



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 321 189**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 5/06** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03811648 .9**

⑯ Fecha de presentación : **07.05.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1511515**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

⑭ Título: **Estimulación de la hematopoyesis por medio de células inmunitarias activadas ex vivo.**

⑩ Prioridad: **29.05.2002 US 159148**

⑬ Titular/es: **Demao Yang**  
**1921 Rock Street, Suite 16**  
**Mountain View, California 94043, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.06.2009**

⑭ Inventor/es: **Yang, Demao**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.06.2009**

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 189 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

Estimulación de la hematopoyesis por medio de células inmunitarias activadas *ex vivo*.

5 **Antecedentes de la invención**

1. **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a terapias para la anemia aplásica, la anemia y la púrpura trombocitopénica. 10 En particular, la presente invención se refiere a células inmunitarias activadas *ex vivo* como terapias para la anemia aplásica, la anemia y la púrpura trombocitopénica. Además, la invención se refiere a enfoques para activar las células y a los enfoques de cultivo celular correspondientes.

15 **2. Antecedentes**

La anemia aplásica es una enfermedad que se caracteriza por la hematopoyesis ineficaz. Los pacientes tienen 20 grados variables de anormalidades en la producción de todos los tipos de células de la sangre. Aunque en la mayoría de los casos, se desconoce la causa de la enfermedad, se sospecha que la radiación, los compuestos basados en benceno, los virus (por ejemplo, hepatitis), las toxinas ambientales, y los medicamentos sin receta y con receta han dañado la médula ósea, llevando de esta manera a la apoptosis de las células madre de la médula ósea. Independientemente 25 de las causas subyacentes, los pacientes muestran manifestaciones clínicas y cursos de progresión de la enfermedad similares. La anemia aplásica afecta principalmente a hombres jóvenes y a personas de edad avanzada de ambos géneros. Anualmente, dos a seis por millón en todo el mundo desarrollan este trastorno, con una prevalencia de incidencias en Oriente con respecto a Europa o a los Estados Unidos. Existen varias hipótesis sobre el fenómeno causante de la anemia aplásica: congénito, gestacional, viral y fármacos y productos químicos.

El agente causante citado más frecuentemente de anemia aplásica es la exposición a fármacos o compuestos químicos. Algunos agentes, tales como el cloranfenicol, el benceno, la radiación ionizante y los agentes antineoplásicos, provocan una aplasia cuya gravedad está relacionada con la dosis de persona a persona. En estos casos, la recuperación 30 de la médula ósea se produce generalmente tras de la retirada del agente causante. Otros agentes, incluidos pesticidas y algunos anticonvulsivos y antimicrobianos, provocan una reacción que no está relacionada con la dosis y, por consiguiente, no puede predecirse con el control hematológico durante la administración. Durante la administración de fármacos, pueden presentarse aplasias incluso después del cese de la terapia con el fármaco. En contraste con los 35 pacientes con anemia aplásica idiopática, los que tuvieron exposición a fármacos o toxinas exhiben características clínicas y demográficas similares, tienen un pronóstico similar, y una respuesta más o menos uniforme a la terapia.

En el caso de la anemia aplásica inducida por benceno, los síntomas leves a moderados de la enfermedad desaparecen generalmente después de que los pacientes dejan de estar expuestos al benceno. Sin embargo, para los pacientes 40 con fallo grave de la médula ósea o quienes necesitan continuamente el tratamiento con transfusiones de sangre, el tratamiento eficaz y seguro no ha estado disponible frecuentemente hasta ahora. Hasta la fecha, el trasplante de médula ósea es la única cura conocida.

Los pacientes con aplasia leve se tratan frecuentemente con la menor terapia posible. El fundamento para el tratamiento mínimo para los pacientes con aplasia leve es eliminar el agente causante, permitiendo de esta manera la recuperación espontánea. En pacientes jóvenes con anemia grave, el tratamiento de elección es el trasplante de médula ósea con un donante HLA compatible. El trasplante de médula ósea causa la remisión completa en aproximadamente 45 el 80% de los casos. Sin embargo, la supervivencia disminuye al 10-20% cuando el donante y el receptor no coinciden en dos o más loci. Las complicaciones asociadas con el trasplante incluyen el rechazo del injerto, enfermedad del injerto frente al receptor aguda o crónica, infección y daño específico a otros diversos órganos. Los receptores 50 de trasplante de médula ósea tienen también un riesgo aumentado a largo plazo de desarrollar posteriores tumores sólidos.

El documento US-A-5.643.786 está dirigido a la estimulación del sistema inmune del paciente con respecto a los 55 antígenos del cáncer por encima de los valores normales en los pacientes. Se describe la creación de células dendríticas activadas. La activación de células dendríticas las hace útiles para el tratamiento del cáncer tras su incubación con ciertos antígenos. El documento WO-A-9S/20649 describe un procedimiento para activar células mononucleares derivadas del paciente por medio de la exposición *in vitro* de las células a sustancias que generan células inmunorreactivas. Las células activadas *ex vivo* se vuelven a infundir en el paciente para potenciar el sistema inmune para tratar diversas 60 formas de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes o enfermedades de inmunodeficiencia. W. Brugger, y col. Disclose en Blood Volumen N° 10, 1.993, 2579-2584 describen el cultivo de células progenitoras de sangre periférica CD34+ (PBPCs) que son deseables como células progenitoras hematopoyéticas.

### **Resumen de la invención**

65 El autor de la presente invención ha investigado usando células sanguíneas (activadas) cultivadas para tratar pacientes con deficiencias de la sangre, tales como anemia, anemia aplásica y/o púrpura trombocitopénica. Se proporciona una cantidad de células sanguíneas eficaz para tratar deficiencias de la sangre cuando se inyectan en un paciente. La cantidad de células sanguíneas se ha cultivado en presencia de dos citocinas, un ionóforo de Ca y suero de mamífero.

Las citocinas y el ionóforo están presentes en concentraciones eficaces. Las citocinas son la interleucina 2 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. El ionóforo puede comprender A23187.

La presente invención describe un procedimiento para tratar deficiencias de la sangre en un paciente, comprendiendo el tratamiento administrar células sanguíneas cultivadas *ex vivo* al paciente. Puede administrarse al paciente

- 5 una cantidad terapéuticamente eficaz de células sanguíneas. Las células sanguíneas pueden ser autólogas al paciente, alogenéricas al paciente, o de origen inmunológicamente aceptable. Las células sanguíneas se cultivan en presencia de dos citocinas, un ionóforo de Ca y suero de mamífero. Las citocinas y el ionóforo están presentes en cantidades eficaces.

10

La presente invención proporciona un procedimiento para cultivar células mononucleares de sangre periférica, comprendiendo el procedimiento cultivar las células sanguíneas en presencia de dos citocinas, un ionóforo de Ca y suero de mamífero. Las células sanguíneas se cultivan en presencia de cantidades eficaces de citocinas e ionóforo; y en un medio que comprende suero de mamífero; pueden cultivarse durante un período, por ejemplo, de entre aproximadamente 2 y 200 horas o más y pueden cultivarse a una temperatura, por ejemplo, de entre aproximadamente 30 y 15 42 grados C. Las citocinas son la interleucina 2 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. El ionóforo puede incluir A23187.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra vistas de baja potencia de biopsias de médula ósea con tinción de Hematoxilina y Eosina de tres pacientes que responden a la presente terapia. Las vistas marcadas como A, C y E son médulas de pacientes antes del tratamiento. En estas vistas, las médulas dañadas o vacías temprano implican anemia aplásica grave. En las vistas denominadas B, D y F, las médulas son de los mismos pacientes tras el tratamiento. Estas médulas muestran mucho mejor distribución y celularidad.

La Fig. 2 es un gráfico de recuento de plaquetas en plaquetas por milímetro cúbico en función de los días tras el comienzo del tratamiento con células activadas para un paciente pediátrico con deficiencia de plaquetas.

