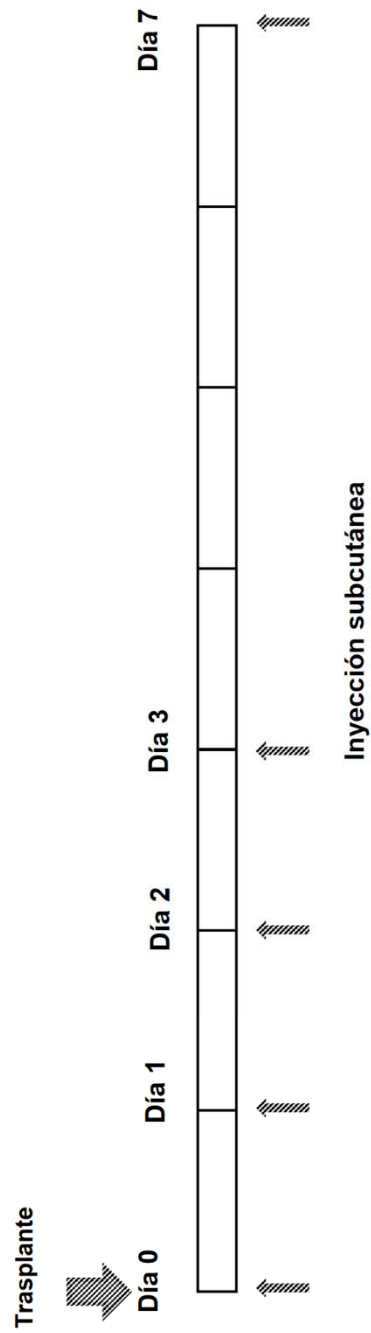
Conclusión

- 10 La movilización de células madre de la médula ósea del receptor mediante AMD y dosis baja de tacrólimus promueve la aceptación del aloinjerto de piel y una combinación de AMD y dosis baja de tacrólimus prolonga la supervivencia del xenoinjerto de piel sin efectos secundarios. Los aloinjertos de piel pueden ser repoblados por células procedentes del receptor. Pueden usarse agentes movilizadores de células madre de médula ósea para la inducción de tolerancia al trasplante de piel.

REIVINDICACIONES

1. Plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso en un método de tratamiento de un receptor de trasplante de órgano para promover la supervivencia del aloinjerto e inducir la aceptación del aloinjerto,
5 en donde el plerixafor (AMD3100) y el tacrólimus se administran al receptor en una cantidad terapéuticamente eficaz.
2. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según la reivindicación 1, en donde el órgano se selecciona entre el grupo que consiste en hígado, riñón, piel, corazón, pulmón, intestino y páncreas.
- 10 3. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según la reivindicación 1, en donde el órgano es el hígado.
4. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según la reivindicación 1, en donde el órgano es el riñón.
5. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según la reivindicación 1, en donde el órgano es la piel.
15
6. Plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso en un método de tratamiento de un receptor de trasplante de tejido compuesto para promover la supervivencia del aloinjerto e inducir la aceptación del aloinjerto, en donde el plerixafor (AMD3100) y el tacrólimus se administran al receptor en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 20 7. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el plerixafor (AMD3 100) y el tacrólimus se administran una vez cada dos días.
8. El plerixafor (AMD3100) y tacrólimus para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el plerixafor (AMD3 100) y el tacrólimus se administran una vez al mes.

Protocolo Experimental para trasplante de hígado pequeño



Grupos experimentales:

1. Solución salina: Control
2. AMD3465 (1mg/kg): AMD
3. Tacrólimus (0,1mg/kg): FK
4. AMD3465 (1mg/kg) + Tacrólimus (0,1mg/kg): AMD+FK

