(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 392 842**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0784 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09169782 .1**

(96) Fecha de presentación: **07.11.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2135942**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

(54) Título: **Procedimiento de supresión de la respuesta del sistema inmunitario a tejido o a células trasplantados**

(30) Prioridad:

08.11.2002 US 290802

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

(73) Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)
SCHOOL OF MEDICINE, 333 CEDAR STREET
NEW HAVEN, CONNECTICUT 06510, US

(72) Inventor/es:

EDELSON, RICHARD LESLIE;
BERGER, CAROLE y
GIRARDI, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Procedimiento de supresión de la respuesta del sistema inmunitario a tejido o a células trasplantados

Campo de la invención

La presente solicitud desvela procedimientos para reducir los efectos de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en individuos que reciben trasplantes de células madre o de médula ósea, el presente documento también desvela procedimientos para suprimir la respuesta inmunitaria en individuos que reciben órganos o tejido trasplantados para reducir la probabilidad de rechazo de los órganos o tejido trasplantados por el receptor del trasplante.

Antecedentes de la invención

El trasplante de órganos, tejidos o células de una persona genéticamente distinta (donante) a otra (receptor) está obstaculizado por el rechazo inmunológico del receptor de los órganos o células donados. Se entiende que este fenómeno de rechazo implica mecanismos tanto celulares como humorales, mediados respectivamente por linfocitos T y anticuerpos. El sistema inmunitario del receptor dirige la diferenciación de los antígenos de histocompatibilidad sobre las células trasplantadas. Salvo en casos poco frecuentes, los antígenos de histocompatibilidad del donante no coincidirán exactamente con los antígenos de histocompatibilidad del receptor, y el sistema inmunitario del receptor ataca los órganos o células incompatibles del donante.

Con respecto al rechazo mediado inmunológicamente, los antígenos de histocompatibilidad más potentes son los complejos de histocompatibilidad (MHC) conocidos como antígenos leucocitarios humanos, HLA-A, HLA-B y HLA-C. Aunque originalmente se definieron por su presencia sobre las membranas celulares de los leucocitos humanos, durante mucho tiempo se ha reconocido que están presentes prácticamente en todas las células con núcleo del cuerpo humano. Dado que cada persona recibe de cada padre genes que codifican un conjunto de estos antígenos, las células humanas expresan típicamente seis antígenos HLA principales. Además de los antígenos de histocompatibilidad principales existen varios antígenos de histocompatibilidad secundarios.

Cuando se trasplantan tejido o células, es deseable que coincidan, hasta el máximo grado posible, los antígenos de histocompatibilidad del donante y del receptor. La mejor coincidencia inmunológica entre el donante y el receptor es entre gemelos idénticos, puesto que comparten los mismos seis antígenos HLA principales. Además, los gemelos idénticos también comparten los mismos antígenos de histocompatibilidad secundarios y por lo tanto los órganos o las células trasplantados de un gemelo idéntico al otro son tolerados inmunológicamente. En la situación más lejana común, en la que el donante y el receptor no son genéticamente idénticos, se produce regularmente cierto nivel de rechazo inmunológico de tejido trasplantado. Para minimizar este rechazo y permitir la supervivencia del tejido injertado, se hacen esfuerzos de manera rutinaria para encontrar la mejor coincidencia entre donante y receptor. Si no se dispone de un gemelo idéntico, la siguiente mejor elección es típicamente un hermano no idéntico del receptor que comparta los mismos seis antígenos HLA principales, una situación que se produce sobre el promedio de uno a cuatro hermanos. Tal coincidencia de seis HLA entre hermanos es preferible a una coincidencia seis de seis entre individuos no relacionados, debido a que los hermanos coincidentes también compartirán más probablemente al menos algunos antígenos de histocompatibilidad secundarios heredados de sus padres comunes. Incluso, dado que no son hermanos idénticos, existe una alta probabilidad de diferencia en los antígenos de histocompatibilidad secundarios, y el donante y receptor serán casi seguramente lo suficientemente distintos en términos de antígenos celulares de manera que después del trasplante de tejido de un hermano a otro se producirá algún nivel de rechazo.

Las reacciones adversas después del trasplante de un órgano o tejido de un individuo genéticamente distinto a otro pueden ser profundamente peligrosas. La reacción adversa principal es el rechazo inmunológico del órgano o tejido trasplantado. Si el órgano es elemental para la vida, tal como un corazón, hígado o pulmón, la destrucción de ese órgano puede conducir directamente a la muerte del paciente. En otras circunstancias, tales como el rechazo de células de los islotes pancreáticos, que producen insulina, o de riñones, la calidad de vida del receptor puede destruirse por el rechazo de tejido. Para impedir o limitar el rechazo, típicamente los pacientes reciben una combinación de fármacos inmunosupresores que introducen sus propios efectos secundarios principales. Habitualmente estos fármacos son inmunosupresores de manera global, incrementando así en gran medida la susceptibilidad del receptor frente a graves infecciones, a menudo ocasionadas por organismos contra los que un sistema inmunitario no comprometido se defendería fácilmente. Cada uno de los fármacos inmunosupresores individuales tiene su propio conjunto distinto de efectos adversos, especialmente cuando se usan en las dosis necesarias para inhibir el rechazo de órganos trasplantados. Por ejemplo, altas dosis de prednisona provocan diabetes mellitus e hipertensión, ocasionando al mismo tiempo la desmineralización de los huesos soporte. Otro fármaco inmunosupresor comúnmente usado, la ciclosporina A, tiene efectos tóxicos importantes sobre el riñón. Ge manera global, los tratamientos con inmunosupresores también aumentan la susceptibilidad de los receptores de trasplante frente a infecciones oportunistas contra las que los individuos normales tienen fuertes defensas.

Estos efectos adversos han estimulado investigaciones para las terapias que puedan suprimir más selectivamente el rechazo del tejido trasplantado, dejando el resto del sistema inmunitario intacto y no dañando otros órganos importantes. Una estrategia especialmente prometedora, para administrar la inmunoterapia, ha sido el uso de un

dispositivo de Fotoféresis convencional, en general denominada en el presente documento “Transinmunización” para evitar o invertir el rechazo de órganos trasplantados. Dependiendo de las circunstancias, el impacto terapéutico de la Transinmunización puede potenciarse mediante la etapa de Fotoféresis convencional con una fase de incubación durante una noche, antes de devolver al paciente las células tratadas. La Transinmunización puede conseguirse usando un aparato de Fotoféresis, si bien la Transinmunización también puede conseguirse usando otra metodología, sin el uso de un aparato de Fotoféresis.

Barr y col., Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation, New England Journal of Medicine, Vol. 339, No. 4, 1744-51, del 10 de diciembre de 1998, publicaron un ensayo controlado que compara la Fotoféresis convencional más inmunosupresión convencional con inmunosupresión convencional sola en la prevención de rechazo de corazones trasplantados. Este estudio reveló que la adición de la Fotoféresis al régimen inmunosupresor convencional redujo de manera completamente significativa y segura el número de episodios de rechazo, disminuyendo así notablemente la necesidad de reforzar peligrosamente los niveles de fármacos inmunosupresores convencionales tóxicos. De manera similar, en Greinix y col., Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and cronic graft-versus-host disease, Blood, Vol. 92, No 9, 3098-3104, 1998, y en Greinix y col., Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: un estudio piloto, Blood, Vol. 96, No. 7, 2426-31, 2000, los autores describen el ensayo que reveló que la Fotoféresis era particularmente eficaz en la inversión de los efectos adversos (conocidos como enfermedad de injerto contra huésped o EICH) después de trasplante de médula ósea o células madre.