30

**Descripción detallada**

La presente invención describe una terapia de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células de la sangre cultivadas *ex vivo* a pacientes afectados con deficiencias de la sangre, tales como anemia, anemia aplásica y púrpura trombocitopénica. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende incluir una cantidad suficiente de las presentes células de la sangre activadas para provocar un aumento estadísticamente significativo en los recuentos de células sanguíneas cuando se administra a un paciente con deficiencias de la sangre, es decir, una concentración significativamente baja de un componente natural de la sangre, tal como glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y otros factores producidos por la médula ósea y células generadas a partir de la médula ósea. Las células sanguíneas cultivadas pueden ser del paciente o de un donante inmunológicamente aceptable. Un protocolo para activar las células sanguíneas por medio del cultivo *ex vivo* incluye obtener una muestra de sangre (por ejemplo, 10-100 ml) del paciente, o de un donante inmunológicamente aceptable, separar las células sanguíneas de la muestra de sangre, y cultivar las células sanguíneas separadas. "Un donante inmunológicamente aceptable" es una persona que tiene tejidos, incluidas las células de la sangre, que no tienen niveles médicamente inaceptables de reacciones del receptor (por ejemplo, anemia hemolítica, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal). Las células de la sangre pueden separarse de los sueros sanguíneos por medio de protocolos tales como la centrifugación. Las células de la sangre separadas se cultivan a continuación en condiciones estériles en un medio con las citocinas (incluidos los factores estimulantes de células) y el ionóforo. Las células de la sangre separadas pueden cultivarse en el medio como se especificó anteriormente, por ejemplo, durante períodos de entre más de aproximadamente 1 hora, en otras formas de realización entre aproximadamente 10 y 200 horas, entre aproximadamente 20 y 80 horas, o entre aproximadamente 30 y 60 horas y a una temperatura, por ejemplo, de entre aproximadamente 30 y 42 grados C, en otras formas de realización entre aproximadamente 32 y 40 grados C, o entre aproximadamente 37 y 38 grados C o cualquier intervalo incluido en los mismos. Una persona experta en la técnica reconocerá que están contemplados otros intervalos de períodos y temperaturas dentro de estos intervalos explícitos, y están dentro de la presente descripción.

Las deficiencias de la sangre pueden tratarse por medio de los enfoques descritos en este documento. En general, las deficiencias de la sangre incluyen una concentración reducida de los componentes de la sangre que se originan de la médula ósea o de los productos, tales como tipos celulares específicos, de la médula ósea. Las deficiencias de la sangre incluyen, por ejemplo, la anemia, la anemia aplásica y la púrpura trombocitopénica. La anemia puede considerarse ampliamente como una deficiencia de un componente de la sangre o, en algunos contextos, como una deficiencia de glóbulos rojos. La anemia aplásica es una deficiencia de los elementos de la sangre periférica. La púrpura trombocitopénica, tal como la púrpura trombocitopénica idiopática, implica una deficiencia en el número de plaquetas. Como ejemplo específico, el siguiente análisis describe la anemia aplásica en cierto detalle, aunque los procedimientos de tratamiento pueden ser aplicables más ampliamente.

Tras el cultivo, las células sanguíneas activadas pueden lavarse (por ejemplo, dos veces con disolución salina estéril). A continuación se administran al paciente cantidades terapéuticamente eficaces de las células sanguíneas acti-

vadas. Un procedimiento aceptable para administrar las células sanguíneas activadas es por vía intravenosa. Mientras que las células activadas pueden administrarse en una dosis única, también pueden administrarse porciones de las células sanguíneas activadas durante un período de tiempo. Por ejemplo, las dosis de las presentes células sanguíneas activadas pueden administrarse a los pacientes una vez por semana durante un período de cuatro semanas. Sin embargo las dosis de las presentes células sanguíneas activadas pueden administrarse a los pacientes en intervalos de, por ejemplo, media semana, diez días, 14 días, 21 días, otros períodos intermedios u otros períodos eficaces. Por otra parte, los intervalos pueden variar durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, las dosis de células sanguíneas pueden inicialmente administrarse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente y/o en intervalos de dos semanas. Las dosificaciones pueden ser, por ejemplo, desde entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  hasta aproximadamente  $2 \times 10^8$  células por tratamiento, que pueden depender de la edad y la condición del paciente. El tiempo total requerido para el tratamiento (por ejemplo, administrar las presentes células sanguíneas activadas) puede depender de la cantidad de células sanguíneas activadas disponibles y de la respuesta del paciente. La respuesta del paciente puede medirse, por ejemplo, en términos de retorno a los recuentos normales de células de la sangre y/o histología de la médula ósea así como una mejora general en la salud. Obviamente, las muestras de sangre pueden recogerse de los pacientes de manera repetida durante o después del período de tratamiento inicial de manera que pueden obtenerse más células sanguíneas activadas para otros tratamientos. Además, pueden administrarse células sanguíneas activadas de un donante inmunológicamente aceptable inicialmente o pueden administrarse durante la duración total del tratamiento. Como alternativa, pueden administrarse células de la sangre del paciente, activadas por el presente protocolo, después de las células sanguíneas de un donante inmunológicamente aceptable administradas inicialmente.

La definición más actual de anemia aplástica grave es pancitopenia marcada con al menos dos de los siguientes: 1) menos de 500 granulocitos/microlitro, 2) menos de 20.000 plaquetas/microlitro, 3) anemia con recuento corregido de reticulocitos inferior a 1%, más médula ósea marcadamente hipoplásica desprovista de células hematopoyéticas. La anemia aplástica moderada incluye generalmente una médula ósea hipocelular y citopenia en al menos dos líneas celulares fuera del intervalo grave. El inicio es insidioso y la dolencia inicial puede ser la fatiga y debilidad progresivas por la anemia, seguidas en algunos casos por hemorragia. La hemorragia es usualmente de la piel y de los revestimientos mucosos, por la trombocitopenia. La infección es rara a pesar de la neutropenia grave. El examen físico revela palidez y posiblemente contusiones o petequias. Los pacientes con anemia aplástica no exhiben linfadenopatías ni esplenomegalia. La fiebre puede estar o no presente. Los ensayos de sangre periférica muestran pancitopenia. La presencia de células inmaduras de las series roja y blanca son argumentos fuertes en contra de la anemia aplástica.

Los glóbulos rojos pueden ser levemente macrocíticos por el estrés eritropoyético aumentado y usualmente son normocíticos y normocrómicos. El recuento corregido de reticulocitos es muy bajo o cero, indicando una carencia de eritropoyesis. El tiempo de sangrado puede ser prolongado incluso con parámetros de coagulación normales. Los pacientes tienen hierro sérico aumentado y un nivel de transferrina normal, que da lugar a una saturación de transferrina elevada. La depuración plasmática de hierro está disminuida por una reducción en la eritropoyesis. El aspirado de médula ósea puede ser seco. Pero una biopsia puede mostrar una médula aplástica o hipocelular grave con reemplazo graso. Como ha habido casos en los que la biopsia de médula ósea inicial exhibió hipercelularidad, puede ser necesaria más de una biopsia para el diagnóstico preciso. Puede notarse una depresión grave en todas las células progenitoras hematopoyéticas, incluidas las líneas celulares mieloide, eritroide, pluripotencial y en megacariocitos. El diagnóstico se basa generalmente en el hallazgo de la clásica triada anemia, neutropenia y trombocitopenia tanto en muestras de sangre como de médula ósea. Pueden ser necesarios rayos X para descartar lesiones óseas o infiltrados neoplásicos. Las imágenes por resonancia magnética han sido útiles para definir claramente la médula hipoplásica. Como el diagnóstico es por exclusión, usualmente se descartan todas las otras causas de pancitopenia y otros hallazgos de laboratorio antes de poder diagnosticar la anemia aplástica.

El defecto básico en la anemia aplástica es el fallo en la producción de todas las líneas celulares. Los mecanismos posibles de la patogénesis de la anemia aplástica incluyen: 1) células madre hematopoyéticas defectuosas o ausentes, 2) microambiente de la médula ósea anormal, 3) células reguladoras anormales, y 4) supresión de la hematopoyesis por células inmunológicas.

Mientras que la patofisiología de la enfermedad aún no está completamente clara, (Young y col., The pathophysiology of acquired aplastic anemia, N. Engl. J. Med. 1997; 336(19): 1365-1372 y Young y col., The treatment of severe acquired aplastic anemia, Blood 1995; 85(12): 3367-3377) existen evidencias que apoyan la teoría de que la anemia aplástica es una enfermedad mediada inmunológicamente. Se ha usado el transplante de médula ósea y la terapia inmunosupresora combinando globulina antilinfocitos y ciclosporina para el tratamiento (Rosenfeld y col., Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe aplastic anemia, Blood 1995; 85(11): 3058-3065 y Halperin y col., Severe acquired aplastic anemia in children: 11-year experience with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy, Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1989; 11(3): 304-309). Sin embargo, la terapia de inmunosupresión tiene frecuentemente efectos secundarios indeseables y graves. Además, los factores de crecimiento hematopoyéticos tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos (Kojima y col., Treatment of aplastic anemia in children with recombinant human granulocyte colony stimulating factor, Blood 1991; 77(5): 937-941 y Sonoda y col., Multilineage response in aplastic anemia patients following long-term administration of filgrastim (recombinant human granulocyte colony stimulating factor), Stem Cells 1993; 11: 543-554), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Champlin y col., Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, Blood 1989; 73(3): 694-699 y Guinan y col., A phase I/II trial of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor for children with aplastic anemia, Blood 1990; 76(6): 1077-1082), y la Interleucina 3 (Ganser y col., Effect of recombinant human interleukin-3 in pa-

tients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure, Blood 1990; 76(4): 666-676 y Nimer y col., A phase I/II study of interleukin-3 in patients with aplastic anemia and myelodysplasia, Exp. Hematol. 1994; 22: 875-880) sólo han proporcionado efectos limitados y transitorios.