FIG. 1

Células madre en sangre periférica después del trasplante de hígado

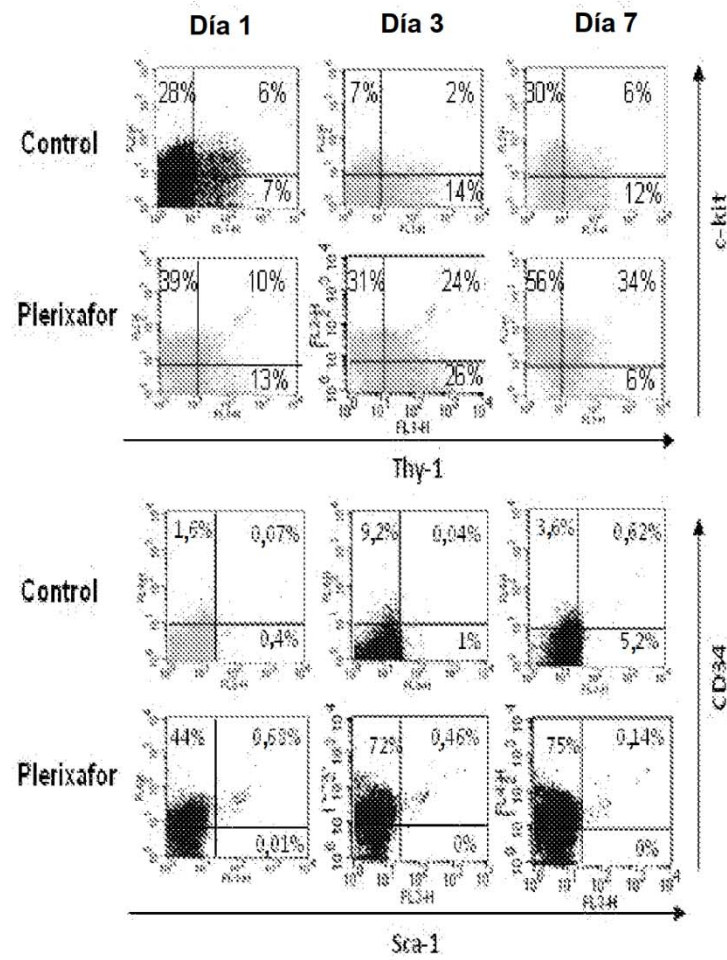


FIG. 2

Análisis de PCR: 7 días después de TPH

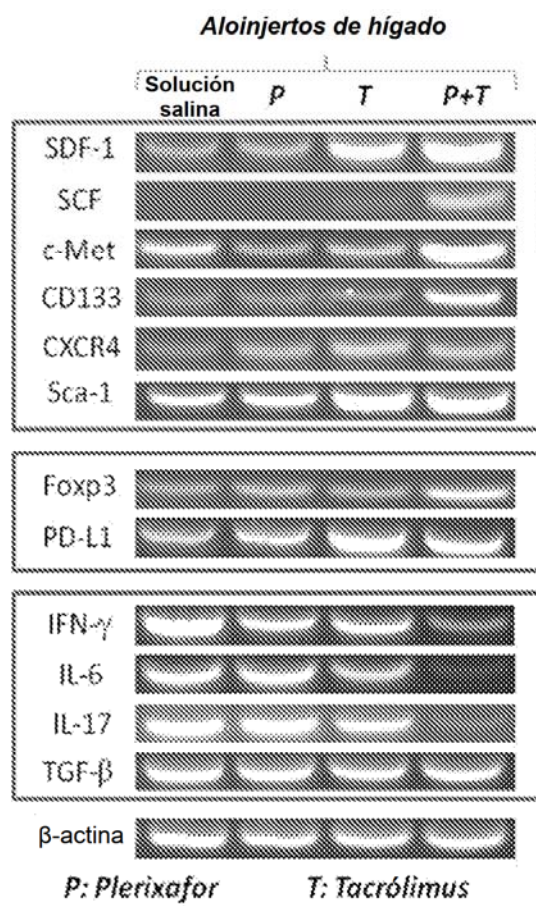


FIG. 3

Hígado de DA pequeño trasplantado a receptores GFP-Lewis: día 7 después de TPH

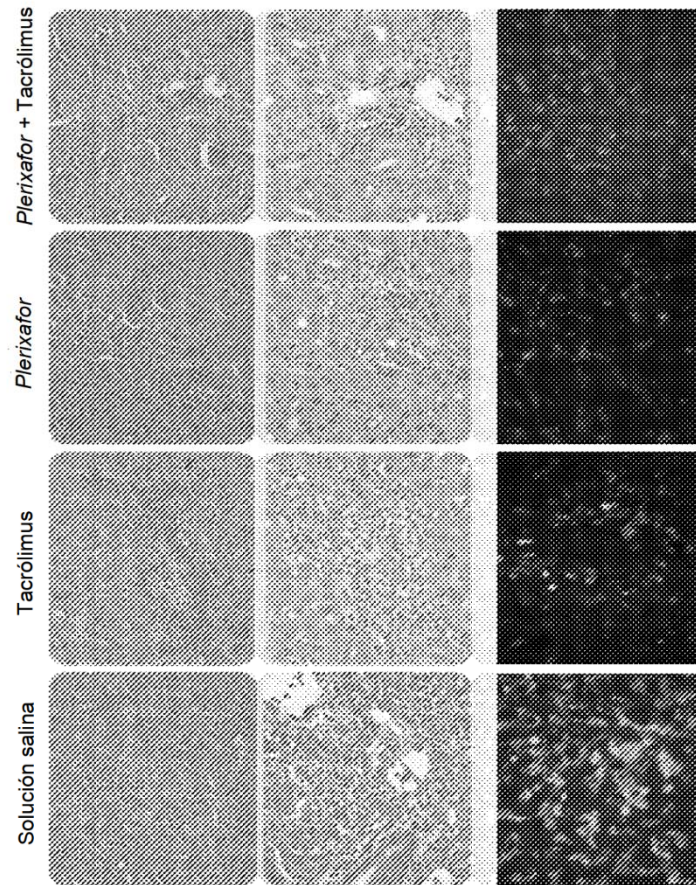


FIG. 4

Supervivencia tras aloinjerto de hígado pequeño y piel en modelo de rechazo agudo (DA a Lewis)

