



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 320 056**

⑫ Número de solicitud: 200502664

⑬ Int. Cl.:
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **02.11.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.05.2009

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES**

⑲ Inventor/es:
**San Miguel Izquierdo, Jesús Fernando y
Pérez Simón, José Antonio**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para inducir la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos, composiciones farmacéuticas derivadas y usos de las mismas.**

㉒ Resumen:

Uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para inducir la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos, composiciones farmacéuticas derivadas y usos de las mismas.

La presente invención se refiere al uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para inducir la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos tras cultivo mixto. En particular la presente invención se refiere al uso *in vitro* de inhibidores del NF- κ B, preferiblemente inhibidores de la proteosoma y más preferiblemente bortezomib, en cultivos mixtos de linfocitos (MLR) para inducir la depleción selectiva de los linfocitos T alorreactivos y disminuir la producción de citoquinas Th1. Así como a composiciones farmacéuticas y su uso en terapia.

ES 2 320 056 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para inducir la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos, composiciones farmacéuticas derivadas y usos de las mismas.

Campo de la técnica

La presente invención se refiere al uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para inducir la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos tras cultivo mixto. En particular la presente invención se refiere al uso *in vitro* de inhibidores del NF- κ B, preferiblemente inhibidores de la proteosoma y más preferiblemente bortezomib, en cultivos mixtos de linfocitos (MLR) para inducir la depleción selectiva de los linfocitos T alorreactivos y disminuir la producción de citoquinas Th1. Así como a composiciones farmacéuticas y su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

El término de NF- κ B es una definición colectiva que hace referencia a los factores de transcripción dimérica que pertenecen a la familia Rel, y que se regulan a través de intercambios entre el citoplasma y el núcleo, en respuesta a la estimulación celular⁽¹⁾. La familia NF- κ B ha surgido como un transductor clave de señales inflamatorias que intervienen en la maduración de las células dendríticas y en la activación de los linfocitos T⁽²⁻⁴⁾. En consecuencia, las diversas vías de señalización situadas a continuación de TCR/CD3 convergen en diversos factores clave de transcripción, incluidos el NFAT, AP-1 y NF- κ B⁽⁵⁾. La activación del factor NF- κ B es esencial para las respuestas inmunogénicas de las células T, pero no para las tolerogénicas, mientras que las proteínas NFAT desempeñan funciones tanto inmunogénicas como tolerogénicas⁽⁶⁻⁹⁾. Además, el factor NF- κ B activa múltiples genes-diana, cuyos productos pueden inhibir la apoptosis, estando íntimamente vinculadas tanto la actividad anti-apoptótica como la respuesta inmunogénica⁽¹⁰⁾.

Bortezomib, un dipéptido del ácido borónico es un inhibidor potente, selectivo y reversible, de la proteasoma⁽¹¹⁻¹²⁾. La proteasoma es un complejo multienzimático presente en todas las células. Degrada las proteínas que regulan el avance del ciclo celular. Este último bloquea la translocación nuclear y la actividad transcripcional del factor NF- κ B. Bortezomib ha mostrado citotoxicidad contra una amplia gama de líneas de células tumorales humanas que expresan de forma constitutiva la actividad del factor NF- κ B^(14,15). En los linfocitos T normales, la translocación del factor NF- κ B al núcleo sólo ocurre después de contacto con TCR/CD3 y otras moléculas co-estimuladoras^(3,16), mientras que no se activa en los linfocitos T en reposo.