Recientemente se ha descifrado un mecanismo que está implicado en la eficacia de la Fotoféresis. El sistema de exposición ultravioleta de plástico plano, un componente del aparato de Fotoféresis, puede provocar la transformación de monocitos en sangre a células dendríticas presentadoras de antígeno (células dendríticas) como resultado de las fuerzas impuestas sobre los monocitos, a medida que fluyen a lo largo de la superficie de plástico en un aparato de Fotoféresis convencional. Dado que los beneficios terapéuticos resultantes del uso de estas células dendríticas están provocados por la *transferencia* de antígenos tisulares a células dendríticas capaces de *inmunización* del paciente contra estos antígenos, la inmunoterapia se denomina “Transinmunización”. Por lo tanto, la Transinmunización es un tratamiento que puede, en una realización, conseguirse con un aparato de Fotoféresis. Como alternativa, el tratamiento de Transinmunización puede realizarse usando otro dispositivo apropiado que tenga canales de plástico que puedan inducir la diferenciación de monocitos en células dendríticas. Una diferencia importante entre el proceso de Transinmunización descrito en el presente documento y la Fotoféresis convencional es el reconocimiento de que, antes de devolver al paciente las células dendríticas cargadas con antígeno, los antígenos tisulares necesarios pueden administrarse mejor a las nuevas células dendríticas incubando *ex vivo* durante una noche.

En la Fotoféresis, un agente fotoactivable, tal como 8-metoxipsoraleno (8-MOP), se activa por exposición a luz ultravioleta A (UVA) en la sangre circulada de manera extracorpórea, provocando que el 8- MOP forme fotoaductos con bases de pirimidina de ADN y proteínas citoplasmáticas que contienen tirosina. Las secuelas clínicas positivas provocadas por la Fotoféresis se producen a partir de la respuesta inmunológica del paciente a la sangre tratada reinfundida. La respuesta inmunitaria resultante puede, en los mejores respondedores, conducir a la supresión selectiva o incluso a la eliminación del clon (o clones) patógeno.

Como se ha expuesto anteriormente, recientemente se ha descubierto que el paso de la sangre a través de la cámara de plástico, de exposición de ultravioleta, del dispositivo de Fotoféresis puede estimular la conversión de monocitos sanguíneos a células dendríticas (CD) presentadoras de antígeno, los iniciadores más potentes de reacciones inmunitarias celulares. Dos fenómenos contribuyen al éxito clínico de la Transinmunización. En determinadas situaciones, es deseable producir una reacción inmunológica positiva o inmunización contra las células que provocan la enfermedad que se diferencian de sus homólogos normales por su presentación en la superficie de dianas moleculares distintas que pueden dirigirse inmunológicamente. Una situación de este tipo es el cáncer, en el que las células malignas presentan antígenos tumorales distintivos. En otras situaciones, es deseable suprimir una reacción inmunológica que provoque realmente la enfermedad. Estas situaciones incluyen el rechazo inmunológico de un órgano trasplantado o enfermedad de injerto contra huésped (EICH), en las que las preparaciones de las células madre trasplantadas de un donante a un receptor incluyen linfocitos T donantes que después reconocen los tejidos del receptor como “extraños”, proliferan para formar muchas copias de ellos mismos en el receptor y atacar peligrosamente las células normales del receptor.

En la situación de cáncer, las células malignas pueden estar dañadas de manera que serán ingeridas por las CD recién formadas, que después se permite que se desarrollen en CD maduras que posteriormente presentan los antígenos distintivos de las células patógenas a un sistema inmunitario de respuesta, generando así una reacción inmunológica “positiva” capaz de inhibir o destruir un cáncer. Las respuestas de linfocitos T CD8 (y probablemente también CD4) provocadas o potenciadas por este tratamiento pueden a menudo prolongarse durante largos periodos de tiempo. Como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 09/928.855, US 6.607.722, el procedimiento puede refinarse para maximizar la ingestión de linfocitos T patógenos apoptóticos mediante las CD recién formadas y por lo tanto maximizar la resistencia de las reacciones inmunológicas anti-cáncer generadas.

Sin embargo, también puede usarse una variación del mismo procedimiento para suprimir selectivamente reacciones inmunológicas no deseables, tal como un rechazo de trasplante de órgano o EICH, a través de las acciones supresoras de las CD que han permanecido inmaduras. A diferencia de las CD maduras, las CD inmaduras trasmiten señales supresoras específicas a linfocitos T, debido a que las CD inmaduras no han desarrollado aún el arsenal de moléculas de membrana capaz de estimular respuestas inmunológicas positivas fuertes. Por ejemplo, las CD inmaduras carecen de moléculas coestimuladoras, tales como B7.1 y B7.2, que pueden contribuir a la administración de señales positivas a linfocitos T sensibles. En lugar de provocar respuestas positivas, o de inmunización, estas CD inmaduras pueden suprimir de manera selectiva reacciones precisamente contra los antígenos que han ingerido, procesado y presentado en su superficie. Estudios realizados en un modelo experimental de Fotoféresis convencional revelaron la capacidad de ese tratamiento para suprimir de manera selectiva el rechazo de tejido trasplantado. Específicamente, cuando se trasplantó la piel de un ratón donante negro a un ratón blanco completamente distinto genéticamente, la piel trasplantada se rechazó completamente en 14 días. Esto era de esperar, ya que los ratones donantes y receptores eran diferentes en cuanto a antígenos de histocompatibilidad hasta un nivel equivalente a seis de seis coincidencias en seres humanos y dado que la piel es el órgano sólido más inmunogénico. Después del rechazo de la piel trasplantada, el ratón receptor se sacrificó y su bazo, que contenía clones notablemente expandidos de los linfocitos T que provocaban el rechazo, así como monocitos tisulares, se llevaron a una suspensión de células individual. Después, en un sistema diseñado para imitar una fotoféresis convencional, los linfocitos T suspendidos se expusieron en una placa de Petri a 8-MOP activado por UVA y después se devolvieron por vía intravenosa a un ratón genéticamente idéntico al receptor original, inmunizando por lo tanto al nuevo ratón contra los clones de linfocitos T implicados en el rechazo de la piel trasplantada.

Después, este nuevo ratón recibió nuevos trasplantes de piel: uno de la misma cepa donante original y otro de una tercera cepa de ratón para nada relacionada con cualquiera de las otras dos cepas. En lugar de rechazarse en 14 días como antes, la piel trasplantada de la cepa donante original sobrevivió ahora intacta durante los 42 días completos del experimento. Por el contrario, la piel trasplantada de manera simultánea de la tercera cepa para nada relacionada se rechazó en 14 días. La supresión selectiva del rechazo del injerto de piel podría transferirse a otro conjunto de ratones, genéticamente idénticos al receptor original, por transfusión de linfocitos T del receptor. Estos resultados demostraron que el modelo experimental de Fotoféresis condujo a la supresión específica del donante del rechazo de la piel trasplantada y que esta supresión estaba mediada por linfocitos T supresores de manera selectiva inducidos por el procedimiento. Estos ensayos se describen con más detalle en Yamane y col., Suppression of anti-skin-allograft response by photodamaged effector cells - the modulating effects of prednisone and cyclophophamide, Transplantation, Vol. 54, 119-124, No. 1, julio 1992; Perez y col., Induction of a cell-transferable suppression of alloreactivity by photodamaged lymphocytes, Transplantation, Vol. 54, 896-903, No. 5, noviembre 1992; Perez y col., DNA associated with the cell membrane is involved in the inhibition of the skin rejection response induced by infusions of photodamaged alloreactive cells that mediate rejection of skin allograft, Photochemistry and Photobiology, Vol. 55, 839-849, No. 6, 1992.

Paradójicamente, cuando el experimento se modificó de manera que la cepa donante fuese diferente de la cepa receptora, solo en los antígenos de histocompatibilidad secundarios, la piel trasplantada pudo conservarse intacta en el receptor durante solo 21 días. Este tiempo era más largo que el de los controles no tratados, pero solamente la mitad cuando la piel de la cepa para nada relacionada se trasplantó a receptores preparados. Aunque de momento es desconcertante, parece que la reacción es más eficaz cuanto más fuerte se esté suprimiendo. Esto se debe probablemente a la sensibilidad preferencial de linfocitos T de alta afinidad, generados más fácilmente por fuertes reacciones inmunitarias, para que se supriman directamente por las CD inmaduras producidas en el procedimiento de Fotoféresis experimental. De manera significativa, este hallazgo sugiere que el procedimiento de Transinmunización, descrito más adelante, puede ser más eficaz en la prevención de rechazo de órganos trasplantados cuando el donante y el receptor no son coincidentes en uno o más antígenos HLA. Por consiguiente, la Transinmunización puede aumentar drásticamente el grupo de donante del tejido que puede trasplantarse. La modificación de la Transinmunización que se describe en esta solicitud aumentará además el grupo de donante del tejido que puede trasplantarse, potenciando los efectos supresores de la Transinmunización.