5 Muchos pacientes responden a la terapia inmunosupresora y hay niveles anormales de diversas moléculas inmunes en pacientes con aplasia. Por ejemplo, la interleucina 1, producida por los macrófagos, las células asesinas naturales, los linfocitos B y las células endoteliales, desempeña un papel central tanto en las respuestas inmunes como en la regulación de la hematopoyesis al inducir la liberación de factores estimulantes de colonias multipotenciales y eritroides de células del estroma de la médula ósea, regulando las células progenitoras tempranas y estimulando la recuperación 10 de células madre tras la mielosupresión inducida. La desregulación inmune en la anemia aplástica está constituida por la actividad disminuida de las células asesinas naturales, la cantidad aumentada de células T supresoras activadas y la producción anormal de interleucina 2 e interferón gamma.

15 Las células asesinas naturales son linfocitos granulares grandes que lisan células tumorales o células diana infectadas por virus tras el contacto directo. Las células asesinas naturales también producen interferón gamma, interleucina 2 e inducen la actividad estimulante de colonias. Estas células pueden inhibir la formación de colonias mieloídes y eritroides bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, cuando los factores de crecimiento exógenos están ausentes de un 20 cultivo, las células asesinas naturales producen normalmente citocinas y ayudan a la hematopoyesis. Sin embargo, las condiciones óptimas inducen a las células asesinas naturales a inhibir la hematopoyesis. La actividad de las células asesinas naturales en los pacientes con aplasia retorna a la normalidad tras la recuperación hematopoyética.

25 Los linfocitos activados producen interferón gamma que suprime la hematopoyesis. Aunque los pacientes con aplasia muestran una sobreproducción de interferón gamma, los niveles de interferón gamma disminuyen en respuesta a la inmunosupresión. Los interferones son potentes inhibidores de la formación de colonias hematopoyéticas - tanto a través de la acción directa sobre las células progenitoras como por efecto indirecto por medio de células accesorias del sistema inmune.

30 El factor de necrosis tumoral alfa es otra citocina que está en exceso en la anemia aplástica. Funciona inhibiendo el crecimiento de colonias de los progenitores hematológicos normales. Los valores elevados del factor de necrosis tumoral alfa se correlacionan con recuentos disminuidos de plaquetas, hemoglobina y leucocitos. El factor de necrosis tumoral alfa y el interferón gamma pueden actuar de manera sinérgica para suprimir la hematopoyesis.

35 Los pacientes con anemia aplástica producen interferón gamma y factor de necrosis tumoral en exceso, muestran una relación de células ayudantes:T supresoras invertida, y tienen predominantemente células T supresoras en la médula ósea. Estas células pueden mediar la supresión de la hematopoyesis por medio de la producción de citocinas. La médula ósea también tiene una proporción mayor de células T citotóxicas que la sangre periférica. La importancia clínica de la disfunción inmune está sugerida por una disminución de los linfocitos activados tras la terapia inmunosupresora exitosa.

40 No se conocen bien los mecanismos para la anemia aplástica en general y los mecanismos para la anemia aplástica inducida por benceno en particular. No obstante, ambos tipos de anemia aplástica comparten similitudes considerables con respecto a la patofisiología y las manifestaciones clínicas. Actualmente hay dos hipótesis para explicar el mecanismo de la anemia aplástica, el daño directo y mediada inmunológicamente. Ambas hipótesis están respaldadas por datos de estudios experimentales y clínicos. Se cree que el daño directo a la médula ósea es responsable del fallo temporal y reversible de la médula ósea tras la radioterapia y quimioterapia citotóxica. El fallo de la médula ósea mediado inmunológicamente es más difícil de curar. En el caso de la anemia aplástica inducida por benceno, la enfermedad parece estar asociada con ambos mecanismos. Las evidencias del daño directo a las células de la médula ósea están respaldadas por los estudios que indican que el benceno está implicado en la inhibición de una serie de procesos bioquímicos de las células de la médula ósea. Específicamente, se ha mostrado que el benceno daña los macrófagos del estroma en la 45 médula ósea, llevando de esta manera a una producción deficiente de interleucina 1 (Niculescu y col., Inhibition of the conversion of pre-interleukins-1[alpha] and 1[beta] to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene, Chemico-Biological Interactions; 1995; 98: 211-222 y Kalf y col., p-benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1[alpha] and -1 [beta] to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, and interleukin-1 [beta] converting enzyme, Environmental Health Perspectives; 1996; 104 (supl. 5): 1251-1256). Se considera a la interleucina 1 importante para el crecimiento y la diferenciación de células madre 50 (Bagby, G.C., Production of multi lineage growth factors by hematopoietic stromal cells: an intercellular regulatory network involving mononuclear phagocytes and interleukin-1. Blood Cells 1987; 13:147-159 y Fibbe y col., Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by Interleukin-1 and poly(rI)-Poly(rC), Blood 1988; 72(3): 860-866). Sin embargo, no ha habido informes de respuesta 55 prolongada a los tratamientos de factores de crecimiento hematopoyético, incluida la interleucina 1.

## Medio

60 El medio adecuado utilizado en la activación *ex vivo* proporciona los nutrientes esenciales para las células de la sangre. Este medio comprende generalmente, por ejemplo, sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos, todos en formas que pueden ser utilizadas directamente por las células de la sangre. A modo de ilustración y no como limitación, un medio adecuado es RPMI 1640. Sin embargo, otro medio, tal como el medio AIM-V sin suero, soportará las células de la sangre en cultivo y puede ser también adecuado. Según la invención, el medio está

# ES 2 321 189 T3

suplementado con suero de mamífero, por ejemplo al 10%, suero bovino fetal en niveles de entre aproximadamente 0,1 y 50%, entre aproximadamente 1 y 40%, o entre aproximadamente 5% y 15%, del medio, en peso. Una formulación adecuada de RPMI, denominada como RPMI 1640 modificado y disponible bajo número de catálogo 30-2001 de la American Type Culture Collection, tiene los siguientes componentes:

5

	<u>Sales inorgánicas</u>	<u>(g/litro)</u>
10	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,10000
	MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	0,04884
	KCl	0,40000
15	NaHCO <sub>3</sub>	1,50000
	NaCl	6,00000
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	0,80000

20

	<u>Aminoácidos</u>	<u>(g/litro)</u>
25	L-Arginina (base libre)	0,20000
	L-Asparagina·H <sub>2</sub> O	0,05682
	Ácido L-aspártico	0,02000
30	L-Cistina- 2HCl	0,06520
	Ácido L-glutámico	0,02000
35	L-Glutamina	0,30000
	Glicina	0,01000
	L-Histidina (base libre)	0,01500
40	Hidroxi-L-prolina	0,02000
	L-Isoleucina	0,05000
	L-Leucina	0,05000
45	L-Lisina- HCl	0,04000
	L-Metionina	0,01500
	L-Fenilalanina	0,01500
50	L-Prolina	0,02000
	L-Serina	0,03000
	L-Treonina	0,02000
55	L-Triptofano	0,00500
	L-Tirosina- 2Na- 2H <sub>2</sub> O	0,02883
	L-Valina,	0,02000

60

65

# ES 2 321 189 T3

Vitaminas	(g/litro)
D-Biotina	0,00020
Cloruro de colina	0,03000
Ácido fólico	0,00100
myo-Inositol	0,03500
Nicotinamida	0,00100
Ácido p-aminobenzoico	0,00100
Ácido D-pantoténico (hemicalcio)	0,00025
Piridoxina· HCl	0,00100
Riboflavina	0,00020
Tiamina HCl	0,00100
Vitamina B-12	0,000005

Otros	(g/litro)
D-Glucosa	4,50000
Glutathiona (reducida)	0,00100
HEPES	2,38300
Rojo Fenol, sal sódica	0,00500
Piruvato de sodio	0,11000