Uno de los principales desafíos en el trasplante de las células madre o troncales hematopoyéticas alogénicas es el de impedir la alorreactividad que lleva a la reacción del injerto frente al huésped (GVHD), sin dejar por ello de mantenerse el efecto del injerto frente a la leucemia (GVL)^(16,17). Algunos datos *in vitro* apoyan la existencia, en el interior de las células T, de alorrespuestas limitadas a determinadas líneas hematopoyéticas⁽¹⁸⁾. El bloqueo del factor NF- κ B podría llevar a la depleción de los linfocitos T activados en un cultivo de linfocitos mezclados, dirigiéndose así selectivamente a las células T alorreactivas. Además, el bloqueo del factor NF- κ B en condiciones de activación *in vitro* podría inducir una sobreexpresión de vías intracelulares alternativas, modificándose de ese modo el tipo de respuesta inmune. Es importante señalar que, en un estudio anterior, se ha descrito la demostración de que el uso de bortezomib podría prevenir la GVHD en un modelo de ratón⁽¹⁹⁾. En el presente trabajo demostramos que, en células humanas, bortezomib se dirige selectivamente a las células T alorreactivas que inducen la apoptosis a las concentraciones que se alcanzan en el entorno clínico. Además, se modifica el comportamiento de las citoquinas, ya que la droga induce una menor producción de citoquinas Th1, que son las que intervienen en el desarrollo de la reacción GVHD.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para generar la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos. En un aspecto preferido de la invención dichos inhibidores del NF- κ B son inhibidores de la proteosoma. En un aspecto aún más preferido de la invención, dicho inhibidor de la proteosoma es bortezomib.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de los inhibidores de la invención para generar la depleción selectiva de los linfocitos T alorreactivos tras cultivo mixto. En un aspecto preferido de la invención dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células mononucleadas del receptor. En un aspecto aún más preferido de la invención, dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células dendríticas del receptor. En una realización aún más preferida de la invención dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células de estirpe endotelial o epitelial del receptor.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del producto obtenido tras la utilización de los inhibidores de la invención en el cultivo mixto para la elaboración de una composición farmacéutica. En un aspecto preferido de la invención dicha composición farmacéutica se utiliza en terapia. En un aspecto más preferido de la invención dicha composición farmacéutica se utiliza en el tratamiento de trasplantes, más preferiblemente en el tratamiento de trasplantes hematopoyéticos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Inhibición del crecimiento inducido por Bortezomib en linfocitos T, evaluada por MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de la absorbancia a 570 nM, usando un espectrofotómetro que considera el 100% como el valor correspondiente de la muestra incubada sin bortezomib (0 nM). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en el crecimiento de las células entre los linfocitos T estimulados con PHA, los MLR y los controles para las diferentes concentraciones de la droga ($n=11$); cuando se cultivaban los linfocitos T con células dendríticas (DC) alogénicas irradiadas, los linfocitos T mostraban un comportamiento proliferativo intermedio entre los cultivos estimulados con PHA y con MLR ($n=9$); se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$), en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento, dentro de los linfocitos T estimulados con PHA, MLR o DC irradiadas, según la concentración de bortezomib

Figura 2: Análisis *Western blot* de la expresión de NF- κ B (A) y I κ B (B) en las células de control o las estimuladas por PHA, expuestas a bortezomib 100 nM durante diferentes periodos de tiempo.

Figura 3: Viabilidad de las células evaluadas por citometría de flujo a través de coloración con Annexin V-PE y 7-AAD: (3A) entre linfocitos T estimulados con PHA ($>70\%$ de acontecimientos CD25+ en todos los casos), la viabilidad celular disminuye significativamente cuando aumenta la concentración del fármaco; porcentaje medio (más desviación típica) de las células CD3 negativas con Annexin V PE y 7 AAD (linfocitos T viables) para las diferentes dosis de Bortezomib en muestras estimuladas con PHA: 42,13 (7,03) a 0 nM; 46,14 (9,47) a 1 nM; 35,85 (12,24) a 10 nM; 21,2 (11,9) a 100 nM y 12,87 (7,72) a 1000 nM; (3B) entre los linfocitos T en reposo sólo una minoría de las células expresan CD25 ($<3\%$ CD25+ acontecimientos en todos los casos). La viabilidad de las células evaluadas como acontecimientos negativos a la coloración con Annexin V-PE y 7-AAD no queda significativamente afectada por los incrementos en la concentración de la droga; porcentaje medio (\pm de desviación típica) de células positivas al CD3 negativo coloreadas con Annexin V PE y 7 AAD (linfocitos T viables) para las diferentes dosis de Bortezomib en muestras no estimuladas: 60,64 (6,03) a 0 nM; 65,6 (3,04) a 1 nM; 64,6 (3,37) a 10 nM; 63,21 (4,96) a 100 nM y 53,08 (4,32) a 1000 nM; (3C) Comparación del porcentaje de células positivas al CD3 y negativas a la coloración con Annexin V-PE y 7-AAD entre los linfocitos T estimulados con PHA y no estimulados (de control) a las diferentes dosis de bortezomib.