Los procedimientos para suprimir la respuesta inmunitaria de individuos a tejido o células trasplantados, que usan el procedimiento de Transinmunización, en combinación con injertos de piel entre receptores y donantes de trasplantes se han descrito previamente en el documento US 7.625.557 (Solicitud de Patente de Estados Unidos en tramitación Nº de Serie 10/217.856). La presente invención se refiere a procedimientos de supresión de la respuesta inmunitaria de individuos a tejido o células trasplantados usando un procedimiento de Transinmunización modificado para inducir la formación de células dendríticas, y truncar la maduración de las células dendríticas en una fase en la que se inactivarán linfocitos T seleccionados que, de otra manera, participarían en la EICH o en el rechazo de un órgano o tejido trasplantado.

Las células dendríticas inmaduras pueden usarse para suprimir las respuestas del sistema inmunitario no deseadas en individuos que reciben médula ósea, células madre, órganos o tejidos trasplantados. Las células dendríticas inmaduras pueden suprimir preferentemente respuestas inmunitarias debido a su carencia relativa en moléculas coestimuladoras, tales como DC-80 y DC-86 (conocidas también como B7.1 y B7.2, respectivamente). Para que una célula dendrítica presentadora de antígeno estimule respuestas inmunitarias positivas a partir de linfocitos T específicos de antígeno, deben trasmitirse dos señales desde la célula dendrítica presentadora de antígeno al

linfocito T específico de antígeno. Una primera señal se transmite desde el antígeno presentado sobre la superficie de la célula dendrítica al linfocito T mediante la unión del antígeno con un receptor de linfocito T complementario de superficie. La segunda señal se transmite mediante moléculas coestimuladoras sobre la superficie de la célula dendrítica. Si la señal de antígeno se transmite en ausencia de la señal coestimuladora, el linfocito T específico de antígeno se inactiva o elimina, en lugar de estimularse para producir una respuesta inmunitaria positiva para las células que presentan los antígenos transmitidos. Se sabe que las células dendríticas inmaduras carecen de moléculas coestimuladoras y por lo tanto trasmiten señales negativas o supresoras a los linfocitos T que tienen receptores para los antígenos presentados. Por consiguiente, pueden producirse células dendríticas que tengan maduración truncada y las células dendríticas inmaduras pueden usarse para suprimir la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno en los receptores de trasplante.

Los pacientes con cáncer se preparan frecuentemente para trasplantes de médula ósea/células madre a partir de individuos genéticamente distintos, recibiendo primero grandes dosis de quimioterapia para conseguir dos objetivos: disminución de la carga tumoral y debilitamiento del sistema inmunitario de manera que las células trasplantadas no se rechacen rápidamente. Este nivel de preparación es en sí mismo letal para la vida, ya que la quimioterapia preparativa destruye en gran medida la médula ósea del propio paciente con cáncer. Si las células trasplantadas no toman y finalmente reconstituyen la médula ósea del paciente, el paciente sucumbirá a infecciones, anemia, hemorragia, etc. Cuando el trasplante de médula ósea/células madre reconstituye satisfactoriamente el sistema inmunitario del paciente, las células del donante repueblan ese sistema inmunitario. Estas células del donante reconocen después el tejido del receptor como extraño y atacan (rechazan) los órganos del propio receptor en un procedimiento denominado enfermedad de injerto contra huésped (EICH). El ataque más prominente en esta EICH se produce en la piel (que puede desprenderse), el hígado (que puede fallar) y el tracto intestinal (que puede dejar de funcionar adecuadamente y tener hemorragias). Para salvar la vida, la inversión o supresión de la EICH, es muy difícil con tratamientos convencionales que son normalmente muy tóxicos.

De manera destacable, en años recientes, ha llegado a ser obvio que un nivel controlable de EICH puede ser de gran beneficio para el paciente con cáncer. Dado que las células del donante reaccionan contra los antígenos de histocompatibilidad del receptor y dado que las células de cáncer residual son también células del receptor que llevan los antígenos de histocompatibilidad del paciente, un determinado nivel de reacción “de injerto contra tumor” o RICT comúnmente acompaña los otros componentes no deseables de EICH. Los pacientes con cáncer que sobreviven a EICH después de los trasplantes de médula ósea/células madre parece que tienen una mejora en la supervivencia de su cáncer, dado que son menos frecuentes las recurrencias. Por lo tanto, existe una línea fina entre los efectos tóxicos de la EICH y los beneficios de la RICT. En una situación ideal, un tratamiento puede suprimir la EICH mientras que queda una RICT parcial, dirigido a los antígenos más débiles que diferencian las células malignas de las células benignas del receptor. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para inactivar linfocitos T del donante que, de otra manera, atacarían los tejidos sanos del receptor, dejando al mismo tiempo intactos los linfocitos T que atacan las células tumorales que presentan un conjunto diferente de antígenos.

En la situación de trasplante de órganos, los linfocitos T del receptor atacan al órgano trasplantado, ya que las células de los órganos trasplantados presentan antígenos que no son idénticos a los antígenos presentes en las células del receptor. Sería deseable encontrar un tratamiento que pudiera inactivar los linfocitos T del receptor del ataque de las células que presentan los antígenos del donante; mientras que no afectan a la capacidad de los linfocitos T del receptor de reconocer y atacar a microbios causantes de infecciones u otros agentes causantes de enfermedades.

Sumario de la invención

En una primera realización de la invención, que es particularmente útil para los trasplantes de médula ósea o células madre, la enfermedad de injerto contra huésped (“EICH”) se suprime tratando una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato de un trasplante de células madre o de médula ósea para inducir que los monocitos contenidos en la cantidad de la sangre extracorpórea del receptor se diferencien en células dendríticas del receptor. Después de la formación de las células dendríticas del receptor, la cantidad de la sangre extracorpórea se trata adicionalmente para truncar la maduración de las células dendríticas del receptor. La maduración de las células dendríticas del receptor se trunca en una fase en la que una parte sustancial de las células dendríticas del receptor funcionarán para desactivar los linfocitos T del donante del ataque a los órganos o tejido del receptor del trasplante.

Después de truncar la maduración de las células dendríticas del receptor, mediante medios físicos (tales como, por ejemplo, radiación-γ) o mediante agentes quimioterapéuticos citostáticos (tales como, por ejemplo, mitomicina C o ciclofosfamida), las células dendríticas inmaduras del receptor se administran al receptor antes del trasplante de médula ósea o células madre. Las células dendríticas del receptor están entonces presentes en el sistema del receptor para inactivar aquellos clones de los linfocitos T del donante que, de otra manera, atacarían a las células sanas del receptor del trasplante. Como alternativa, las células dendríticas inmaduras del receptor pueden congelarse y administrarse al receptor después del trasplante de médula ósea o células madre.

Después de truncar la maduración de las células dendríticas del receptor, las células dendríticas inmaduras del receptor se combinan con preparaciones de médula ósea o células madre del donante candidato del trasplante que

contiene linfocitos T pasajeros o contaminantes del donante. Las células dendríticas inmaduras del receptor se incuban conjuntamente con los linfocitos T del donante que contienen médula ósea o células madre durante un tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas inmaduras del receptor inactiven o eliminen los clones de los linfocitos T del donante que, de otra manera, atacarían a las células sanas del receptor del trasplante. Después de la incubación conjunta, la mezcla de células dendríticas/médula ósea se administra al receptor candidato del trasplante, para reconstituir el sistema inmunitario del paciente, minimizando o eliminando al mismo tiempo la posibilidad de desarrollo de EICH.