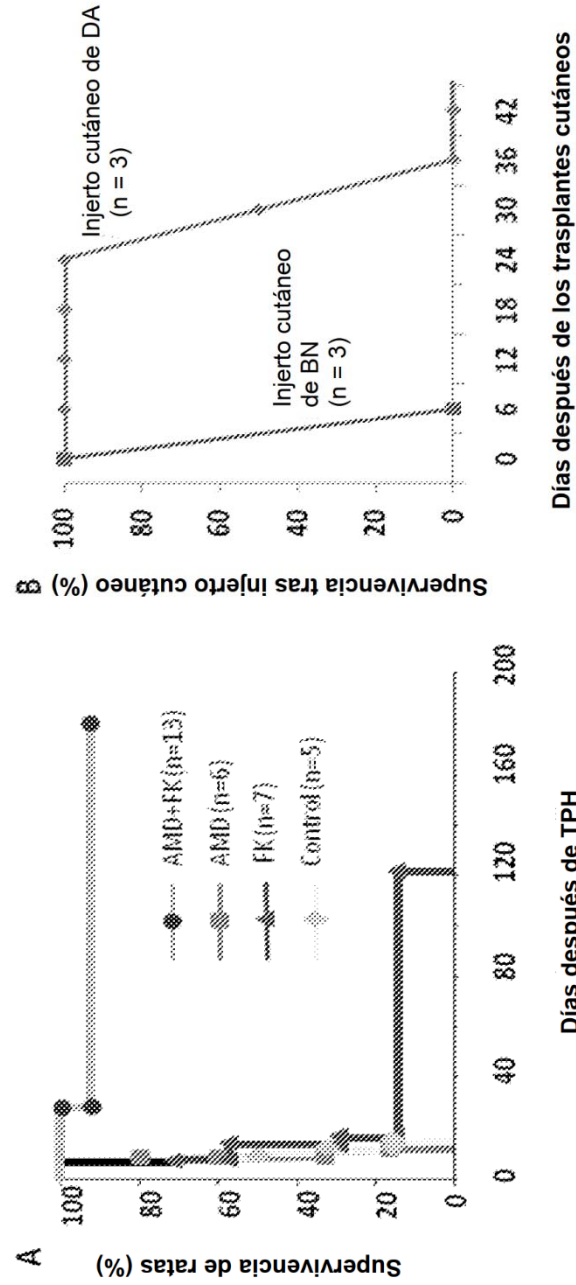


FIG. 5

Imágenes de proteína verde fluorescente

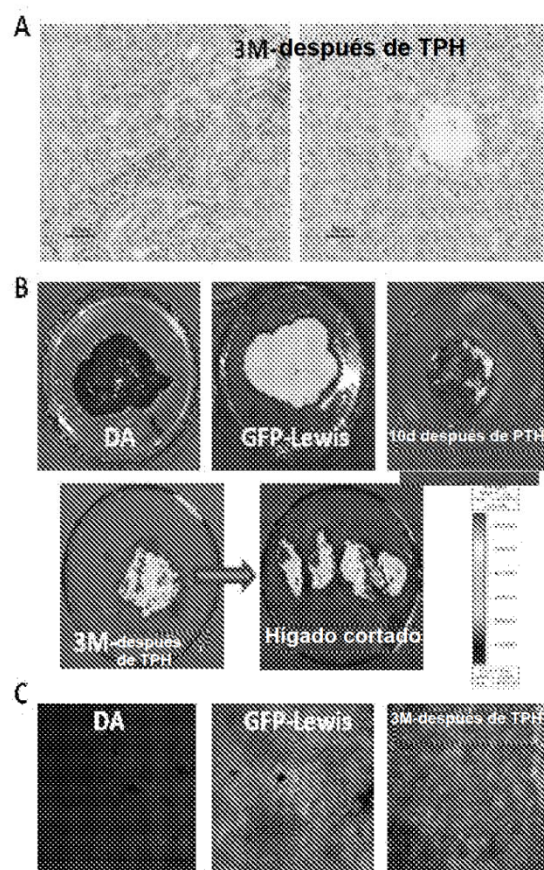


FIG. 6

**Expresión de SDF-1 en injertos de hígado pequeño
después de trasplante (DA en Lewis)**

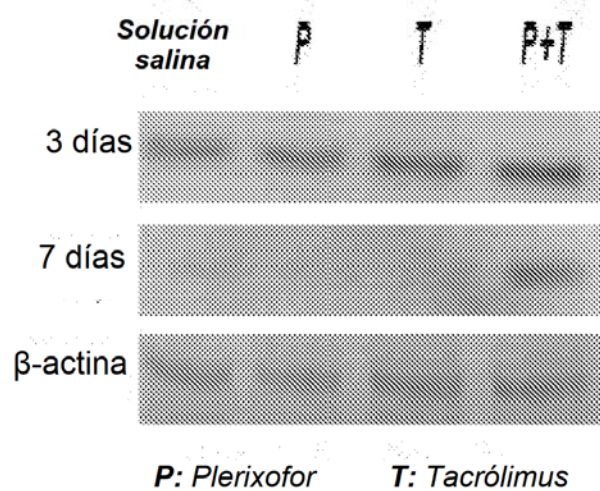


FIG. 7

Detección de células madre CD133+ en aloinjertos de hígado y bazo los días 3 y 7 después del trasplante
 Tinción de inmunohistoquímica: las células CD133+ muestran color marrón

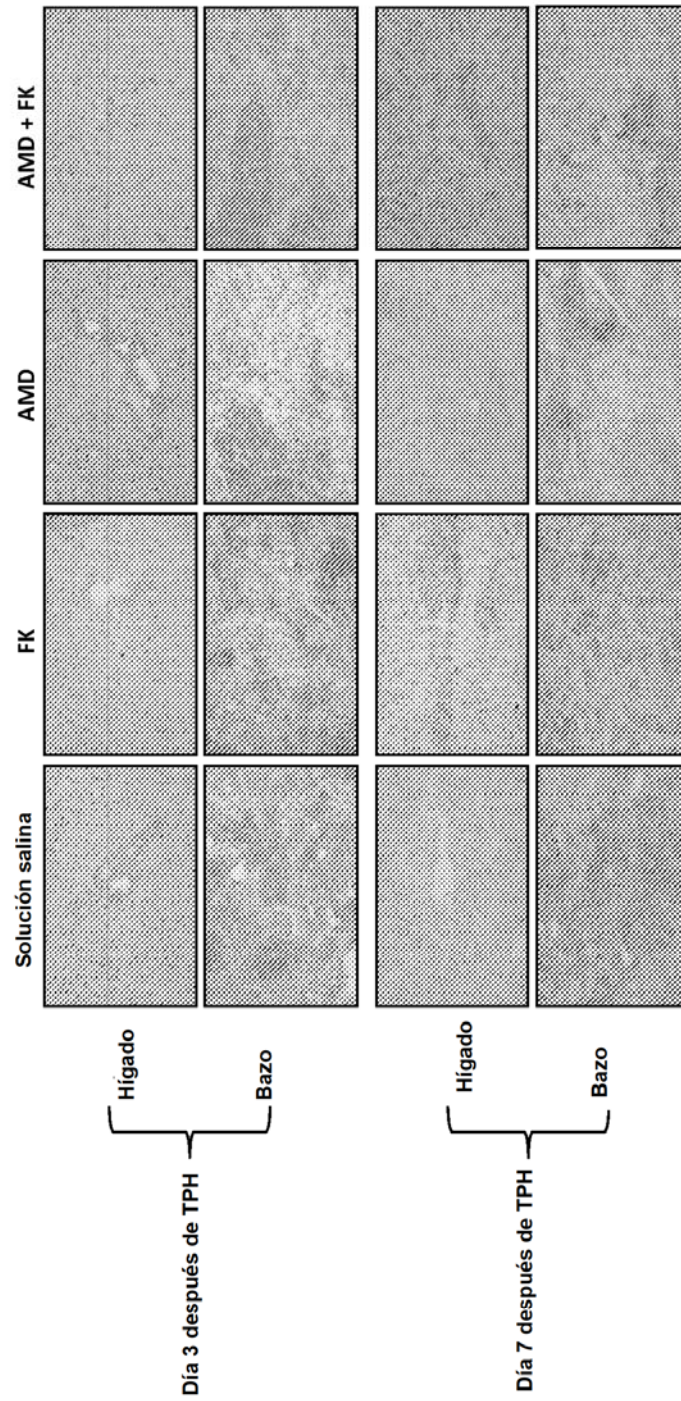


FIG. 8

Detección de células CD133+ y c-Met+ en aloinjertos de hígado 7 después del trasplante
 Tinción de inmunohistoquímica: las células CD133+ o c-Met+ muestran color marrón