Figura 4: Las muestras fueron adquiridas con un número calibrado de Tubos Trucount^{MR} de gránulos fluorescentes (BD) a fin de calcular el recuento absoluto de células negativas a la coloración con Annexin V-PE más 7-AAD entre las células T en reposo (CD25 -) y alorreactivas (CD25 +). *Los números especificados en las figuras representan el número de gránulos de cada ensayo y los acontecimientos en la región de la Annexin V-PE más 7-AAD negativa, respectivamente.*

Figura 5: Porcentaje de linfocitos T activados, evaluado por coloración con CD69 después de MLR secundario: El porcentaje medio de los linfocitos T activados disminuyó significativamente entre las células T previamente cultivadas con bortezomib a 10 nM o 100 nM cuando se volvían a estimular con las células T del mismo donante ($p=0,05$); por el contrario, la disminución de la activación de las células T no fue significativa cuando los linfocitos T se volvieron a estimular con células T de terceros.

Figura 6: Análisis *Western blot* de la caspasa 9 (A), caspasa 3 (B) y bcl-2 (C) en células de control o estimuladas con PHA, expuestas a bortezomib 100 nM durante diferentes periodos de tiempo.

Figura 7: Muestras cultivadas con diferentes concentraciones de bortezomib +/- Z-VAD-FMK se adquirieron con un número calibrado de Tubos Trucount^{MR} de gránulo fluorescente (BD) a fin de calcular el recuento absoluto de células positivas a Annexin V-PE y/o 7-AAD usándose la ecuación siguiente: (número de acontecimientos contenidos en la región de la Annexin V-PE más 7-AAD negativa/número de acontecimientos en la región de número absoluto de gránulos) x (número de gránulos por ensayo/volumen del ensayo). *Los números especificados en las figuras representan el número de gránulos en cada ensayo y los acontecimientos en la región de la Annexin V-PE y/o 7-AAD positiva, respectivamente.* El número absoluto de acontecimientos positivos a la Annexin V-PE y/o 7 amino-actinomicina (7-AAD), que corresponden a células apoptóticas, disminuyó en una media del 11%, 29% y 49% en presencia del inhibidor de pancaspasa, después de exposición a concentraciones de 10, 100 y 1000 nM de bortezomib, respectivamente ($p < 0,05$ para 100 y 1000 nM). Cuando sólo se analizaron células positivas al Annexin V-PE se observaron valores similares.

Figura 8: (A) Expresión intracelular IFN- γ en células CD3⁺ o CD4⁺ estimuladas con PHA en presencia de diferentes concentraciones de bortezomib (se presenta uno de cinco experimentos similares) (B) Trazado en casillas de las células CD4⁺IFN⁺ para las diferentes dosis de bortezomib de las 5 muestras analizadas.

Figura 9: (A) Expresión intracelular IFN- γ en células CD3⁺CD25⁺ o CD3⁺CD4⁺CD25⁺ estimuladas con PHA en presencia de diferentes concentraciones de bortezomib (se presenta uno de cinco experimentos similares) (B) Trazado en casillas de las células CD4⁺CD25⁺IFN⁺ para las diferentes dosis de bortezomib de las 5 muestras analizadas.

Figura 10: Concentración de IL-2 en cultivos durante 48 h de sobrenadantes de células T no estimuladas o estimuladas con PHA o estimuladas con anti-CD3 más anti-CD28, incubadas en presencia de diferentes concentraciones de bortezomib.