## 1. Citocinas

40 Pueden usarse una o más citocinas para activar las células sanguíneas cuando se cultivan en su presencia.

Las citocinas son proteínas pequeñas (usualmente en el intervalo de 5-20 kD) que son liberadas por las células y tienen efectos específicos en la comunicación y en la interacción célula-célula y en el comportamiento de otras células. Se incluyen usualmente como citocinas, las interleucinas, linfocinas y moléculas de señal tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y los interferones. Mientras que pueden usarse las citocinas naturales, también están contempladas las citocinas producidas de manera recombinante, por ejemplo, por medio de sistemas de expresión de ácidos nucleicos establecidos. Como tales, también pueden usarse las formas modificadas y mutadas de citocinas naturales que mantienen la función. Las citocinas ejemplares, que pueden ser adecuadas para algunas formas de realización de la presente invención, incluyen:

### A. Interleucinas

Una diversidad de polipéptidos que se presentan en la naturaleza que afectan las funciones de tipos celulares específicos y que se encuentran en pequeñas cantidades. Son proteínas reguladoras secretadas producidas por los linfocitos, monocitos y otras diversas células y son liberadas por las células en respuesta a estímulos antigenicos y no antigenicos. Las interleucinas, de las cuales, hasta la fecha, hay 16 identificadas, modulan la inflamación y la inmunidad regulando crecimiento, la movilidad y la diferenciación de las células linfoides y de otras células. Las interleucinas pueden estar presentes en concentraciones de entre aproximadamente 10 y 50.000 UI/ml, aproximadamente 100-5.000 UI/ml, o aproximadamente 100-1.000 UI/ml. Como alternativa, puede estar presente una concentración eficaz de interleucinas. Una concentración eficaz de interleucinas es cualquier concentración en la que las células de la sangre se activan por medio del presente protocolo.

- i. Interleucina 1 (IL-1). La IL-1 es una proteína soluble (17 kD: 152 aminoácidos) secretada por los monocitos, macrófagos o las células accesorias implicadas en la activación de los linfocitos T y linfocitos B y potencia su respuesta a los antígenos o a los mitógenos. Los efectos biológicos de la IL-1 incluyen la capacidad de reemplazar los requerimientos de macrófagos para la activación de células T, así como afectar una amplia variedad de otros tipos de células. Se conocen al menos dos genes de IL-1 y se reconocen las

## ES 2 321 189 T3

formas alfa y beta de IL-1. La IL-1 se libera de manera temprana en una respuesta del sistema inmunitario por los monocitos y los macrófagos. Estimula la proliferación de células T y la síntesis de proteínas. Otro efecto de la IL-1 es causar fiebre.

- 5        ii. Interleucina 2 (IL-2). La IL-2 es una sustancia análoga a hormona liberada por los linfocitos T estimulados. La IL-2 provoca la activación y la diferenciación de otros linfocitos T independientemente del antígeno. La IL-2 estimula el crecimiento de ciertas células de la sangre que luchan contra la enfermedad en el sistema inmunitario y es secretada por las células CD4 Th1 para estimular los linfocitos T citotóxicos CD8. La IL-2 también aumenta la proliferación y la maduración de las células CD4 mismas.
- 10      iii. Interleucina 3 (IL-3). La IL-3 es un producto de las células T activadas por mitógenos. La IL-3 es un factor estimulante de colonias para las células madre de la médula ósea y para las células cebadas, la IL-3 se considera uno de los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas.
- 15      iv. Interleucina 4 (IL-4). La IL-4 es un factor de citocina soluble producido por los linfocitos T activados que promueve la producción de anticuerpos provocando la proliferación y la diferenciación de células B. La IL-4 induce la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y de los receptores fc en las células B. La IL-4 también actúa sobre los linfocitos T, las líneas de células cebadas y otras varias células de linaje hematopoyético incluidos los granulocitos, megacariocitos y precursores eritroides, así como los macrófagos.
- 20      v. Interleucina 5 (IL-5). La IL-5 es un factor que promueve la diferenciación y la activación de los eosinófilos en la hematopoyesis. También provoca la diferenciación terminal de las células B activadas en células secretoras de Ig.
- 25      vi. Interleucina 6 (IL-6). La IL-6 estimula el crecimiento y la diferenciación de células B humanas y es también un factor de crecimiento para hibridomas y plasmacitomas. La producen muchas células diferentes incluidas las células T, los monocitos y los fibroblastos. La IL-6 es una citocina de cadena única de 25 kD descrita originalmente como factor de crecimiento de células pre B, que ahora se sabe que tiene efectos sobre una serie de otras células incluidas las células T que también se estimulan para proliferar.
- 30      vii. Interleucina 7 (IL-7). La IL-7 es un factor de crecimiento hematopoyético que promueve el crecimiento de los precursores de células B y es también co-mitogénico con la interleucina 2 para la activación de las células T maduras. La IL-7 se produce por medio de las células del estroma de la médula ósea.
- 35      viii. Interleucina 8 (IL-8). La IL-8 es una citocina que activa los neutrófilos y atrae los neutrófilos y los linfocitos T. La IL-8 es liberada por varios tipos de células incluidos los monocitos, macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, las células endoteliales y los queratinocitos por un estímulo inflamatorio. La IL-8 es un miembro de la superfamilia de la beta-tromboglobulina y está relacionada estructuralmente con el factor plaquetario 4.
- 40      ix. Interleucina 9 (IL-9). La IL-9 es una citocina producida por las células T, particularmente cuando se estimulan por medio de mitógenos. La IL-9 estimula la proliferación de las células precursoras eritroides (BFUE) y se cree que es un regulador de la hematopoyesis. La IL-9 puede actuar sinérgicamente con la eritropoyetina. El receptor de IL-9 pertenece a la superfamilia de receptores hemopoyéticos. Se ha mostrado que la IL-9 potencia el crecimiento de las células cebadas humanas y de las células leucémicas megacarioblásticas así como de los clones de células T ayudantes murinas. La IL-9 es una glicoproteína que deriva de las células T y tiene localización en el cromosoma 5 humano.
- 45      x. Interleucina 10 (IL-10). La IL-10 es un factor producido por las células T ayudantes Th2, algunas células B y monocitos activados por LPS. Es un corregulador del crecimiento de las células cebadas.
- 50      xi. Interleucina 11 (IL-11). La IL-11 es una citocina pleiotrópica, aislada originalmente de la línea celular estrómica de la médula ósea de primates, que tiene la capacidad de modular las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno, potenciar los megacariocitos y regular la adipogénesis de la médula ósea. La IL-11 estimula la maduración de las células B dependiente de las células T, la megacariopoyesis y diversas etapas de la diferenciación mieloide.
- 55      xii. Interleucina 12 (IL-12). La IL-12 es una citocina heterodimérica de 75 kD compuesta de subunidades de 40 kD y 35 kD unidas por enlaces disulfuro que se identificó originalmente por su capacidad para inducir las células efectoras citotóxicas en sinergia con concentraciones menores que las óptimas de interleucina 2. La IL-12 es liberada por los macrófagos en respuesta a la infección y promueve la activación de la inmunidad mediada por células. Específicamente, la IL-12 provoca la maduración de las células CD4 Th1, las respuestas específicas de linfocitos T citotóxicos, y un aumento en la actividad de las células NK. Por consiguiente, la IL-12 es el iniciador de la inmunidad mediada por células. Potencia la actividad lítica de las células NK, induce la producción de interferón, estimula la proliferación de células T activadas y células NK. Las secretan las células linfoblastoides B humanas (NC 37).

## ES 2 321 189 T3

- 5           xiii. Interleucina 13 (IL-13). La IL-13 es una citocina derivada de linfocitos T que produce la proliferación, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, y la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B inmaduros. La IL-13 es producida por las células T activadas, inhibe la producción de IL-6 por los monocitos, y también inhibe la producción de otras citocinas proinflamatorias tales como TNF, IL-1 e IL-8. La IL-13 estimula las células B. El gen para IL-13 está localizado en el cromosoma 5q humano en un grupo de genes que también tiene el gen de IL-4.
- 10           xiv. Interleucina 14 (IL-14). IL-14 es una citocina que induce la proliferación de las células B, inhibe la secreción de inmunoglobulinas, y expande selectivamente determinadas subpoblaciones de células B.
- 15           xv. Interleucina 15 (IL-15). La IL-15 es una citocina que estimula la proliferación de los linfocitos T y comparte actividades biológicas con la IL-2. La IL-15 también puede inducir la proliferación y la diferenciación de linfocitos B.
- 20           xvi. Interleucina 16 (IL-16). La IL-16 es una citocina producida por los linfocitos T activados que estimula la migración de los linfocitos CD4 positivos y de los monocitos.