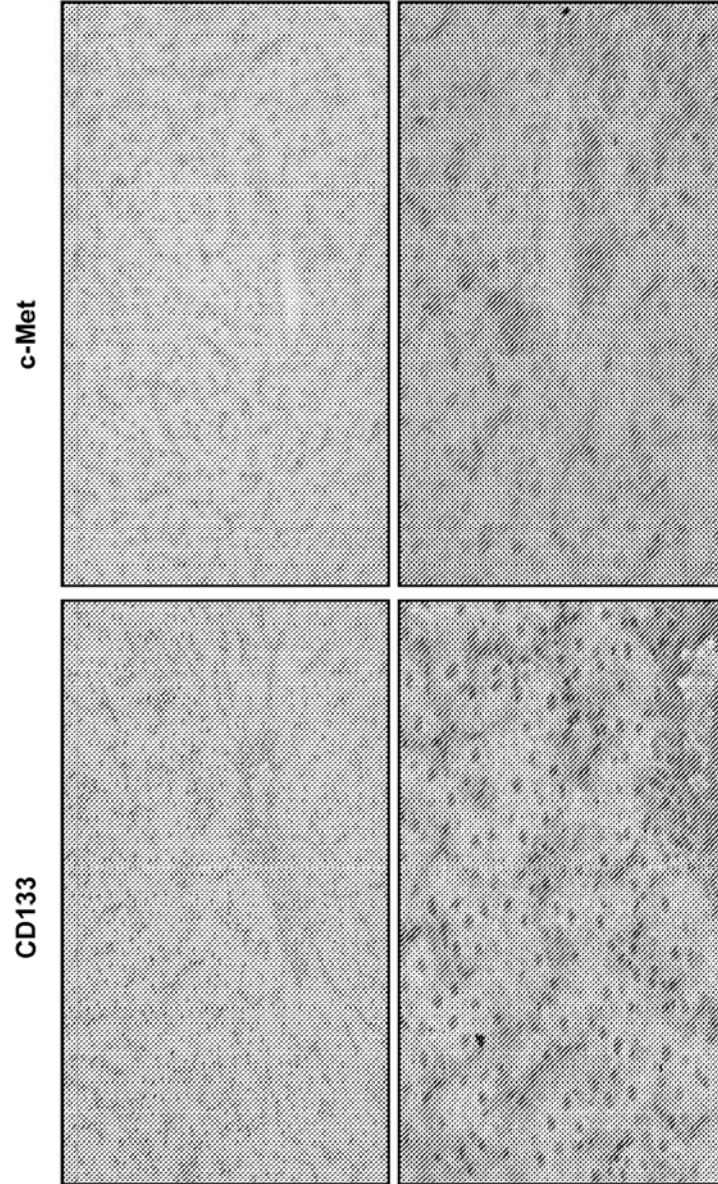


FIG. 9

Detección de células receptoras de fenotipo positivo para c-Met en aloinjertos de hígado
7 días después del trasplante

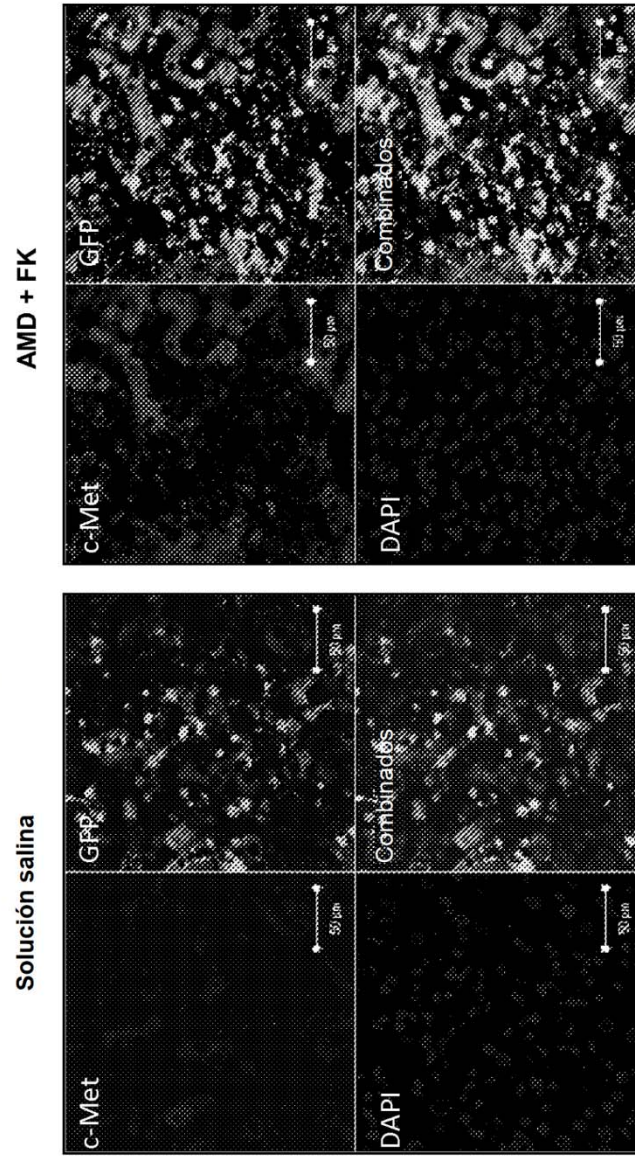


FIG. 10

Expresión de Foxp3 en aloinjertos de hígado y bazos 7 días después del trasplante