Descripción de la invención

Uno de los principales retos que presenta el enfoque de los trasplantes alogénicos se encuentra en el control de la reacción del injerto contra el huésped, sin que se altere la eficacia del procedimiento por una disminución del efecto del injerto respecto a la leucemia. Así, se han publicado numerosos estudios que demuestran una estrecha relación entre GVHD y GVL^(16,17,22) y se encuentra actualmente en investigación el desarrollo de nuevos enfoques que permitan la separación de ambas reacciones inmunes. En este sentido, algunos datos *in vitro* sugieren que tanto GVL como GVHD se encuentran mediadas por diferentes clones de células T. Así, Michálek y colaboradores⁽¹⁸⁾ describieron la posibilidad de la depleción selectiva de clones de células T donantes alorreactivos después de un MLR unidireccional por una inmunotoxina anti-CD25, al tiempo que podían estimularse las células restantes con células leucémicas del mismo paciente. Desgraciadamente, aunque se trata de un planteamiento prometedor, el CD25 se expresa igualmente en los linfocitos T regulatorios (Treg)⁽²³⁾, y la depleción *in vivo* de estos Treg podría aumentar el riesgo de GVHD^(23,24). Con el fin de poder superar este problema, se han utilizado otros antígenos relacionados con la activación de la membrana, tales como el CD69 a fin de reducir selectivamente *in vitro* las células T alorreactivas después de MLR⁽²⁵⁾.

En esta invención, nos hemos centrado en el uso de bortezomib como un nuevo enfoque dirigido selectivamente a las células T alorreactivas. Se ha demostrado que bortezomib ejerce numerosos efectos biológicos, que incluyen el bloqueo de la activación de NF- κ B, inhibiendo así el crecimiento de diferentes tipos de tumores con aumento de la actividad NF- κ B, tales como el mieloma múltiple^{11,12}. Dado que las vías de señalización de los receptores de células T (TCR) disparan la activación de NF- κ B⁽²⁶⁾, planteamos la hipótesis de que esta propiedad pudiera promover la apoptosis mediada por bortezomib entre linfocitos T activados sin afectar al resto de células T que no expresan el NF- κ B activado. Como se demuestra en los ensayos MTT, en esta invención comprobamos que la inhibición del crecimiento inducida por bortezomib fue especialmente evidente entre los linfocitos T activados, comparados con los de control. Confirmamos que, tal como se describió anteriormente^(3,27), la expresión de NF- κ B aumenta en los linfocitos T activados, comparados con las células T en reposo, convirtiéndose así en una diana para la droga. Además, la inhibición del crecimiento estuvo relacionada principalmente con el aumento de apoptosis, evaluada por la coloración con Annexin V-PE y 7 amino-actinomicina (7-AAD) por citometría de flujo, y este efecto fue significativamente superior entre los linfocitos T alorreactivos después de MLR, como quedó confirmado además en los MLRs secundarios. Además, a pesar de que la reacción alorreactiva quedó eliminada en el MLR secundario después de exposición a la droga, este efecto fue mucho más evidente cuando los linfocitos T eran expuestos a las células de los mismos donantes, en comparación con donantes terceros, sugiriendo así una depleción muy específica de las células T alorreactivas, que permite mantener la respuesta inmune al procederse a la re-estimulación con otros antígenos.