### B. *Linfocinas*

20           Una linfocina es una sustancia producida por un leucocito que actúa sobre otra célula. Los ejemplos son las interleucinas, el interferón alfa, la linfoxina (factor de necrosis tumoral alfa), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

- 25           i. Interferones (IFN): son una familia de glicoproteínas de células humanas que normalmente tienen una función en la lucha contra infecciones virales al evitar la multiplicación de los virus en las células. Los interferones pueden estar presentes en las mismas concentraciones que las interleucinas. Como alternativa, pueden estar presentes concentraciones eficaces de interferones. Está contemplado que las concentraciones eficaces de interferones incluyen cualquier concentración en la que las células de la sangre se activan por medio del presente protocolo. El IFN alfa lo secretan los leucocitos y el IFN gamma lo secretan los fibroblastos después de la infección viral.
- 30           1. El interferón gamma es un interferón elaborado por los linfocitos T en respuesta a la estimulación de un antígeno específico o a la estimulación mitogénica.
- 35           2. El interferón alfa incluye una serie de diferentes subtipos que son elaborados por los leucocitos en respuesta a la infección viral o a la estimulación con ARN de doble hebra. El IFN-alfa-2A y -2B son productos proteicos producidos por técnicas de ADN recombinante y se utilizan como agentes antineoplásicos. El interferón alfa es uno de los interferones de tipo I (tipo I de interferón) producido por los leucocitos de sangre periférica o las células linfoblastoides cuando se exponen a virus vivos o inactivados, al ARN de doble hebra, o a productos bacterianos. Es el principal interferón producido por los cultivos de linfocitos inducidos por virus y, además de su pronunciada actividad antiviral, provoca la activación de las células asesinas naturales.
- 40           3. El interferón alfa-2a es un interferón de tipo I que está constituido por 165 residuos de aminoácidos con lisina en la posición 23. Esta proteína se produce por tecnología de ADN recombinante y se asemeja al interferón secretado por los leucocitos. Se utiliza extensamente como un antiviral o como agente antineoplásico.
- 45           4. El interferón alfa-2b es el interferón de tipo I que está constituido por 165 residuos de aminoácidos con arginina en la posición 23. Esta proteína se produce por tecnología de ADN recombinante y se asemeja al interferón secretado por los leucocitos. Se utiliza extensamente como un antiviral o como agente antineoplásico.
- 50           5. El interferón beta es un interferón elaborado por los fibroblastos en respuesta a los mismos estímulos que el interferón alfa. El interferón beta es uno de los interferones de tipo I producido por los fibroblastos en respuesta a la estimulación por virus vivos o inactivados o por el ARN de doble hebra. Es una citocina con actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora.
- 55           6. El interferón-b2 (interleucina 6) es una citocina que estimula el crecimiento y la diferenciación de las células B humanas y es también un factor de crecimiento para hibridomas y plasmacitomas. Lo producen muchas células diferentes incluidas las células T, los monocitos y los fibroblastos. El INF-b2 es una citocina de cadena única de 25 kD originalmente descrita como factor de crecimiento de células pre B, que ahora se sabe que tiene efectos en una serie de otras células que incluyen las células T, que también se estimulan para proliferar. El INF-b2 es un inductor de las proteínas de fase aguda y un factor estimulante de colonias que actúa en la médula ósea del ratón.
- 60           7. El interferón gamma es elaborado por los linfocitos T en respuesta a la estimulación de un antígeno específico o a la estimulación mitogénica.

- 5 ii. El factor de necrosis tumoral (TNF) es un factor inhibidor de tumores presente en la sangre de los animales expuestos a lipopolisacáridos bacterianos. El TNF mata de manera preferencial las células tumorales *in vivo* e *in vitro*, causa la necrosis de determinados tumores trasplantados en ratones e inhibe las metástasis experimentales. El TNF alfa humano es una proteína de 157 aminoácidos y tiene una gran variedad de acciones proinflamatorias. El TNF puede estar presente en las mismas concentraciones que las interleucinas. Como alternativa, el TNF puede estar presente en una concentración eficaz. Una concentración eficaz de TNF es una concentración en la que las células de la sangre se activan por medio del presente protocolo.

10 C. *Factores de estimulación de células*

15 Activar las células de la sangre en presencia de uno o más factores de estimulación de células puede ser eficaz para aliviar la anemia aplástica en el contexto de la presente invención. Se contempla que los factores de estimulación de células incluyen sustancias tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y el factor estimulante de colonias de macrófagos. Los factores de estimulación de células pueden estar presentes en concentraciones de entre aproximadamente 10 y 50.000 UI/ml, entre aproximadamente 10 y 10.000 UI/ml, o entre aproximadamente 10 y 1000 UI/ml. Como alternativa, puede estar presente una concentración eficaz de factores de estimulación de células. Una concentración eficaz de factores de estimulación de células es cualquier concentración en la que las células de la sangre se activan por medio del presente protocolo.

- 20 1. Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF): El G-CSF son glicoproteínas sintetizadas por una diversidad de células y están involucradas en el crecimiento y la diferenciación de células madre hematopoyéticas. Además, estos factores estimulan la actividad funcional de célula final de las células madre.
- 25 2. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF): El GM-CSF es una glicoproteína ácida de 23 kD con enlaces disulfuro internos. El GM-CSF se produce en respuesta a una serie de mediadores inflamatorios por las células mesenquimatosas presentes en el entorno hemopoyético y en sitios periféricos de inflamación. El GM-CSF estimula la producción de granulocitos neutrófilos, macrófagos y de colonias mixtas de granulocitos y macrófagos de las células de la médula ósea y puede estimular la formación de colonias de eosinófilos a partir de células progenitoras fetales del hígado.
- 30 3. Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF): El M-CSF es una citocina sintetizada por las células mesenquimatosas que estimula la diferenciación de las células madre pluripotenciales de la médula ósea hacia la producción de monocitos (fagocitos mononucleares). El compuesto estimula la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas de la serie monocito-macrófago. Es un dímero de glicoproteínas unidas por enlaces disulfuro con un pm de 70 kD y se une a una única clase de receptor de alta afinidad que es idéntico al producto del proto-oncogen c-fins.

35 2. *Ionóforos*

40 Los ionóforos son reactivos específicos de calcio o de otro catión (tales como polipeptídos) que pueden atravesar una bicapa lipídica y un soluble lipídico. Hay dos clases de ionóforos: vehículos y formadores de canales. Los vehículos, como la valinomicina, forman estructuras análogas a jaula alrededor de iones específicos, difundiendo libremente a través de las regiones hidrófobas de la bicapa. Los formadores de canales, como la gramicidina, forman poros acuosos continuos a través de la bicapa, que permiten la difusión de los iones a través de la misma. Además de los anteriores, los ionóforos adecuados para el presente protocolo pueden incluir A23187 (calcimicina), ionomicina, geldanamicina, monensina (sal de Na), nistatina, sulfato de polimixina-B y rapamicina. Se cree que los vehículos, tales como A23187, acumulan cationes de calcio en respuesta a gradientes de pH. A23187 posee un grupo ácido carboxílico disociante y cataliza un intercambio eléctricamente neutro de protones por otros cationes a través de la membrana (Hyono y col., BBA 389, 34-46 (1985); Kolber and Haynes, Biophysics Journal, 36, 369-391 (1981); Hunt and Jones, Biosci- Rep., 2, 921-928 (1982)). Dos moléculas de A23187 están presentes como aniones carboxilato, y por consiguiente están disponibles para llevar protones, o equivalentes, nuevamente a través de la membrana tras liberar el catión divalente transportado. Si están presentes, los ionóforos pueden estar presentes en concentraciones de entre aproximadamente 1 y 10.000 ng/ml, entre aproximadamente 1 y 1000 ng/ml, o entre aproximadamente 10 y 500 ng/ml. Como alternativa, pueden estar presentes ionóforos en una concentración eficaz. Una concentración eficaz de ionóforos es cualquier concentración en la que las células de la sangre se activan, pero no sobreactivan, por medio del presente protocolo. Las concentraciones excesivas de agentes activadores pueden no ser eficaces para los enfoques de tratamiento descritos en este documento.