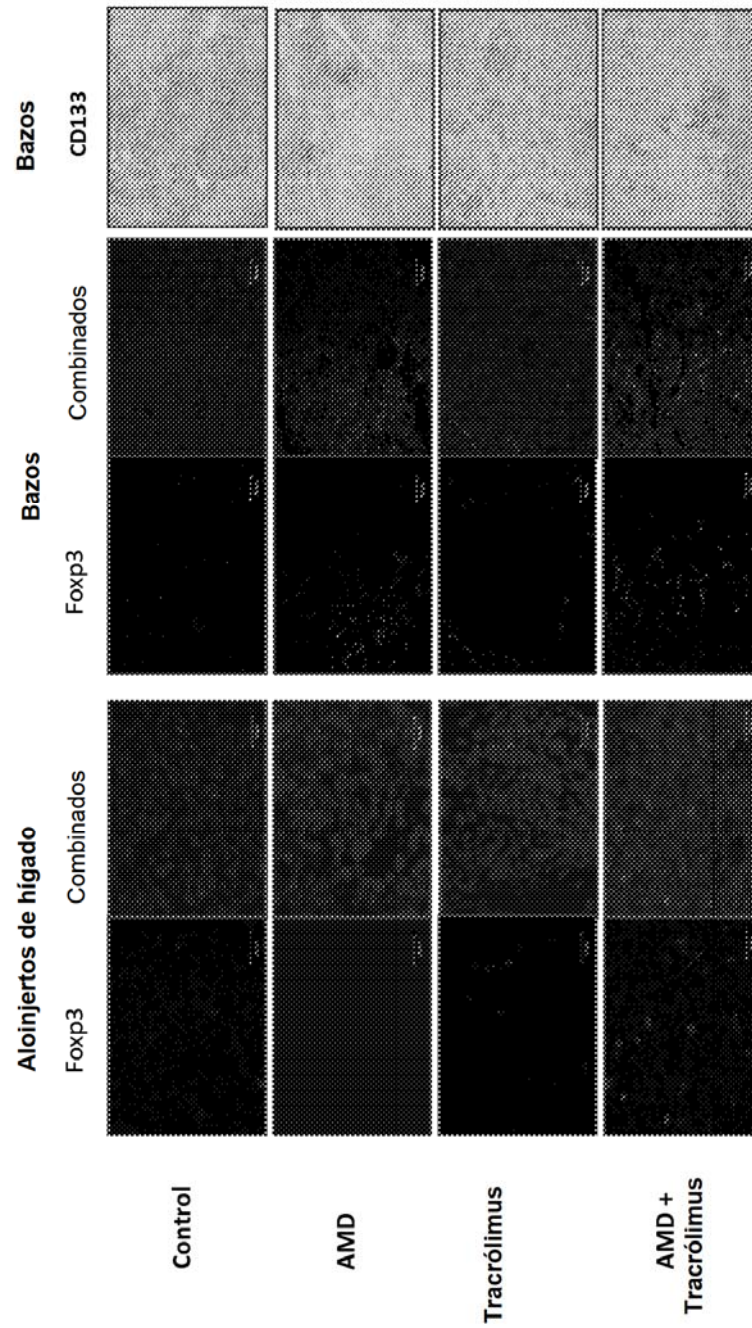
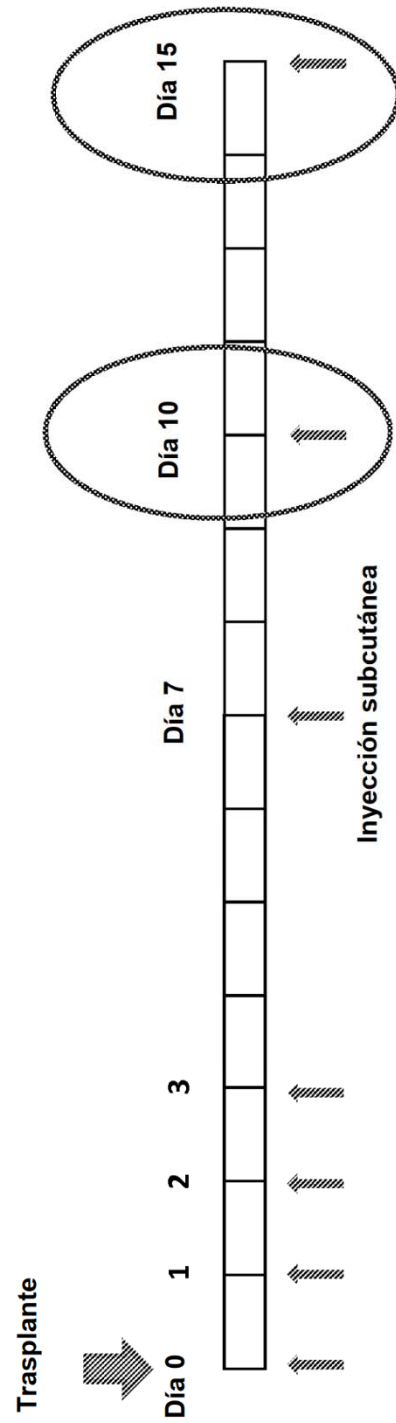


FIG. 11

Protocolo experimental para trasplante de hígado completo



Grupos experimentales:

1. Solución salina: Control
2. AMD (1mg/kg): AMD
3. Tacrólimus (0,1mg/kg): FK
4. AMD (1mg/kg) + Tacrólimus (0,1mg/kg): AMD+FK