Como se ha descrito anteriormente en diferentes tumores y líneas celulares, la expresión de varios genes anti-apoptóticos, tales como el FLIP, cIAPs, Bcl-2 o Bcl-XL, está regulado por NF- κ B⁽²⁷⁻²⁹⁾. En esta invención confirmamos que, en los linfocitos T humanos activados, bortezomib disminuye la expresión de NF- κ B. Además, bortezomib provocó la disociación o escisión de la caspasa 9 y la caspasa 3, con generación de fragmentos activos truncados. Este resultado sugiere claramente que el mecanismo de depleción selectiva de las células T estimuladas por bortezomib podría suponer la activación de cascadas proteolíticas orquestadas por caspasas. De hecho, el tratamiento con el inhibidor de pancaspasa Z-VAD-FMK previno la apoptosis inducida por bortezomib, soportando un papel esencial de las caspasas en este efecto. Por lo que se refiere a las caspasas situadas después de las proteínas, nuestros datos sugieren que el bcl-2 podría participar en este efecto proapoptótico. Así, el bcl-2 se sobre-expresó en células T activadas, en comparación con las células en reposo, como era de prever por su dependencia de NF- κ B, y el tratamiento con bortezomib causó su disociación, generándose un fragmento Mr inferior. Aunque el bcl-2 con su longitud completa es una proteína anti-apoptótica, se ha demostrado que las formas truncadas promueven la apoptosis⁽³⁰⁾. Interesa señalar que el efecto apoptótico entre los linfocitos T alorreactivos fue evidente a concentraciones de la droga que variaron de 10 a 1000 nM, que son las que se alcanzan habitualmente con las dosis estándar recomendadas actualmente en el entorno clínico. Sun y sus colaboradores publicaron un estudio previo sobre un modelo murino⁽¹⁹⁾ mostrando que bortezomib podría prevenir la enfermedad GVHD. Aunque los estudios *in vitro* que utilizaron células T de ratón mostraron también un efecto selectivo de la droga entre los linfocitos T activados, convendría señalar que las dosis de la droga fueron significativamente inferiores, variando de 1 a 4 nM⁽¹⁹⁾. Una posible explicación de estas diferencias sería la de la existencia de una diferente sensibilidad al efecto de la droga entre los linfocitos T murinos y humanos. Además, conviene señalar que, para explicar el efecto *in vivo* en la profilaxis de la GVHD, deben tenerse en cuenta no sólo el efecto en las células T activadas sino también en las células dendríticas^(2,31) y, en lo que se refiere a la profilaxis, estas últimas podrían desempeñar un papel crucial. Contrariamente a este resultado, la administración retardada de bortezomib después de trasplante alogénico da como resultado una acelerada morbilidad de la GVHD en un modelo de ratón BMT no coincidente con MHC, y esta morbilidad está relacionada en su mayor parte con la GVHD intestinal⁽³¹⁾. Según Sun y sus colaboradores, el aumento de los niveles de TNF α , IL-1 β y IL-6 fueron críticos en el desarrollo de la GVHD. En la presente invención, observamos una disminución de la secreción de citoquinas Th1 pero, es interesante el hecho de que los casos que mostraron la más elevada apoptosis de los linfocitos T activados presentaron un aumento de los niveles de IL-2 en el sobrenadante, sugiriendo que la lisis de las células T activadas inducía la liberación de citoquinas al medio. Esto podría ocurrir en ratones con GVHD en un modelo totalmente divergente con MHC. Además, bortezomib tiene una moderada toxicidad gastrointestinal⁽³²⁾ y, como hemos descrito nosotros y otros autores, la toxicidad para un órgano podría disparar la GVHD en ese órgano específico⁽³³⁾.

En cuanto a los ensayos inmunofenotípicos realizados en la presente invención, conviene mencionar que, dado que las cinéticas de los marcadores de activación de la superficie celular difieren entre sí⁽³⁴⁾, el análisis se realizó a dife-

rentes intervalos después de activación de los linfocitos. Como se indicó anteriormente, se ha utilizado CD69⁽²⁴⁾ junto con la depleción de CD25, o en lugar de la misma, a fin de evitar la depleción del Treg que podría aumentar el riesgo de enfermedad o rechazo del injerto frente al huésped. En nuestra invención, bortezomib redujo significativamente los linfocitos T alorreactivos, según se evaluó por ambos marcadores de activación precoz tales como el CD69 y el CD25, sugiriendo un papel para la purga *in vitro/in vivo* con el uso de este planteamiento.