En otra realización, para inducir la diferenciación de monocitos sanguíneos en células dendríticas del receptor, se trata una cantidad de la sangre extracorpórea del receptor del trasplante. La maduración de las células dendríticas receptoras se trunca mediante medios físicos (tales como, por ejemplo, radiación-γ) o mediante agentes quimioterapéuticos citostáticos (tales como, por ejemplo, mitomicina C o ciclofosfamida) en la fase inmadura en la que las células dendríticas del receptor son capaces de inactivar o eliminar los clones de linfocitos T del receptor capaces de atacar el tejido del donante del trasplante. Para cargar células dendríticas del receptor recién formadas con antígenos del donante, se extrae una cantidad de la sangre del donante y los leucocitos contenidos en la sangre del donante se dañan de tal manera que se induce que sufran apóptosis (muerte celular programada) o necrosis (muerte celular franca). Las células dendríticas inmaduras del receptor se combinan con los leucocitos dañados del donante y se incuban durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas del receptor se internalicen y procesen los leucocitos del donante y presenten antígenos del donante en su superficie. Las células dendríticas inmaduras del receptor interaccionan con los linfocitos T del receptor para inactivar o eliminar los linfocitos T del receptor capaces de atacar las células que presentan los antígenos de tejido característicos del donante, reduciendo o eliminando de este modo la respuesta del sistema inmunitario del receptor contra el órgano o el tejido trasplantado.

La presente divulgación también proporciona las siguientes realizaciones:

(1) Un procedimiento para suprimir la enfermedad de injerto contra huésped en un individuo que recibe una preparación de trasplante que comprende las etapas de:

(a) tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante haciendo que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico para inducir que los monocitos contenidos en la sangre se diferencien en células dendríticas.
(b) tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas en una fase en la que las células dendríticas inducen la supresión de una respuesta del sistema inmunitario;
(c) combinar las células dendríticas con una preparación de trasplante derivada del donante candidato del trasplante;
(d) incubar conjuntamente las células dendríticas del receptor candidato con la preparación de trasplante del donante del trasplante.

(2) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante comprende hacer que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico con un diámetro de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5,0 mm;
(3) el procedimiento de la realización (2) anterior, en el que los canales de plástico tienen un diámetro menor de aproximadamente 1,0 mm;
(4) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante se realiza en un aparato de fotoféresis;
(5) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende radiar las células dendríticas con radiación gamma;
(6) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a un fármaco citostático;
(7) el procedimiento de la realización (6) anterior, en el que el fármaco citostático se selecciona del grupo que consiste en mitomicina C y ciclofosfamida;
(8) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a una citocina;
(9) el procedimiento de la realización (8) anterior en el que la citocina es IL-10;
(10) el procedimiento de la realización (1) anterior, en el que las células dendríticas y la preparación de trasplante se incuban conjuntamente durante un período de tiempo de entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 24 horas;
(11) el procedimiento de la realización (10) anterior, en el que las células dendríticas y la preparación de trasplante se incuban conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 37 grados centígrados en una atmósfera gaseosa que comprende aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno;
(12) el procedimiento de la realización (1) anterior, que adicionalmente comprende la etapa de tratar las células dendríticas, después de haber truncado la maduración, para eliminar las células dendríticas que presentan antígenos característicos de células dendríticas maduras;
(13) el procedimiento de la realización (12) anterior, en el que las células dendríticas se tratan después de haber truncado la maduración, haciendo que las células dendríticas fluyan a través de una columna rellenada;

(14) el procedimiento de la realización (13) anterior, en el que la columna rellenada contiene perlas de resina revestidas con anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a antígenos presentados por las células dendríticas maduras;

(15) un procedimiento para la supresión del sistema inmunitario de un individuo que recibe un trasplante de un órgano o tejido, que comprende las etapas de:

(a) tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante haciendo que el flujo pase a través de un aparato que tiene canales de plástico para inducir que los monocitos contenidos en la sangre se diferencien en células dendríticas;

(b) tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas en una fase en la que las células dendríticas pueden inducir la supresión de una respuesta del sistema inmunitario;

(c) obtener una cantidad de sangre del donante candidato del trasplante, en el que la sangre contiene una cantidad sustancial de células leucocitarias del donante candidato del trasplante;

(d) tratar los leucocitos sanguíneos del donante candidato del trasplante para inactivar los linfocitos T contenidos en las células leucocitarias del donante;

(e) combinar e incubar las células dendríticas del receptor candidato del trasplante con los leucocitos sanguíneos tratados del donante candidado del trasplante.

(16) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidado del trasplante comprende hacer que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico con un diámetro de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5,0 mm;

(17) el procedimiento de la realización (16) anterior, en el que los canales de plástico tienen un diámetro de menos de aproximadamente 1,0 mm;

(18) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante se realiza en un aparato de Fotoféresis;

(19) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende radiar las células dendríticas con radiación gamma;

(20) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a un fármaco citostático;

(21) el procedimiento de la realización (20) anterior, en el que el fármaco citostático se selecciona del grupo que consiste en mitomicina C y ciclofosfamida;

(22) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar los leucocitos sanguíneos del donante candidato del trasplante para inactivar los linfocitos T en los leucocitos sanguíneos del donante comprende radiar los leucocitos sanguíneos del donante con radiación gamma;

(23) el procedimiento de la realización (15) anterior; en el que la etapa de tratar los leucocitos sanguíneos del donante candidato del trasplante para inactivar los linfocitos T en los leucocitos sanguíneos del donante comprende exponer los leucocitos sanguíneos a un fármaco citostático;

(24) el procedimiento de la realización (23) anterior, en el que el fármaco citostático se selecciona del grupo que consiste en mitomicina G y ciclofosfamida;

(25) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que la etapa de tratar los leucocitos sanguíneos del donante candidato del trasplante para inactivar los linfocitos T en los leucocitos sanguíneos del donante comprende exponer los leucocitos sanguíneos a una citocina;

(26) el procedimiento de la realización (25) anterior, en el que la citocina es IL-10;

(27) el procedimiento de la realización (15) anterior, en el que las células dendríticas y los leucocitos sanguíneos inactivados se incuban conjuntamente durante un período de tiempo de entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 24 horas;

(28) el procedimiento de la realización (27) anterior, en el que las células dendríticas y los leucocitos inactivados se incuban conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 37 grados centígrados en una atmósfera gaseosa que comprende aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno;

(29) el procedimiento de la realización (15) anterior, que comprende adicionalmente la etapa de tratar las células dendríticas después de truncar la maduración para eliminar las células dendríticas que presentan antígenos característicos de células dendríticas maduras;

(30) el procedimiento de la realización (29) anterior, en el que después de haber truncado la maduración, las células dendríticas se tratan bombeándolas a través de una columna rellenada;

(31) el procedimiento de la realización (30) anterior, en el que la columna rellenada contiene perlas de resina revestidas con anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a antígenos presentados por las células dendríticas maduras;

(32) un procedimiento para suprimir la enfermedad de injerto contra huésped en un individuo que recibe una preparación de trasplante que contiene células madre o médula ósea, que comprende las etapas de:

(a) tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante haciendo que la sangre fluya en un aparato que tiene canales de plástico para inducir que los monocitos contenidos en la sangre se diferencien en células dendríticas;

(b) tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas en una fase en la que las células dendríticas inducen la supresión de la respuesta del sistema inmunitario.