FIG. 12

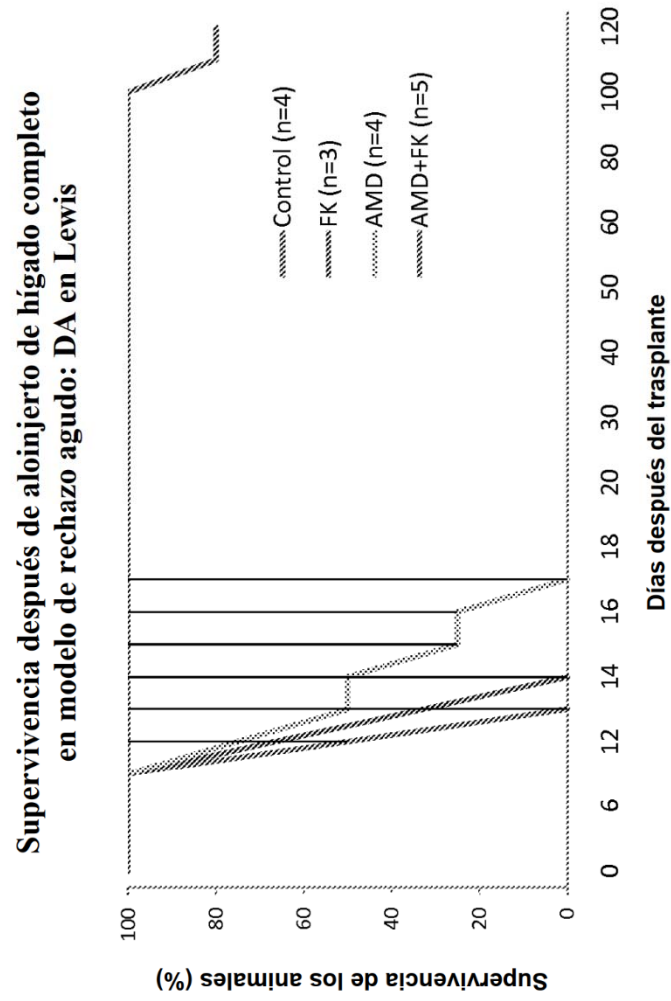


FIG. 13

El tratamiento con AMD y dosis baja de FK506 aumenta las poblaciones de células madre en sangre periférica

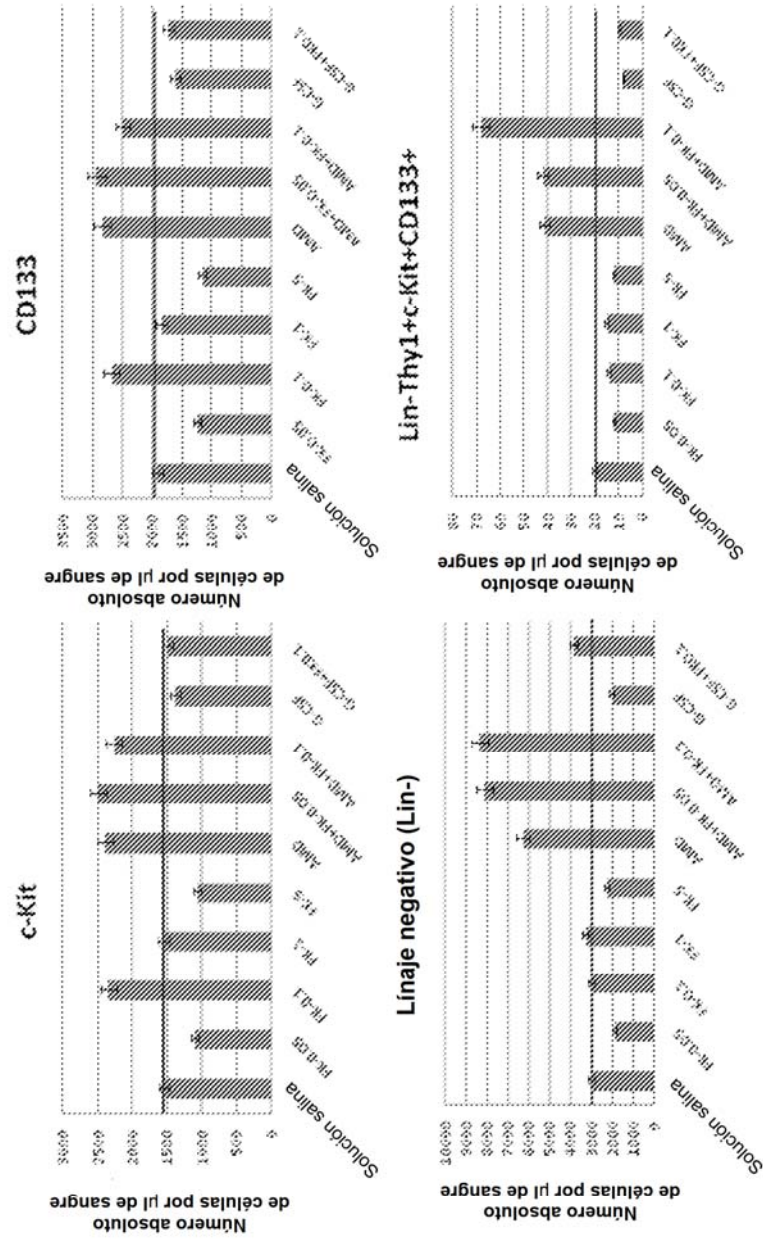


FIG. 14

La movilización de células madre en el receptor con una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 induce la supervivencia después del aloinjerto de riñón a largo plazo