55 60 Uso, empaquetado y distribución

65 La administración de células activadas puede proporcionar una mejora estadísticamente significativa en los parámetros clínicos de un paciente. Por ejemplo, la administración de células activadas como se describe en este documento pueden dar como resultado un incremento estadísticamente significativo en los recuentos de glóbulos blancos, en los recuentos de glóbulos rojos, en los niveles de hemoglobina y en los recuentos de plaquetas. En general, la continuación del procedimiento del tratamiento como se describe en este documento puede dar como resultado un retorno a los niveles normales en sangre. En algunas formas de realización, después de cuatro tratamientos, el paciente puede tener un aumento en cada uno de los recuentos de glóbulos blancos, recuentos de glóbulos rojos y hemoglobina de al menos aproximadamente el 20%, en otras formas de realización al menos aproximadamente del 35% y en otras

5 formas de realización al menos aproximadamente del 50%. De manera similar, en algunas formas de realización, los recuentos de plaquetas pueden aumentar al menos aproximadamente el 25%, en otras formas de realización al menos aproximadamente el 50%, y en otras formas de realización al menos aproximadamente el 100%. Una persona experta en la técnica reconocerá que están contemplados otros intervalos de mejora de los parámetros de la sangre dentro de los intervalos explícitos presentados y están dentro de la presente descripción.

10 Los compuestos de activación, tales como una o más citocinas y/o uno o más ionóforos, pueden mezclarse con un medio de cultivo celular adecuado o una porción del mismo para la distribución. En formas de realización alternativas, pueden empaquetarse uno o más compuestos de activación junto con un medio de cultivo celular o porciones del mismo para el transporte. De manera similar, puede empaquetarse una combinación deseada de compuestos de activación, tal como una o más citocinas y uno o más ionóforos, juntos para el transporte, mezclados o dentro de compartimientos separados. En cualquiera de estas formas de realización, el medio y/o los compuestos de activación pueden combinarse con cualquiera de los componentes del medio restante y/o compuestos de activación para formar el medio deseado para cultivar las células bajo condiciones para activar las células. También, en cualquiera de estas formas de realización, 15 las composiciones que están empaquetadas juntas pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para completar el medio de cultivo celular con las propiedades de activación y/o las instrucciones para realizar el cultivo celular.

20 El cultivo celular puede realizarse en las instalaciones en las que se está tratando al paciente o el cultivo celular para activar las células puede realizarse en una localización remota. En cualquier caso, las células pueden administrarse después de un período corto de tiempo tras la recogida del cultivo celular para asegurar que las células permanecen viables. Como alternativa, las células pueden almacenarse bajo condiciones que mantienen las células en estado viable. Por ejemplo, las células pueden almacenarse a temperaturas del nitrógeno líquido con un crioprotector. Las células pueden prepararse, por ejemplo usando procedimientos conocidos, en el momento adecuados para la administración al paciente. Por ejemplo, pueden suspenderse las células en una disolución salina tamponada para la administración al 25 paciente. Para la administración de las células pueden usarse, por ejemplo, otros vehículos conocidos.

## Ejemplos

30 Ejemplo 1

### *Tratamiento de la anemia aplástica*

#### *I. Pacientes*

35 Se sometieron ocho pacientes con historias verificadas de desde uno hasta seis años de exposición ocupacional al benceno al presente régimen después de obtener sus consentimientos. La composición de los pacientes fue de un varón y siete mujeres y las edades de los pacientes varió desde 24 hasta 41 años. Todos los pacientes experimentaban síntomas de debilidad, vértigos, desmayos y ritmos cardíacos acelerados. Entre estos pacientes, cuatro fueron hospitalizados por síntomas agudos con hemorragias. Los pacientes hospitalizados requirieron transfusiones de sangre o de 40 plaquetas. Los otros cuatro pacientes experimentaron síntomas crónicos y se trajeron con las terapias convencionales durante cuatro, seis y 15 meses, respectivamente. Se obtuvieron muestras de biopsias y aspiración de médula ósea de todos los pacientes para confirmar la hematopoyesis. En la sangre y la médula ósea de todos los pacientes estaban presentes niveles tóxicos de benceno.

45 *II. Purificación de células mononucleares de sangre periférica y cultivo celular*

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de las muestras de sangre del paciente (40-50 ml) por centrifugación con Ficoll-Hypaque. Las PBMCs separadas se colocaron a continuación en un volumen adecuado (basado en la concentración celular) de RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10% bajo condiciones estériles y se cultivaron a  $2 \times 10^6$  células/ml durante 48 horas en presencia de interleucina 2 (IL-2) en una concentración de 500 UI/ml (Chiron, Emeryville, California), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en una concentración de 200 UI/ml (Immunex, Seattle, Washington), y con ionóforos de calcio A23187 en una concentración de 100 ng/ml (Sigma, St. Louis, MO). Al final del período de cultivo, se rasparon las células adherentes de las superficies de plástico de los recipientes de cultivo y se recogieron junto con las células no adherentes. Para recoger las 55 células, se centrifugaron las células para formar un sedimento celular. Se obtuvieron diferentes cantidades de células para los diferentes pacientes. Las células recogidas se lavaron dos veces en disolución salina y se administraron a los pacientes. Tras el lavado, se resuspendieron las células en 5 a 10 ml de disolución salina, con el volumen determinado por el número de células. Estas suspensiones se diluyeron además con 50 ml de disolución salina antes de administrar las células a los pacientes.

60 *Protocolo del tratamiento*

Se utilizaron PBMCs alogeneicas activadas para un único paciente (HC) en los primeros tres tratamientos porque el paciente había experimentado recuentos sanguíneos bajos, hemorragia grave e infección. Para los otros pacientes, se administraron las PBMCs activadas por vía intravenosa con 50 ml de disolución salina a los pacientes. El tratamiento se repitió cada semana durante al menos cuatro semanas. El número de células administradas a un paciente particular dependió del número de células obtenidas del paciente.

### III. Resultados

#### *Parámetros hematológicos*

5 Se controlaron los parámetros hematológicos, recuentos de glóbulos blancos, recuentos de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina y recuentos de plaquetas, antes y después del tratamiento para cada paciente y se muestran en la Tabla 1. Los datos de estos pacientes indicaron que la terapia fue eficaz para aumentar los recuentos de células de sangre periférica. Seis pacientes experimentaron mejora de más de una de las subseries presentadas y dos pacientes tuvieron mejores recuentos de plaquetas. Los recuentos de células de la sangre comenzaron a mejorar en la mayoría de los pacientes después de dos tratamientos y continuaron mejorando a través del tiempo durante el que se administraron las presentes células activadas. Siete de los ocho pacientes mejoraron hasta el punto en que algunos de sus parámetros hematológicos alcanzaron los niveles normales o niveles próximos a la normalidad tras completar cuatro tratamientos. Aunque los recuentos de células de la sangre de los pacientes mejoraron a partir de la terapia en general, no se alcanzaron mejoras de manera uniforme. Algunos pacientes experimentaron mejoras limitadas en los recuentos de 10 glóbulos rojos, pero mejoras espectaculares en los recuentos de plaquetas. Se observó que los recuentos de plaquetas de todos los pacientes aumentaron significativamente.

15 El paciente HC experimentó síntomas agudos más graves que los otros pacientes. Además, el paciente HC tuvo también un problema de hemorragia. Por los bajos rendimientos de células de sangre periférica del paciente HC, se usaron PBMCs alogeneicas para estimular la hematopoyesis del paciente HC. Después de tres tratamientos usando células alogeneicas, los recuentos sanguíneos del paciente HC comenzaron a mejorar. Después de los tres tratamientos de células alogeneicas, se usaron PBMCs autólogas para continuar la terapia. Aunque los parámetros hematológicos del paciente HC no se corrigieron hasta los niveles normales tras seis tratamientos, el paciente HC siguió mejorando.

20 25 La incomodidad por la administración de la presente inmunoterapia fue leve a moderada. Cinco pacientes no experimentaron incomodidad apreciable. Tres pacientes experimentaron escalofríos, fiebres de entre 37 y 39 grados C, dolores de cabeza, náuseas, vómitos y pérdida del apetito después de la infusión de las células. Sin embargo, estos síntomas fueron transitorios, durante típicamente de uno a dos días. Se administró aspirina cuando los pacientes experimentaron incomodidad.

30 *Hematopoyesis de la médula ósea*

35 Se obtuvieron muestras de biopsias y aspiraciones de médula ósea de todos los pacientes antes de comenzar la terapia y dos semanas después del tratamiento final. Según se muestra en la Figura 1, la histología de las muestras de médula ósea de tres pacientes con las muestras más graves indicaron daño grave antes de comenzar la terapia. Después de administrar la terapia, se encontraron notables mejoras en la histología de la médula ósea. Con respecto al paciente HC, sin embargo, la mejora observada en la médula ósea del paciente HC no se asoció con los mejores recuentos de sangre periférica.

40 *Transfusión de sangre*

45 Antes de comenzar el tratamiento, cuatro de los ocho pacientes experimentaron síntomas graves, asociados con hemorragia. Estos cuatro pacientes requirieron transfusiones periódicas de sangre entera o de plaquetas antes y durante la terapia. Después de cuatro tratamientos, sin embargo, ninguno de los pacientes experimentó hemorragia y no continuaron las transfusiones de sangre entera y plaquetas.