(33) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que las células dendríticas se administran al receptor del trasplante antes de la administración de la preparación de trasplante;

(34) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante comprende hacer que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico con un diámetro de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5,0 mm;

(35) el procedimiento de la realización anterior (34) anterior, en el que los canales de plástico tiene un diámetro de menos de aproximadamente 1,0 mm;

(36) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que la etapa de tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante se realiza en un aparato de Fotoféresis;

(37) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende radiar las células dendríticas con radiación gamma;

(38) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a un fármaco citostático;

(39) el procedimiento de la realización (38) anterior, en el que el fármaco citostático se selecciona del grupo que consiste en mitomicina C y ciclofosfamida;

(40) el procedimiento de la realización (32) anterior, en el que la etapa de tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a una citocina;

(41) el procedimiento de la realización (40) anterior, en el que la citocina es IL-10;

(42) el procedimiento de la realización (32) anterior, que adicionalmente comprende las etapas de congelar las células dendríticas después de truncar la maduración de las células dendríticas, conservar las células dendríticas congeladas, descongelar las células dendríticas congeladas y administrar las células dendríticas al receptor del trasplante después de la administración de la preparación del trasplante;

(43) el procedimiento de la realización (32) anterior, que adicionalmente comprende la etapa de tratar las células dendríticas después de haber truncado la maduración para eliminar las células dendríticas que presentan antígenos característicos de células dendríticas maduras;

(44) el procedimiento de la realización (43) anterior, en el que las células dendríticas se tratan después de haber truncado la maduración haciendo que las células dendríticas fluyan a través de una columna rellenada; y

(45) el procedimiento de la realización (44) anterior, en el que la columna rellenada contiene perlas de resina revestidas con anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a antígenos presentados por las células dendríticas maduras.

Entre las ventajas de los procedimientos desvelados en el presente documento es que el uso de fármacos inmunosupresores globalmente en los receptores de trasplante puede reducirse o eliminarse, reduciendo o eliminando por tanto los efectos de salud adversos asociados a los fármacos inmunosupresores. Otra ventaja de los procedimientos de la presente invención es que la frecuencia y la gravedad de la EICH en los receptores de trasplante de médula ósea/células madre puede reducirse en gran medida. Una ventaja adicional es que puede ampliarse el conjunto de posibles donantes de trasplante. Otras ventajas de los procedimientos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia basándose en la descripción detallada de las realizaciones preferidas expuestas más adelante.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

La presente divulgación se refiere a procedimientos de supresión de la respuesta del sistema inmunitario en receptores de órganos, tejidos o células trasplantados. Los procedimientos comprenden la inducción de la diferenciación de monocitos en células dendríticas en una cantidad de la sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante. La maduración de las células dendríticas se trunca en una fase en la que una parte sustancial de las células dendríticas carece de moléculas coestimuladoras y puede inactivar los linfocitos T que, de otra manera, atacarían el tejido sano del receptor o el tejido o las células trasplantados. En el caso de un trasplante de médula ósea o de células madre, las células dendríticas harán señales a los linfocitos T del donante producidos por, o incluidos con, la médula ósea o células madre trasplantadas, para tolerar los órganos y tejidos del receptor, reduciendo o eliminando de esta manera la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en el receptor del trasplante. En el caso de un trasplante de órgano, las células dendríticas disminuirán o eliminarán la probabilidad de que los linfocitos T del receptor rechacen el órgano trasplantado.

Procedimientos para el trasplante de médula ósea/células madre

En una primera realización, que puede ser especialmente útil en el caso de trasplante de médula ósea o células madre, el receptor candidato del trasplante se trata para reducir o eliminar la EICH después del trasplante de médula ósea o células madre. Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, una “preparación de trasplante” significa una muestra de médula ósea y/o de células madre del donante del trasplante contaminada con linfocitos T del donante, algunos de los cuales son linfocitos T del donante contra antígenos tisulares del receptor.

Del receptor candidato del trasplante, se obtiene una cantidad de sangre extracorpórea y la sangre se trata para inducir la diferenciación de monocitos contenidos en la sangre del receptor en células dendríticas funcionales, que en el presente documento se denominan “células dendríticas del receptor”. La diferenciación de monocitos se induce haciendo que los monocitos fluyan a través de un dispositivo que tiene canales de plástico estrechos, tales como, por ejemplo, los canales de plástico estrechos de un aparato de Fotoféresis convencional. Previamente, se han descrito procedimientos para inducir la diferenciación de monocitos en células dendríticas funcionales, en el documento US 2002-0114793A1 (Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 09/294.494 y 10/066.021, ambas tituladas “Methods for Inducing the Differentiation of Monocytes Into Functional Dendritic Cells and Immunotherapeutic Compositions Including Such Dendritic Cells”). Las células dendríticas del receptor presentarán de manera natural, en su superficie, los antígenos leucocitarios humanos de tipo tisular típicos del receptor candidato del trasplante. Como se describe más adelante, esta presentación de antígeno puede potenciarse como resultado de la ingestión de leucocitos apoptóticos del receptor por las células dendríticas del receptor.

La maduración de las células dendríticas del receptor está truncada, mediante procedimientos físicos o químicos, en una fase en la que las células dendríticas inmaduras inducen preferentemente la supresión inmunitaria. Las células dendríticas inmaduras inducen la supresión de la respuesta del sistema inmunitario debido a su carencia relativa en moléculas coestimuladoras, tales como CD-80 y CD-86. Se sabe que, para estimular las respuestas inmunitarias positivas de los linfocitos T específicas de antígeno, deben trasmitirse dos señales desde la célula dendrítica presentadora de antígeno al linfocito T específico. La primera señal se transmite al linfocito T mediante su unión (a través de su receptor de linfocito T de superficie) del antígeno presentado sobre la superficie de la célula dendrítica. La segunda señal se transmite mediante moléculas coestimuladoras, también sobre la superficie de la célula dendrítica. Si sólo se transmite la señal de antígeno, en ausencia de la señal coestimuladora, el linfocito T específico de antígeno se inactiva o elimina, en lugar de estimularse para producir una respuesta inmunológica positiva. Se sabe que, las células dendríticas inmaduras son deficientes en moléculas coestimuladoras y por lo tanto transmiten señales negativas o supresoras a los linfocitos T, que tienen receptores de linfocitos T específicos para los antígenos presentados. Por consiguiente, como se describe a continuación, truncando la maduración de las células dendríticas del receptor en una fase apropiada, las células dendríticas del receptor pueden usarse para inactivar o eliminar los linfocitos T específicos de antígeno anti-donante contenidos en, o producidos por, la médula ósea del donante, preservando de esta manera el ataque de los linfocitos T de los órganos o tejidos del receptor de trasplante de médula ósea, como ocurre en la EICH.

Los expertos en la técnica conocen bien técnicas para truncar la maduración de las células dendríticas. Por ejemplo, la exposición de las células dendríticas inmaduras a dosis apropiadas de radiación γ , truncará la maduración de las células dendríticas, permitiendo al mismo tiempo que las células dendríticas sean funcionales. Como alternativa, la maduración de las células dendríticas puede truncarse exponiendo las células dendríticas a fármacos citoestáticos (tal como, por ejemplo, mitomicina C o ciclofosfamida) o a determinadas citocinas (tales como, por ejemplo, IL-10). La invención no se limita a este aspecto y para truncar la maduración de las células dendríticas puede usarse cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, permitiendo al mismo tiempo que las células dendríticas sean funcionales.

Preferentemente, la maduración de las células dendríticas se trunca en la fase en la que las células dendríticas son deficientes en moléculas coestimuladoras CD-80 y CD-86. Estas moléculas marcadoras aumentan en concentración en la superficie de la célula dendrítica con aumento de la madurez de las células dendríticas. La fase de maduración de las células dendríticas puede determinarse usando cualquier procedimiento apropiado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, a la sangre tratada, pueden añadirse anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína que se unen selectivamente a CD-80 y CD-86 y los anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína unidos pueden medirse usando un citofluorógrafo. Debe reconocerse que, mediante este procedimiento, no será necesario medir la maduración de las células dendríticas en cada caso. En lugar de esto, para la formación y maduración de las células dendríticas puede determinarse inicialmente un periodo de tiempo de incubación apropiado para un dispositivo o tipo de dispositivo particular usado para inducir la diferenciación de monocitos, y el tiempo de incubación determinado puede usarse como tiempo patrón para la realizar el procedimiento descrito en el presente documento usando el dispositivo. Debe entenderse que, si se desea, las células dendríticas pueden congelarse después de haberse tratado para truncar la maduración y conservarse para uso posterior.