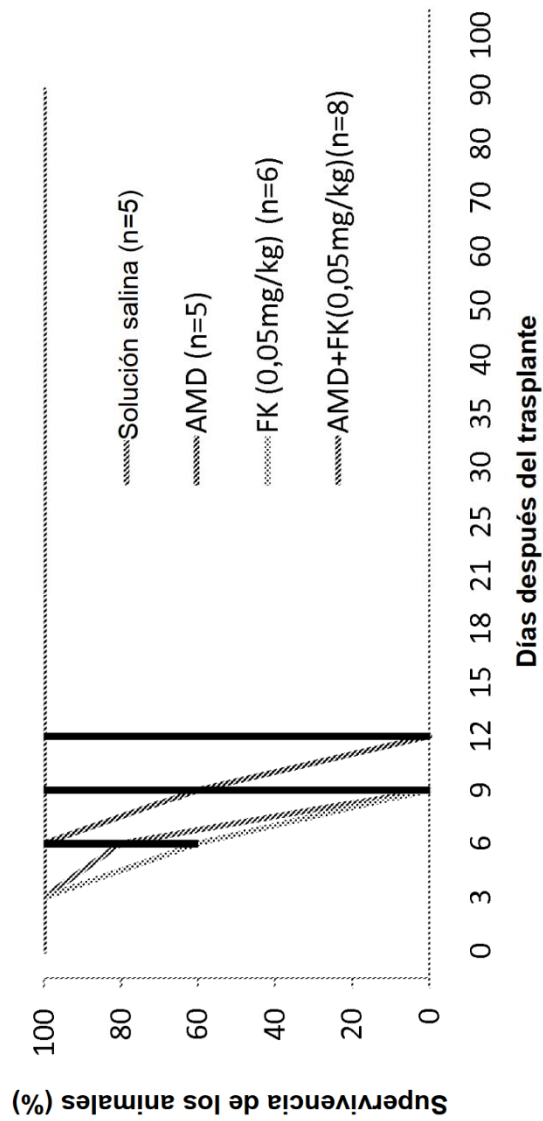


FIG. 15

Una combinación de AMD y dosis baja de FK-506 promueve la repoblación de aloinjertos de riñón por células procedentes del receptor