Además de su efecto antiapoptótico, NF- κ B activa los genes-diana múltiples relacionados con la respuesta inmunogénica⁽¹⁰⁾. En este sentido, NF- κ B no sólo se activa a través de la vía de señalización TCR, sino también a través de moléculas coestimuladoras tales como CD40L o CD28⁽³⁵⁾, que se reconocen como los principales receptores que generan la plena activación de las células T. Otros factores de transcripción tales como el AP-1 y el Factor Nuclear de células T Activadas (NFAT) se disparan a continuación de la cascada de activación TCR/CD3⁽⁵⁾ pero, como aspecto interesante, podríamos señalar que esta última interviene no sólo en la respuesta inmunogénica, sino también en la tolerogénica⁽⁶⁾. Dado que se ha propuesto una competencia entre NFAT y NF- κ B para fijarse a varios genes-diana⁽³⁶⁾, bortezomib podría alterar este equilibrio, modificando así el tipo de respuesta inmune. En este sentido, en nuestro estudio, el bloqueo de NF- κ B no sólo inducía la apoptosis de las células T activadas, sino que reducía al mismo tiempo la producción de citoquinas Th1, tales como IFN- γ e IL-2, evaluada por citometría de flujo y el ensayo ELISA, indicando que bortezomib modifica el comportamiento de las citoquinas. El hecho de que pueda o no obtenerse una respuesta tolerogénica, tal como se ha descrito recientemente, con el uso de rapamicina⁽³⁷⁾ necesitará estudios adicionales, pero se ha demostrado ya que el equilibrio entre NF- κ B y otros factores de transcripción como el JNF/AP-1 desempeña un papel en la respuesta inmune a través del control de la vida y la muerte de las células dendríticas⁽³¹⁾.

Por tanto, bortezomib utilizado a las concentraciones que se alcanzan en el ambiente clínico, induce apoptosis entre los linfocitos T activados, dirigiéndose selectivamente a las células T alorreactivas después de MLR. Además, el comportamiento de las citoquinas queda también modificado por bloqueo de NF- κ B que reduce la secreción de citoquinas Th1, tales como las IFN- γ e IL-2.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de inhibidores del NF- κ B *in vitro* para generar la depleción selectiva de linfocitos T alorreactivos. En un aspecto preferido de la invención dichos inhibidores del NF- κ B son inhibidores de la proteosoma. En un aspecto aún más preferido de la invención, dicho inhibidor de la proteosoma es bortezomib. Por un lado, utilizando el bortezomib *in vivo* no existe la seguridad de que no existan células tumorales en el receptor en el momento de la administración del fármaco, lo que podría provocar una depleción no sólo de linfocitos alorreactivos sino además de linfocitos antitumorales. Es más, esta situación de persistencia de enfermedad residual antes de trasplante es bastante probable en la práctica clínica. Por el contrario, utilizando el bortezomib *in vitro* podemos realizar un cultivo mixto enfrentando linfocitos del donante con células del receptor, pudiendo seleccionar con mucha mayor seguridad células sanas del paciente no contaminadas con células tumorales, por tanto el efecto sería mucho más selectivo. Por otra parte, la utilización *in vitro* del fármaco permite dirigir su efecto citotóxico únicamente frente a los linfocitos del donante, evitando de este modo su efecto sobre otras células y tejidos sanos del receptor, como el tubo digestivo o sistema nervioso, evitando por tanto la toxicidad del fármaco, como de hecho se ha descrito en alguno de los modelos *in vivo* previamente mencionados.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de los inhibidores de la invención para generar la depleción selectiva de los linfocitos T alorreactivos tras cultivo mixto. En un aspecto preferido de la invención dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células mononucleadas del receptor. En un aspecto aún más preferido de la invención, dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células dendríticas del receptor. En una realización aún más preferida de la invención dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células de estirpe endotelial o epitelial del receptor.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del producto obtenido tras la utilización de los inhibidores de la invención en el cultivo mixto para la elaboración de una composición farmacéutica. En un aspecto preferido de la invención dicha composición farmacéutica se utiliza en terapia. En un aspecto más preferido de la invención dicha composición farmacéutica se utiliza en el tratamiento de trasplantes, más preferiblemente en el tratamiento de trasplantes hematopoyéticos.