En una realización de la invención, después de truncar la maduración de las células dendríticas del receptor, las células dendríticas inmaduras se devuelven al receptor antes de la administración de la preparación de trasplante. La población relativamente grande de células dendríticas inmaduras del receptor presentes en el receptor puede interaccionar *in vivo* para inactivar los clones de los linfocitos T del donante en la preparación del trasplante que, de otra manera, atacarían a las células del tejido sanos del receptor. Como alternativa, para suprimir la EICH, las células dendríticas inmaduras del receptor pueden congelarse y administrarse al receptor conjuntamente o después de la administración de la preparación de trasplante. Si se desea, antes de la administración de la preparación de trasplante, puede administrarse al receptor una alícuota de las células dendríticas inmaduras del receptor y después de la administración de la preparación de trasplante puede administrarse una o más alícuotas de las células dendríticas inmaduras del receptor.

En otra realización del procedimiento de la invención, después de haberse tratado las células dendríticas del receptor para truncar la maduración, las células dendríticas inmaduras del receptor se combinan con una preparación de trasplante que comprende una muestra de médula ósea y/o células madre del donante candidato del trasplante que contiene una subpoblación de linfocitos T del donante contra antígenos tisulares del receptor. Los linfocitos T del donante contra el receptor son una población relativamente pequeña de linfocitos en la preparación de trasplante porque, antes de la introducción en el receptor del trasplante, los linfocitos T del donante no se han estimulado mediante el reconocimiento de los antígenos del receptor para proliferar y formar clones expandidos cuyos miembros de linfocitos T están cebados para atacar las células del receptor. Debe entenderse que, si se desea, las células dendríticas pueden congelarse después de haberse tratado para truncar la maduración y pueden conservarse para uso posterior.

Las células dendríticas inmaduras y la preparación de trasplante que contiene linfocitos T del donante se incuban conjuntamente durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas inmaduras del receptor inactiven o eliminen selectivamente los linfocitos T del donante que, de otro modo, atacarían a las células del receptor después del trasplante. Las células dendríticas inmaduras del receptor inactivan o eliminan la capacidad de los linfocitos T del donante para atacar a las células del receptor que muestran los mismos antígenos del receptor presentados por las células dendríticas del receptor. Preferentemente, la incubación tendrá lugar durante un periodo de tiempo de entre 12 y 24 horas. Sin embargo, pueden usarse tiempos de incubación más largos o más cortos, siempre que el tiempo de incubación sea suficiente para permitir un número de células dendríticas adecuado para poner en contacto y suprimir o eliminar los linfocitos T anti-receptor del donante.

La incubación conjunta de las células dendríticas del receptor y la preparación de trasplante que contiene linfocitos T del donante se realiza usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En una realización preferida, la incubación se realiza a aproximadamente 37 grados centígrados en una incubadora convencional que contiene un ambiente gaseoso que tiene aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno, solo con pequeñas cantidades de otros gases.

Después de la incubación conjunta de las células dendríticas inmaduras del receptor con la preparación de trasplante que contiene linfocitos T, la mezcla de células dendríticas del receptor y la preparación de trasplante que contiene linfocitos T se administra al receptor del trasplante. Preferentemente, el receptor del trasplante habrá recibido quimioterapia preparativa antes de administrar la mezcla para impedir el rechazo de la médula ósea trasplantada del donante. La médula ósea y/o las células madre trasplantadas del donante reconstituyen el sistema inmunitario del receptor. Dado que los linfocitos T del donante de tipo anti-receptor, contenidos en la preparación de trasplante, se han desactivado, la EICH en el receptor se reduce o elimina.

En la situación óptima, las células dendríticas inmaduras del receptor inactivarán o eliminarán solo los linfocitos T del donante que atacan a las células que presentan los antígenos del tejido del receptor, sin influir al mismo tiempo en la capacidad de los linfocitos T del donante anti-tumor que presentan un conjunto diferente de antígenos tumorales o para reconstituir la capacidad del sistema inmunitario para defenderse contra el amplio espectro de otros antígenos, tales como lo típicos de microbios infecciosos. Sin embargo, la invención no se limita en este aspecto y el procedimiento puede usarse para suprimir la EICH sin proporcionar ningún beneficio en el tratamiento de células tumorales.

Aunque la invención no se limita a ningún mecanismo particular mediante el que las células dendríticas actúan para inducir tolerancia inmunológica a la médula ósea o células madre trasplantadas, se cree que las células dendríticas inmaduras transmiten señales inhibidoras a linfocitos T específicos de antígeno debido a que las células dendríticas inmaduras son relativamente deficientes en células coestimuladoras. El receptor del trasplante recibe células dendríticas inmaduras que se forman a partir de la sangre del receptor y que presentan los antígenos del receptor. La maduración de las células dendríticas se ha truncado en una fase en la que las células dendríticas inmaduras son deficientes en moléculas coestimuladoras CD-80 y CD-86 (conocidas también como B7.1 y B7.2, respectivamente). Las células dendríticas inmaduras, cargadas con antígeno, transmiten señales supresoras o tolerogénicas a los linfocitos T del donante en la preparación de trasplante que tiene los receptores de linfocitos T específicos de antígeno (TCR) que reconocerán y se unirán a los antígenos de interés.

Dado que las células dendríticas inmaduras son relativamente deficientes (en comparación con las células dendríticas maduras) en moléculas coestimuladoras CD-80 y CD-86, los linfocitos T del donante de respuesta se estimulan para expresar sobre su superficie CTLA-4, que se une con avidez a las CD-80 y CD-86 mínimamente presentes sobre la superficie de las células dendríticas inmaduras. La unión de los linfocitos T específicos al antígeno presentado por la célula dendrítica en presencia de moléculas coestimuladoras de expresión mínima provoca que los linfocitos T específicos de antígeno del donante se conviertan en linfocitos T inhibidores selectivamente que expresan CTLA-4. Estos linfocitos T inhibidores selectivamente también expresan CD4 y CD25. Los linfocitos T del donante inhibidores selectivamente inhiben otros linfocitos T del donante del ataque a las células del receptor, inhibiendo así la EICH en el receptor de trasplante de médula ósea.

La incubación conjunta de las células dendríticas inmaduras del receptor con los linfocitos T del donante que contiene la preparación de trasplante estimula la formación de linfocitos T del donante CD4(+)CD25(+) CTLA-4(+) inhibidores selectivamente, reduciendo o eliminando por tanto la EICH. CD4 es un marcador de linfocitos T

auxiliares/inductores y CD25 es el receptor de un factor de crecimiento de linfocitos T conocido como Interleucina-2. El subconjunto de linfocitos T identificado por la presencia simultánea de CD4 y CD25 en la superficie puede actuar para suprimir la actividad de los linfocitos T que provocan la EICH, el rechazo del órgano trasplantado y las enfermedades autoinmunes (tales como lupus o artritis reumatoide). El efecto supresor de los linfocitos T CD4(+)CD25(+) puede potenciarse por la presencia de Interleucina-10 (IL-10). Por consiguiente, puede añadirse IL-10 a las células dendríticas inmaduras del receptor antes, durante o después de la incubación conjunta con los linfocitos T del donante que contiene médula ósea.

Debe reconocerse que no es un requisito o limitación del procedimiento de la presente invención que las células dendríticas inmaduras reaccionen con los linfocitos T del donante precisamente como se describe en el presente documento y que puede existir otros aspectos de la interacción entre las células dendríticas inmaduras y los linfocitos T del donante implicados, en conjunto o en parte, en la supresión de la EICH. Por ejemplo, en determinadas circunstancias, las células dendríticas inmaduras pueden inhibir o incluso suprimir directamente los linfocitos T autorreactivos, en lugar de funcionar a través de linfocitos T supresores intermedios.

En otra realización de la presente invención, después de truncar la maduración de las células dendríticas, las células dendríticas se tratan adicionalmente para retirar cualquier célula dendrítica en la sangre tratada que pueda haber madurado más allá de la fase deseada para su uso en supresión de la EICH. Después de que la sangre se haya tratado para inducir la diferenciación de monocitos, se haya incubado y tratado para truncar la maduración de las células dendríticas, las células dendríticas se pasan a través de un medio para eliminar las células dendríticas maduras. El medio presenta uno o más anticuerpos que se unirán selectivamente a moléculas presentadas por las células dendríticas que han madurado más allá de la fase deseada para su uso en el tratamiento de la EICH.