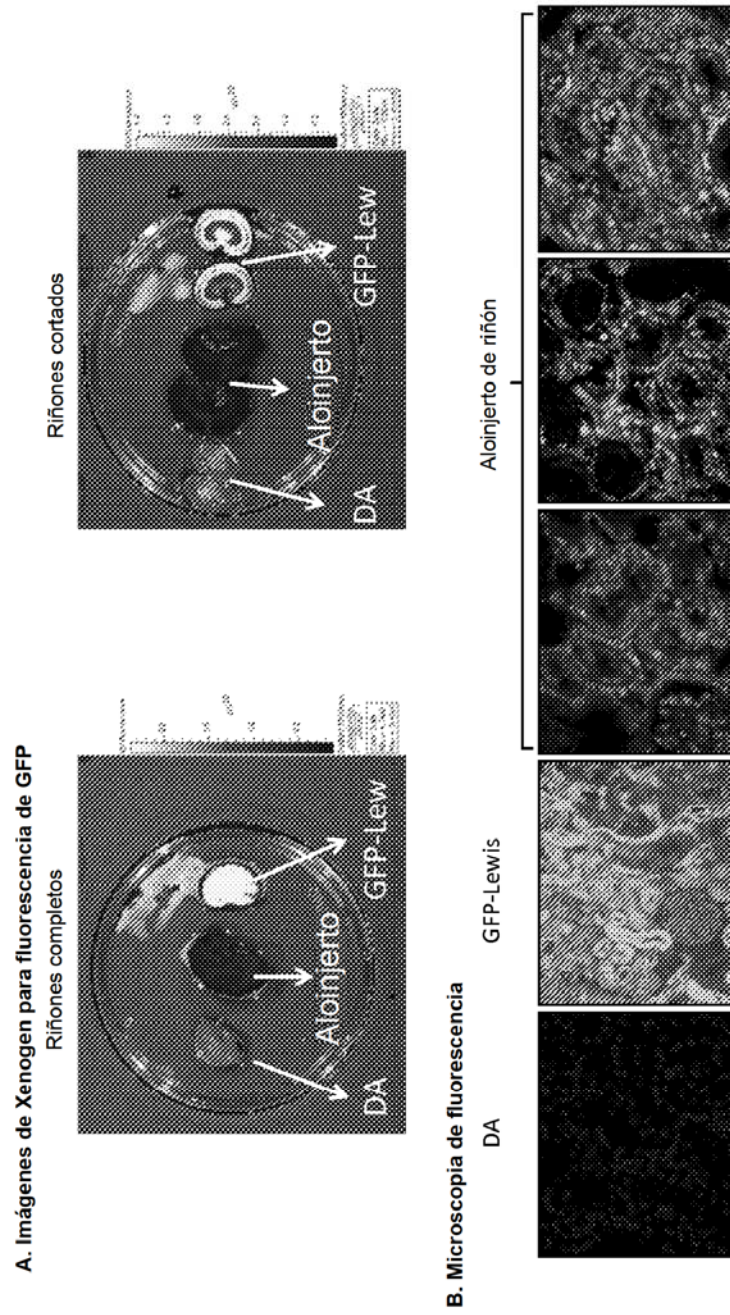


FIG. 16

Supervivencia después de xenoinjerto cutáneo: ratón a rata

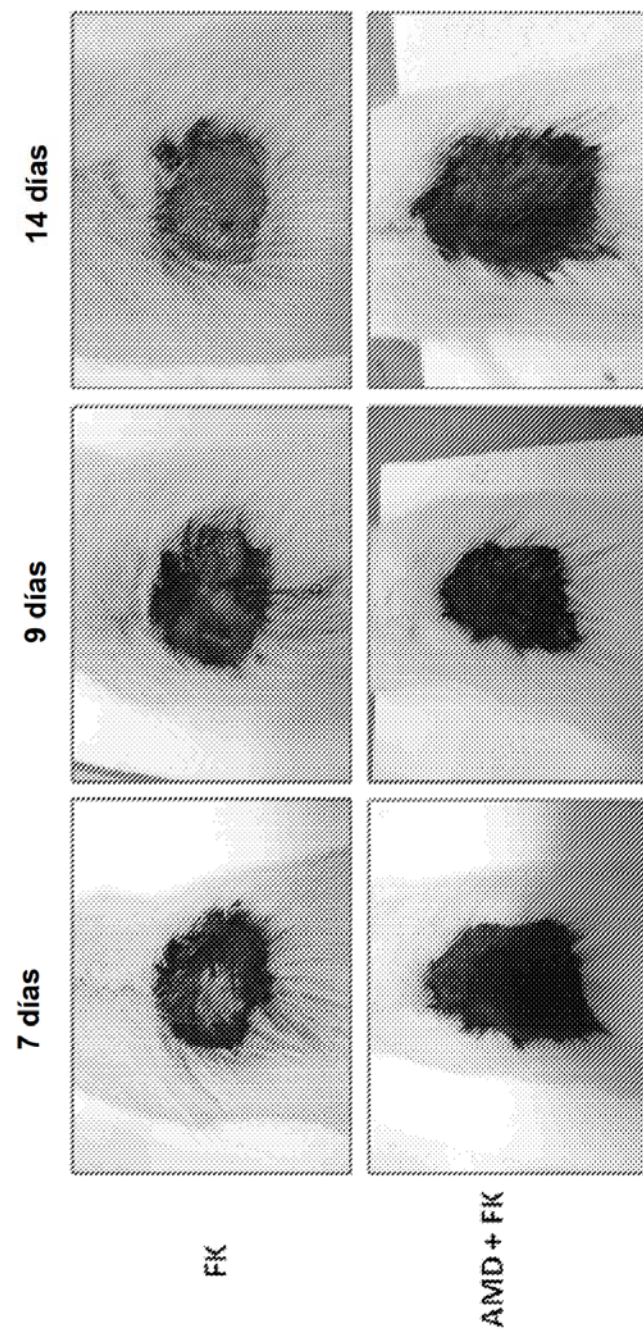
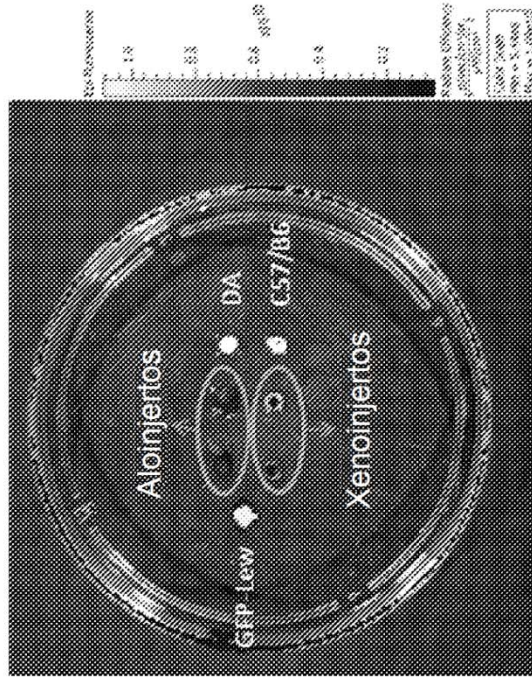


FIG. 17

Expresión de GFP en injertos cutáneos

A. 7 días después del trasplante



B. 28 días después del trasplante

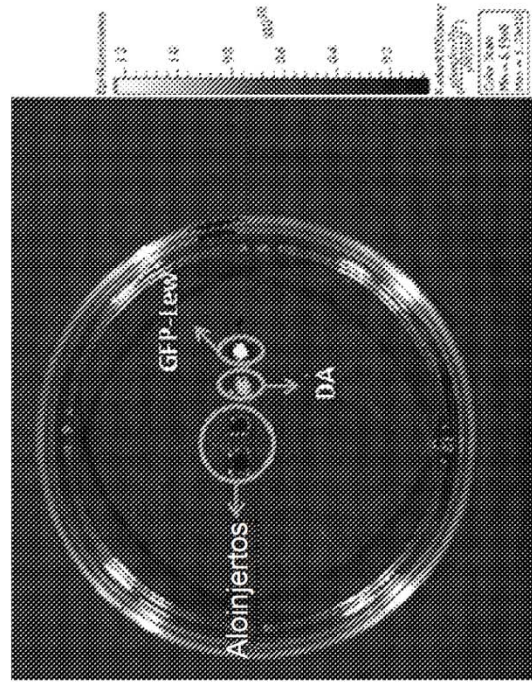
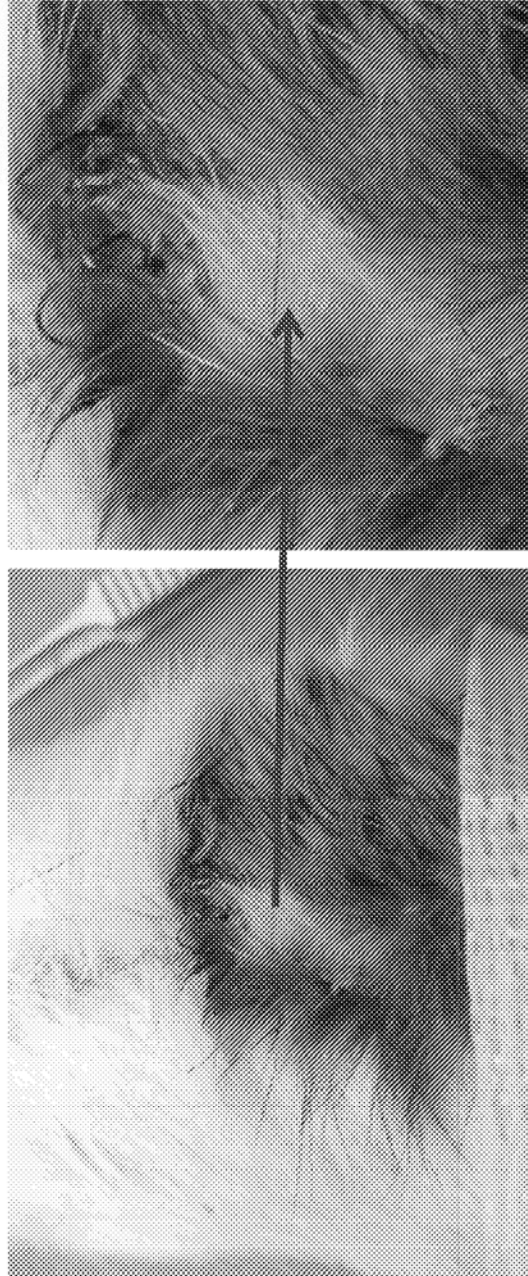


FIG. 18

**Repoblación de aloinjerto cutáneo por el receptor
36 días después del trasplante**



Piel de nueva regeneración
(con pelo blanco)

FIG. 19