A continuación los siguientes ejemplos y dibujos sirven para ilustrar pero no limitan la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

1.1. Cultivos celulares y ensayos de Proliferación

Por centrifugación con gradiente de densidad, se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMF) de capas leucocitarias o coágulos blancos de donantes voluntarios, con el uso de solución de Ficoll-Paque, permitiéndose su adherencia al disco de cultivo tisular (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Al cabo de 2 horas a 37°C, se

recogieron las células que no se habían adherido, se lavaron y se volvieron a suspender en medio de cultivo formado por RPMI 1640 L-glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (10 mg/mL) más un 10% de suero humano tipo AB (Sigma). Se eliminaron más del 90% de los monocitos/macrófagos controlado por citometría de flujo (datos no ilustrados) y las células T se volvieron a purificar con el uso de gránulos magnéticos anti-CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), si era preciso.

Con el fin de generar células dendríticas, las células adheridas se cultivaron durante 7 días, incubándose a 37°C con un 5% de CO₂ en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (10 mg/mL) más un 10% de suero humano de tipo AB. Al primer vial de cultivo se añadieron GM-CSF 1000 U/mL (PeProtech) más IL-4 1000 U/mL (R&D System), y para las 48 últimas horas de cultivo se añadió TNF α 20 ng/mL (R&D System). Se efectuó el análisis fenotípico, a fin de asegurar una pureza de las células dendríticas de la muestra superior al 90%, con el uso de mAbs CD3 conjugado a FITC, CD56, CD14, CD19 (Kit de Exclusión para estudios de células dendríticas, Cytognos) mAbs CD80 conjugado a PE, CD86 (BD Pharmingen), tal como se ha descrito previamente ⁽²⁰⁾.

Se evaluó el efecto inhibitor de bortezomib en el crecimiento celular, midiéndose la absorbancia, por parte de las células, del colorante de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil-tetrazolio (MTT). Para ello, 10⁵ células/100 μ L se colocaron en triplicado en discos de cultivo tisular de 96 pocillos en medio de cultivo sin bortezomib (proporcionado amablemente por Millenium Pharmaceuticals Inc) p a dosis crecientes de la droga: 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM. Los días primero o tercero del cultivo, se añadió Bortezomib, a fin de permitir la activación de las células T. El quinto día se evaluó la absorbancia del colorante MTT. Para todas estas concentraciones de la droga, los linfocitos se cultivaron en las condiciones siguientes: (a) medio de cultivo solo (control); (b) medio de cultivo más Fitohemaglutinina (PHA, 5 μ g/mL); (c) medio de cultivo más anti-CD3 fijado a las placas (5 μ g/mL) en combinación con anti-CD28 soluble (2,5 μ g/mL); (d) medio de cultivo más 0,5 x 10⁵ linfocitos T alogénicos irradiados (15 Gy). Por último, y sólo para ensayos de proliferación, se cultivaron también linfocitos en el medio de cultivo más células dendríticas (DC) alogénicas irradiadas en una proporción de 1:10. Aunque los ensayos de proliferación se efectuaron en todos los casos analizados, los resultados descritos en el resto de los estudios expuestos en este artículo se repitieron en un mínimo de 5 casos, según el número de células necesarias para cada experimento.

Unos linfocitos T, co-cultivados durante cinco días, con o sin bortezomib, más linfocitos T alogénicos irradiados se volvieron a estimular en cultivos MLR secundarios, utilizándose linfocitos T obtenidos del mismo donante o de un tercero. A los linfocitos mezclados MLF secundarios no se añadió bortezomib. Setenta y dos horas después de iniciado el cultivo secundario se efectuó el análisis inmunofenotípico de los marcadores de activación.