Preferentemente, las células dendríticas se pasan a través de una columna rellenada. La columna puede rellenarse con materiales, tales como perlas de resina, que tienen en su superficie uno o más anticuerpos que se unen selectivamente a células dendríticas maduras. Las células dendríticas maduras se unen selectivamente a los anticuerpos, mientras que las células dendríticas inmaduras se pasan a través de la columna, dando como resultado una composición que tiene un alto porcentaje de células dendríticas inmaduras que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención.

Producción de células dendríticas

Como se ha indicado anteriormente, anteriormente el procedimiento de Transinmunización para inducir la diferenciación de monocitos en células dendríticas se ha descrito en líneas generales. El procedimiento de Transinmunización, según se ha modificado para su uso en el procedimiento de la presente invención, da como resultado la producción de células dendríticas del receptor que pueden tratarse adicionalmente y usarse para suprimir la EICH o el rechazo de trasplantes de órganos o tejido. En los procedimientos descritos en el presente documento, el procedimiento de Transinmunización modificado se realiza obteniendo una cantidad de la sangre extracorpórea del receptor del trasplante y tratando la sangre para inducir la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras del receptor. Posteriormente, las células dendríticas del receptor se tratan adicionalmente para truncar su maduración en un estado en el que preferentemente inducen la inmunosupresión, en lugar de las respuestas inmunitarias positivas que pueden producir las células dendríticas maduras. Como se ha descrito anteriormente, los expertos en la técnica saben que la exposición de las células dendríticas inmaduras a dosis apropiadas de radiación γ, truncará la maduración de las células dendríticas, permitiéndolas al mismo tiempo ser funcionales. Se conocen también otras estrategias para conservar a las células dendríticas del receptor inmaduras, tales como exposición a fármacos citoestáticos (tales como, por ejemplo, mitomicina C o ciclofosfamida) o a determinadas citocinas (por ejemplo, IL-10), y pueden sustituirse cuando sea apropiado por la radiación γ. La invención no se limita a este aspecto y puede usarse cualquier procedimiento apropiado para truncar la maduración de las células dendríticas sin destruir la funcionalidad de las células.

La diferenciación de monocitos puede inducirse exponiendo los monocitos, contenidos en una cantidad de la sangre extracorpórea del receptor del trasplante, a perturbación física, en particular a las fuerzas ejercidas sobre los monocitos mediante su adhesión secuencial a, y liberación de, las superficies de plástico a medida que fluyen a través de un canal de plástico estrecho, tal como el canal de plástico estrecho en un dispositivo de Fotoféresis convencional. En una realización preferida, a partir de una cantidad de la sangre extracorpórea del receptor del trasplante se prepara un concentrado de leucocitos de acuerdo con la práctica convencional de leucoféresis, que usa un aparato de leucoféresis/fotoféresis del tipo conocido por los expertos en la técnica. El concentrado de leucocitos incluye monocitos, linfocitos y algunos eritrocitos y plaquetas. Típicamente, durante la leucofóresis pueden recogerse aproximadamente dos billones de leucocitos. Suponiendo que los monocitos comprenden de aproximadamente 2% a aproximadamente 50% del total recogido de la población de leucocitos, aproximadamente de 40 millones a 1 billón de monocitos están presentes en el concentrado de leucocitos. El porcentaje promedio de monocitos es aproximadamente del 20%, por tanto, normalmente cerca de 40 millones de monocitos estarán en el concentrado de leucocitos recogido mediante leucofóresis.

Después de separación por leucofóresis, la diferenciación de monocitos se induce bombeando el concentrado de células sanguíneas a través de un dispositivo que tiene una pluralidad de canales de plástico. Preferentemente, los canales de plástico tienen un diámetro de entre aproximadamente 0,5 mm y 5,0 mm. Más preferentemente, se usa

un aparato de Fotoféresis convencional que tiene un diámetro de canal de 1 mm o menor. La configuración del canal estrecho del aparato de Fotoféresis maximiza el área de superficie de plástico al que el concentrado de células sanguíneas se expone a medida que fluye a través del aparato de Fotoféresis. Sin embargo, la invención no se limita a este aspecto y puede usarse cualquier dispositivo apropiado que tenga canales de plástico para inducir la diferenciación de monocitos. Por ejemplo, la cantidad de sangre extracorpórea se puede pasar a través de una columna que contenga perlas de plástico o algún otro dispositivo o medio para canalizar el flujo a través de la columna. Además, se puede provocar que la cantidad de sangre extracorpórea fluya a través de los canales de plástico por gravedad, por presión o por cualquier otra técnica que provoque que la sangre fluya a través de los canales de plástico.

Aunque la invención no está limitada a ningún mecanismo particular de diferenciación de monocitos, se cree que los monocitos en el concentrado de células sanguíneas están atraídos por las paredes de los canales de plástico del aparato de Fotoféresis y los monocitos se adhieren a las paredes de los canales. El fluido que fluye a través del canal que impone compartir fuerzas sobre los monocitos adheridos que causan que los monocitos transitoria e incompletamente adherentes se liberen de las paredes de los canales de plástico. Por consiguiente, a medida que los monocitos pasan a través del aparato de Fotoféresis, pueden experimentar numerosos episodios de adherencia transitoria y liberarse de las paredes de los canales de plástico. Estas fuerzas físicas envían señales de activación a través de las membranas celulares de los monocitos, que da como resultado la inducción de la diferenciación de monocitos en células dendríticas funcionales. La evidencia preliminar sugiere que la interacción de la glicoproteína P del monocito con la superficie de plástico puede contribuir a la entrada del monocito en la ruta de maduración de las células dendríticas. Por lo tanto, puede ser posible inducir la maduración de monocito a célula dendrítica por interacción directa con la glicoproteína-P de monocitos sin el uso de un sistema de flujo de plástico.

Después de haberse inducido la diferenciación de monocitos a células dendríticas, la sangre tratada se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas se desarrollen hasta la fase de madurez deseada antes del truncamiento de la maduración. La incubación de las células dendríticas del receptor se realiza usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. En una realización preferida, la incubación se realiza a aproximadamente 37 grados centígrados en una incubadora convencional que contiene un ambiente gaseoso que tiene aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno, solo con pequeñas cantidades de otros gases.

La inducción de monocitos para formar células las dendríticas mediante el procedimiento de flujo de adherencia transitoria al plástico ofrece diversas ventajas para el tratamiento relacionado con los trasplantes de órganos o tejidos. Dado que todas las células dendríticas del receptor se forman a partir de los monocitos contenidos en la sangre del receptor del trasplante en un período de tiempo muy corto, todas las células dendríticas del receptor tienen aproximadamente la misma edad. Creando células dendríticas con un perfil de edad relativamente estrecho, el proceso de Transinmunización modificado proporciona un número potenciado de células dendríticas inmaduras del receptor que pueden usarse para suprimir respuestas del sistema inmunitario seleccionado. Debido a que las células dendríticas del receptor inmaduras son deficientes en determinadas moléculas de superficie coestimuladoras, tales como las de la familia B7, envían señales supresoras a los linfocitos T sensibles a antígeno con las que desarrollan el contacto célula a célula. Dado que todas las células dendríticas inmaduras del receptor producidas durante el procedimiento de Transinmunización modificado tienen la misma edad, esta estrategia puede proporcionar una abundancia de células dendríticas inmaduras del receptor capaces de producir supresión dominante de las reacciones inmunitarias potentes que, de otra manera, pueden producir rechazo de los órganos trasplantados.