#### *Duración*

50 Los efectos ventajosos de la presente terapia basada en células no parecen ser transitorios. Todos los pacientes siguieron teniendo parámetros hematológicos mejores o estables después de abandonar la terapia. Algunas pacientes mujeres experimentaron recuentos sanguíneos inestables durante los períodos menstruales, pero ningún paciente experimentó una recaída. El paciente LC, quien respondió a la terapia, experimentó síntomas estables durante más de dos meses desde el tratamiento final (Figura 2).

55 *Discusión*

Los resultados de este estudio sugieren que la administración de PBMCs activadas a pacientes con anemia aplástica es muy eficaz.

60 65 Algunos pacientes tenían médula ósea próxima a la normalidad histológicamente, pero tenían parámetros hematológicos periféricos que no estaban próximos a la normalidad. A tal fin, pareció presentarse un intervalo de tiempo entre la recuperación histológica de la médula ósea y la recuperación de los recuentos de células de sangre periférica. Los pacientes que experimentaron este intervalo se controlaron de cerca y los parámetros hematológicos de los pacientes mostraron mejora continuada. Estos pacientes tomaron a veces algunas semanas o meses para alcanzar recuentos de células de sangre periférica normales.

Analizando los datos generados por el estudio, se observó que, entre los diferentes compartimientos de la sangre, el aumento en las plaquetas fue más evidente, significativo y rápido en los pacientes que se beneficiaron de terapia.

El aumento inicial en los recuentos de plaquetas se debió posiblemente al hecho que las plaquetas tienen un intervalo de generación y diferenciación más rápido. Otros tipos de células de la sangre tales como los neutrófilos, granulocitos y reticulocitos también mejoraron en conformidad con los cuatro parámetros presentados (datos no mostrados). Los recuentos de plaquetas son posiblemente más susceptibles a la toxicidad del benceno que las otras células de la sangre, pero son los que presentan mayor respuesta a la presente terapia por su intervalo de generación más rápido.

La anemia aplástica adquirida es una enfermedad difícil de curar. Sin embargo, la presente terapia de inmunosupresión fue muy eficaz para tratar esta enfermedad, para la que el transplante de médula ósea es la única cura conocida hasta ahora. Sin embargo, a pesar del éxito de los transplantes de médula ósea, esta terapia tiene complicaciones serias, 10 por ejemplo, tumores, (Socie y col., Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia, N. Engl. J. Med. 1993; 329(16): 1152-1157) y la enfermedad del injerto frente al receptor (Ferrara y col., Graft-versus-host disease, N. Engl. J. Med. 1991(324); 324: 667-674). Por otra parte, muchos pacientes no pueden obtener los transplantes de médula ósea por los gastos del procedimiento y/o por la falta de donantes compatibles. A tal fin, es necesaria una terapia simple y eficaz con menos efectos secundarios para tratar la anemia aplástica. Los resultados de este estudio 15 indican que la anemia aplástica puede tratarse con eficacia con mínimos efectos secundarios. Se cree que la presente inmunoterapia basada en células es también aplicable a otros tipos de anemia y trastornos de la médula ósea. Estos trastornos incluyen los experimentados por pacientes infectados por VIH (virus de inmunodeficiencia humana) después de la quimioterapia de cóctel y los experimentados por pacientes con cáncer con fallo de la médula ósea después 20 de la quimioterapia y la radioterapia, la anemia aplástica heredada y la púrpura trombocitopénica idiopática.

Sin querer estar ligado a ninguna base teórica específica para la operación de esta invención, actualmente se cree 25 que varios fenómenos pueden ser responsables de las respuestas favorables de los pacientes a la presente inmunoterapia. Una primera teoría es que las células activadas secretan múltiples factores eficaces (quizás parcialmente desconocidos) simultáneamente. Estos múltiples factores, cuando trabajan conjuntamente, pueden tener un efecto combinado 30 sinérgico. Un segundo factor hipotético para la eficacia de la presente terapia es que algunos factores claves para la hematopoyesis actualmente desconocidos son producidos por las células inmunitarias activadas. Estos factores desconocidos pueden ser responsables, al menos en parte, de la eficacia de la presente terapia. Un tercer factor que puede 35 estar implicado es que las células inmunitarias son capaces de viajar a la médula ósea y de administrar citocinas a las células madre hematopoyéticas y a otras células precursoras en el intervalo cercano. Por otra parte, las presentes células inmunitarias activadas pueden ser capaces de permanecer en estrecha proximidad con la médula ósea durante períodos suficientes para producir la mejora del microambiente en la médula ósea. Un cuarto factor que puede ser 40 responsable de la eficacia de la presente terapia es que el contacto de las células inmunitarias y las células hematopoyéticas puede ser esencial para el crecimiento y la diferenciación de la célula hematopoyética. Un quinto factor podría ser que las células inmunitarias activadas, incluso en pequeñas cantidades, pueden contribuir a prevenir la influencia adversa del sistema inmunitario para la hematopoyesis. Las cantidades de PCMBs de 10-100 ml de la sangre son relativamente pequeñas. Sin embargo, estas pequeñas cantidades ejercieron grandes efectos en la 45 histología de la médula ósea y en la hematopoyesis.

Los resultados de administrar células sanguíneas activadas por el presente protocolo son inesperados en vista de 50 los resultados de estudios previos. A excepción de un estudio, Young y col. (nota 2) encontraron que los factores de crecimiento administrados (factor estimulante de colonias de granulocitos y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) afectan los números de neutrófilos solamente. El único estudio mostró marcados incrementos de los recuentos de neutrófilos y de plaquetas cuando se administró el factor estimulante de colonias de granulocitos. La interleucina-3, administrada sola o en combinación con factor estimulante de macrófagos y granulocitos tuvo incluso menor efecto en la mielopoyesis que los factores de crecimiento administrados solos. De manera similar (Liu y col., Cellular interactions in hemopoiesis, Blood Cells 1987; 13: 101-110 y Ettinghausen y col., Hematologic effects if immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients, Blood 1987; 69(6): 1654-1660), encontraron que la administración de células mononucleares de sangre periférica activadas 55 e interleucina 2 a pacientes "acentuó" la anemia y eosinofilia en pacientes que recibieron esta terapia.

También se contempla que la presente invención incluya los ítem de fabricación, que incluyen los recipientes envasados por separado de una o más citocinas e ionóforos como se describió con más detalle anteriormente. El contenido del recipiente puede utilizarse para cultivar, y de ese modo activar, las células de la sangre para uso en el presente protocolo terapéutico. Las instrucciones, tales como sobre un marcador, pueden estar presentes en el ítem de fabricación. También puede incluirse un medio adecuado para cultivar las células de la sangre.

## Ejemplo 2

### *Tratamiento de la deficiencia de plaquetas*

Este ejemplo describió el tratamiento de una paciente de sexo femenino de 1 año y cinco meses de edad con púrpura trombocitopénica idiopática. El diagnóstico de la paciente se realizó aproximadamente a los 9 meses.

La paciente se trató en primer lugar con terapia convencional de corticosteroides e infusiones intravenosas de 65 inmunoglobulina. Aunque la paciente respondió al tratamiento convencional, la paciente se volvió completamente dependiente de la terapia de corticosteroides. Para mantener los niveles de plaquetas suficientes, la paciente tenía que recibir dosis cada vez mayores de corticosteroides.

## ES 2 321 189 T3

Posteriormente, la paciente se trató con una terapia basada en células activadas como se describe en este documento. El tratamiento fue igual al que se describió en el Ejemplo 1 excepto en que sólo se recogieron 20 ml de sangre de la paciente cada vez, en lugar de 40-50 ml. La paciente se trató una vez por semana durante 9 semanas. Se administraron las células activadas *ex vivo* en el día 1, día 8, día 15, día 22, día 29, día 35, día 42, día 49 y día 56. Al mismo tiempo que se inició la inmunoterapia con células activadas, se abandonó completamente la terapia con corticosteroides y cualquier otro aspecto de la terapia convencional. Los niveles plaquetarios de la paciente mejoraron gradualmente durante el tratamiento con las células activadas como se muestra en la Figura 2. La paciente tuvo una infección pulmonar en el día 49 que tuvo correlación con una disminución significativa en el número de plaquetas. Una vez que la paciente se recuperó de la infección, el número de plaquetas de la paciente volvió a los niveles normales.