Si se desea, la presentación de los antígenos del receptor sobre la superficie de las células dendríticas del receptor puede potenciarse cargando las células dendríticas del receptor con linfocitos T apoptóticos o necróticos contenidos en la sangre del receptor. La apóptosis o necrosis se induce en los linfocitos T contenidos en la sangre del receptor, las células dendríticas del receptor y los linfocitos T apoptóticos o necróticos se incuban conjuntamente durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas fagociten los linfocitos T apoptóticos y las células dendríticas del receptor inmaduras, cargadas con antígeno, pueden usarse para suprimir selectivamente la EICH o el rechazo de trasplante de órgano. La apóptosis, es decir, la muerte celular programada, conduce a presentar sobre la superficie de la membrana de la célula moribunda, moléculas para las que las células dendríticas inmaduras tienen receptores, facilitando por tanto la ingestión de las células moribundas (o sus fragmentos) y el procesamiento de sus antígenos por las células dendríticas. Recientemente, se ha reconocido de manera general que los antígenos de las células que mueren por necrosis rutinaria (así como sus fragmentos) también pueden internalizarse y procesarse por las células dendríticas. Por consiguiente, debe entenderse que los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse usando células que se han vuelto o bien apoptóticas o bien necróticas.

Los linfocitos T contenidos en la cantidad de la sangre extracorpórea del receptor pueden volverse apoptóticos o necróticos mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la apóptosis puede inducirse exponiendo los linfocitos T a energía ultravioleta, a radiación de rayos X o radiación γ. Además, el choque térmico, el choque frío, la presión hidrostática o las soluciones hipotónicas pueden dañar letalmente a los linfocitos T o a otras células en formas, tales como, necrosis celular, que conducen a su captación y procesamiento por células dendríticas, de manera análoga para que también puedan desencadenar el mismo fenómeno inmunitario.

Si se desea, para hacer que los linfocitos T sean apoptóticos o necróticos, pueden usarse combinaciones de estos procedimientos.

En una realización particularmente preferida, los linfocitos T en la cantidad de la sangre extracorpórea del receptor se vuelven apoptóticos en el aparato de Fotoféresis ya que los monocitos están inducidos para formar células dendríticas del receptor mediante las fuerzas físicas que experimentan a medida que fluyen a través de canales de plástico estrechos en el aparato de Fotoféresis. Un agente fotoactivable, capaz de inducir la apóptosis en los linfocitos T, se añade al concentrado de células sanguíneas antes de pasar por el aparato de Fotoféresis y el concentrado de células sanguíneas se radia a medida que pasa a través del aparato de Fotoféresis para hacer que los linfocitos T sean apoptóticos. Haciendo que los linfocitos T sean apoptóticos en el aparato de Fotoféresis, estos linfocitos están inmediatamente disponibles para ser fagocitados a medida que los monocitos se diferencian para formar células dendríticas. Este procedimiento de tratamiento de la sangre de inducir simultáneamente la diferenciación de monocitos y la apóptosis de linfocitos T contenidos en la sangre, se describe con detalle en la Solicitud de Patente de Estados Unidos US 7.625.557 Nº 10/217.856.

Procedimiento para el trasplante de órganos

En otra realización se proporciona un procedimiento para suprimir la respuesta inmunitaria de un individuo que recibe un trasplante de un órgano o tejido de una persona diferente. Se trata una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante usando el procedimiento de Transinmunización modificado descrito anteriormente para inducir la diferenciación de monocitos sanguíneos en células dendríticas del receptor.

Del donante candidato del trasplante se obtiene una cantidad de leucocitos en sangre extracorpórea. Los leucocitos del donante pueden obtenerse realizando leucoféresis convencional en una cantidad de sangre extracorpórea obtenida del donante del trasplante. Los leucocitos del donante se dañan de tal manera que se vuelven apoptóticos (experimentan muerte celular programada) o necróticos. Los leucocitos del donante pueden dañarse usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, tal como por ejemplo, radiando los leucocitos del donante con radiación γ o exponiendo los leucocitos del donante a psoraleno activado por ultravioleta o porfirinas activadas por luz visible, seguido de exposición a la luz, tal como en un dispositivo de fotoféresis como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los leucocitos del donante pueden dañarse mediante fármacos citostáticos, tales como mitomicina C o ciclofosfamida o mediante fuerzas físicas, tal como presión hidrostática.

Las células dendríticas inmaduras del receptor y los leucocitos del donante inactivados se combinan y se incuban conjuntamente durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las células dendríticas del receptor procesen los leucocitos del donante inactivados y presenten antígenos a partir de los linfocitos T del donante en la superficie de las células dendríticas del receptor. Preferentemente, las células dendríticas del receptor y los leucocitos apoptóticos del donante se incuban conjuntamente durante un periodo de 12 a 24 horas. Pueden usarse tiempos de incubación más largos o más cortos, siempre que el tiempo de incubación sea suficiente para permitir que una cantidad sustancial de las células dendríticas del receptor procesen los leucocitos apoptóticos del donante. Las células dendríticas del receptor y los leucocitos apoptóticos del donante se incuban conjuntamente usando un equipo y condiciones de incubación celular convencionales. Preferentemente, la incubación se realiza aproximadamente a 37 grados centígrados, en una incubadora que contiene aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno.

Después de este periodo de incubación conjunta, que ha permitido la carga de las células dendríticas inmaduras recién formadas con antígenos de tejido donante, la maduración de las células dendríticas del receptor se trunca en una fase inmadura. Estas células dendríticas inmaduras, que llevan sobre su superficie antígenos derivados de leucocitos del donante y que son típicos del tipo del tejido donante, funcionarán (debido a su carencia en moléculas coestimuladoras) para inactivar o eliminar los linfocitos T anti-donante del receptor capaces de atacar el órgano trasplantado del donante. La maduración de las células dendríticas se trunca usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como las técnicas descritas anteriormente.

Las células dendríticas inmaduras del receptor cargadas con antígeno del donante se administran después al receptor candidato del trasplante. Las células dendríticas del receptor interaccionarán con los linfocitos T del receptor que se programarían de otra manera para atacar el órgano o tejido trasplantado. Dado que las células dendríticas del receptor presentan antígenos característicos del donante, las células dendríticas del receptor inactivarán o eliminarán los linfocitos T anti-donante del receptor, que por lo tanto no proliferarán y no atacarán el órgano o tejido trasplantado que presentan los antígenos del donante. Esto reducirá o eliminará el ataque del sistema inmunitario del receptor contra el órgano o tejido trasplantado, reduciendo o eliminando de esta manera la necesidad de fármacos inmunosupresores.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición para su uso en la supresión de la enfermedad de injerto contra huésped en un individuo que recibe una preparación de trasplante, que comprende las etapas de:

(a) tratar una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante haciendo que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico para inducir que los monocitos contenidos en la sangre se diferencien en células dendríticas;
(b) tratar las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas en una fase en la que una parte sustancial de las células dendríticas carece de moléculas coestimuladoras y puede inactivar linfocitos T que, de otra manera, atacarían al tejido sano del receptor o al tejido o a las células trasplantados;
(c) combinar las células dendríticas con una preparación de trasplante derivada del donante candidado del trasplante;
(d) incubar conjuntamente las células dendríticas del receptor candidato con la preparación de trasplante del donante del trasplante; y
(e) preparar un medicamento para administrar, al receptor candidato del trasplante, las células dendríticas y la preparación de trasplante incubadas conjuntamente.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de tratamiento de una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante comprende hacer que la sangre fluya a través de un aparato que tiene canales de plástico que presentan un diámetro de entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 5,0 mm.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de tratamiento de una cantidad de sangre extracorpórea del receptor candidato del trasplante se realiza en un aparato de Fotoféresis.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de tratamiento de las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende una de las siguientes:

(a) radiar las células dendríticas con una radiación gamma,
(b) exponer las células dendríticas a un fármaco citostático.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el fármaco citostático se selecciona entre mitomicina C y ciclofosfamida.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de tratamiento de las células dendríticas para truncar la maduración de las células dendríticas comprende exponer las células dendríticas a una citocina.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la citocina es la citocina IL-10.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células dendríticas y la preparación de trasplante se incuban conjuntamente durante un periodo de tiempo comprendido entre 12 horas y 24 horas aproximadamente.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que las células dendríticas y la preparación de trasplante o las células dendríticas y los leucocitos sanguíneos inactivados se incuban conjuntamente a una temperatura de aproximadamente 37 grados centígrados en una atmósfera gaseosa que comprende aproximadamente 5% de dióxido de carbono y aproximadamente 95% de oxígeno.