10

El ámbito de la invención no se limita a las formas de realización ilustradas y descritas. Por el contrario, el alcance de la invención debe ser determinado por las reivindicaciones.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Tabla 1. Perfiles hematológicos de los pacientes antes y después de la inmunoterapia basada en células

Pacientes	Edad/sexo	Nº de enferme-	Tipo de enferme-	WBC (x10 <sup>3</sup> /ml)	RBC (x10 <sup>6</sup> /ml)	HGB (g/dl)	PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (x10 <sup>3</sup> /ml)	RBC (x10 <sup>6</sup> /ml)	HGB (g/dl)	PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
HC	32/F	6	Aguda	2,7±0,2	1,2±0,1	4,0±0,3	28±3	3,8±0,25	2,0±0,0	7,0±0,3	43±3
YM	29/F	4	Crónica	3,5±0,3	3,8±0,5	11,1±0,4	99±11	6,7±0,3	3,9±0,4	12,7±0,5	182±17
TB	33/F	4	Aguda	3,2±0,2	2,3±0,3	8,4±0,4	47±5	4,7±0,3	3,2±0,3	11,5±0,7	107±11
LC	25/M	4	Aguda	1,4±0,2	1,6±0,3	5,7±0,3	16±7	5,7±0,2	4,8±0,3	13,5±0,7	135±14
YX	25/F	4	Crónica	2,5±0,3	2,7±0,2	8,2±0,4	22±3	3,5±0,3	2,8±0,2	9,8±0,5	100±10
JX	29/F	5	Aguda	2,7±0,7	3,0±0,2	8,1±3,4	44±18	4,5±0,7	3,6±0,1	12,0±0,4	126±8
ZL	41/F	4	Crónica	3,1±0,6	4,0±0,6	12,6±1,9	154±35	3,7±0,1	4,3±0,02	13,2±1,3	187±21
SC	29/F	4	Crónica	2,4±0,3	2,6±0,1	10,0±3,5	54±4	2,8±0,2	2,9±0,2	11,0±0,3	71±8

Los parámetros hematológicos se midieron y analizaron durante cinco días consecutivos antes y después de la terapia. Los datos se expresan como medias ± desviación estándar. WBC indica glóbulos blancos; RBC indica glóbulos rojos; HGB indica hemoglobina; PLT indica plaquetas.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un procedimiento para cultivar células mononucleares de sangre periférica en cultivo *ex vivo* para obtener células mononucleares de sangre periférica activadas con capacidad para su uso en el tratamiento de pacientes con deficiencias de la sangre, que comprende

- cultivar las células sanguíneas *ex vivo* en presencia de un ionóforo de calcio, y
- 10 - un suero de mamífero, e
- interleucina 2, y
- factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos.

15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las deficiencias de la sangre se seleccionan del grupo constituido por anemia, anemia aplástica y/o púrpura trombocitopénica.

20 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células mononucleares de sangre periférica son autólogas a un paciente.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células mononucleares de sangre periférica se separan al menos parcialmente del suero antes de ser cultivadas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

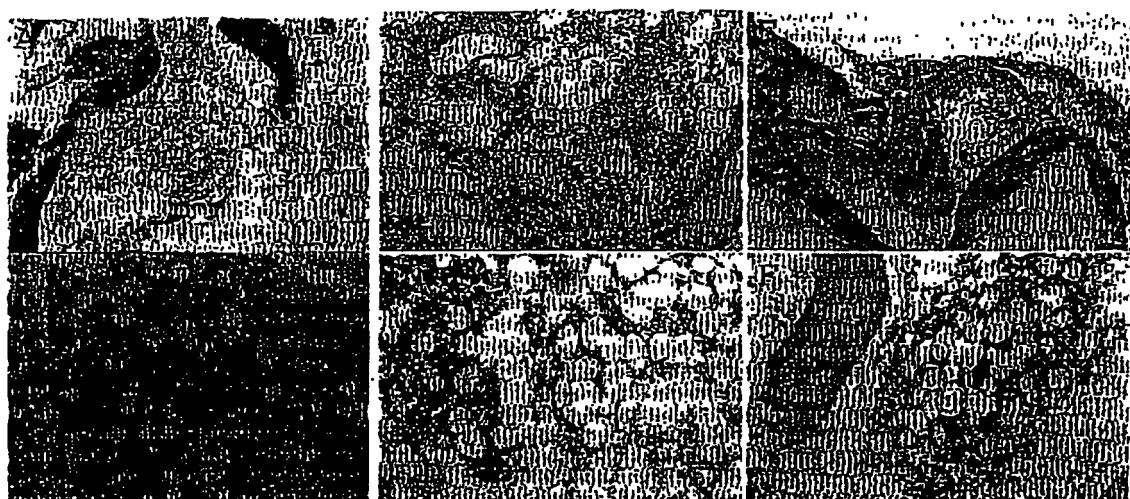


Fig. 1

ES 2 321 189 T3

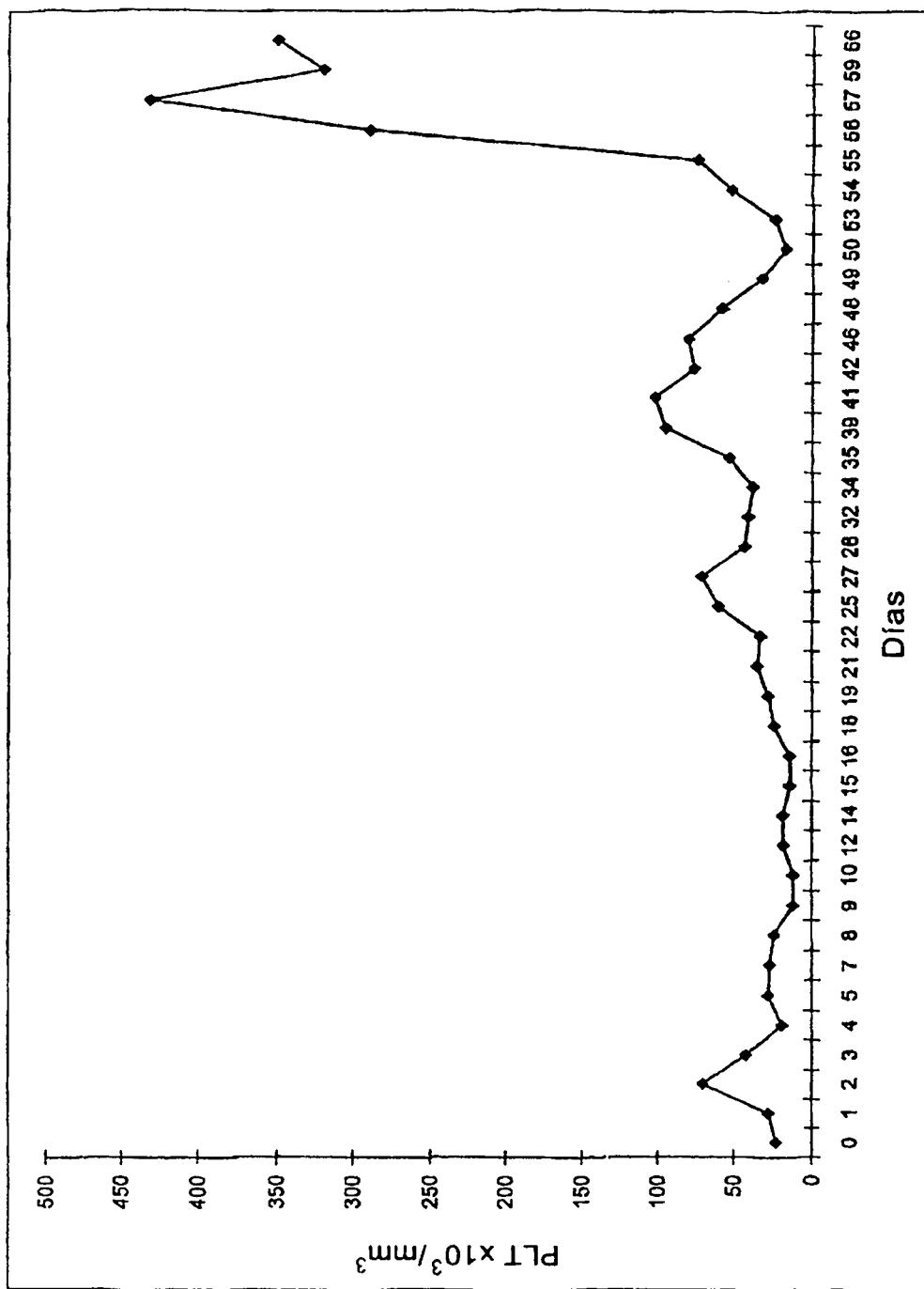


Fig. 2