1.2 Análisis inmunofenotípico y coloración de las Citoquinas

5x10⁵ linfocitos no adheridos/pocillo se sembraron en placas de 48 pocillos, cultivándose, y se cultivaron en el medio solo o estimulado con PHA (5 μ g/ml), anti-CD3 fijado a la placa (5 μ g/ml) más anti-CD28 soluble (2,5 μ g/ml) o bien 2,5x10⁵ linfocitos T alogénicos irradiados (15 Gy). El día 0 se añadieron concentraciones diferentes de bortezomib (0, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM) (para evaluación del antígeno a las 24 horas) o el tercer día del cultivo (para ensayos a los cinco días). Las células se analizaron por inmunofluorescencia directa con el uso de coloración de cuatro colores, con MoAbs conjugado con los fluorocromos siguientes: Fluoresceína FITC), Ficoeritrina (PE); peridín clorofil - protein-Cianina 5 (PerCP-Cy5) y alo-ficocianina (APC). Los anticuerpos específicos fueron adquiridos a BD Bioscience Pharmingen, exceptuado el anti-CD25-PE, proporcionado por Immunotech. Se utilizaron las combinaciones siguientes: anti-CD3-FITC/anti-CD25-PE/anti-CD4-PerCP-Cy5/anti-CD40L-APC; anti-CD25-FITC/IFN-PE anti-citoplásmico/anti-CD8-PerCP-Cy5.5/anti-CD4-APC; anti-CD25-FITC/anti-CD69-PE/anti-CD8-PerCP-Cy5.5/anti-CD4-APC; anti-CD69-FITC/anti-citoplásmica granzima/anti-CD8-PerCP-Cy5.5/anti-CD3-APC; brevemente, para coloración superficial se incubaron 100 μ L de muestra/tubo durante 30 minutos con la combinación adecuada de MoAb a temperatura ambiente (RT) en ambiente oscuro. Las células se centrifugaron (5 min a 540 g) y los gránulos se lavaron con 4 mL de PBS. Por último, las células se volvieron a suspender en 0,5 mL de PBS hasta que se analizaron el citómetro de flujo. Para coloración de la citoquina intracelular, se añadió brefeldina A (10 μ g/mL) durante las cuatro últimas horas antes de la retirada. Se efectuó la detección intracelular de IFN- γ , después de coloración para las proteínas superficiales, con el uso de una técnica de inmunofluorescencia directa. Para ello, se utilizó el Kit IntraStain (Dako Cytomation, Dinamarca), siguiéndose escrupulosamente las recomendaciones del fabricante. Después de coloración de los antígenos intracitoplásmicos, las células se lavaron y se volvieron a suspender en 0,5 mL de PBS hasta su análisis en el citómetro de flujo. La adquisición de los datos se efectuó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD, San José, CA), con el uso del programa de software CellQuest (BD), analizándose con el software Paint-A-Gate Pro (BD), exceptuado el análisis del IFN- γ intracelular, en el que se utilizó el software Cell-Quest. Las muestras fueran adquiridas y analizadas a intervalos diferentes después de la activación de los linfocitos, teniendo en cuenta la cinética de los marcadores superficiales de las células ⁽²¹⁾.

1.3. ELISA

Para el ensayo de liberación de IL-2, unos linfocitos no adheridos se sembraron como se ha descrito arriba para análisis inmunofenotípico. A comienzos del cultivo se añadieron diferentes concentraciones de bortezomib. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂, y, al cabo de 48 h, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de IL-

2 con el uso de un ensayo inmunosorbente vinculado a Enzimas, comercialmente disponible (ELISA) (Diacclone, Besancon Cedex, Francia).

1.4 Evaluación de la apoptosis

Para la detección de la apoptosis, se efectuaron cultivos celulares tal como se ha descrito anteriormente en la selección sobre análisis inmunofenotípico, utilizándose el kit de detección de apoptosis Annexin V-PE/7 amino-actinomicina de BD Pharmingen. Para exponerlo brevemente, se lavaron un mínimo de $0,5 \times 10^6$ linfocitos T y se volvieron a suspender en Tampón Aglutinante (1:10 diluido en PBS), manteniéndose una concentración de células de 1×10^6 /mL. Se añadieron tanto Annexin V-PE como 7 amino-actinomicina (7-AAD) 5 uL durante 15 minutos. Con el fin de identificar los linfocitos T activados, se añadió igualmente anti-CD25-FITC. Para cada condición, se recogieron y analizaron 50.000 acontecimientos. Se calculó el porcentaje de Annexin V-PE más 7-AAD de linfocitos negativos con el uso del software Paint-A-Gate Pro (BD).

En otra serie de experimentos, se aislaron células dendríticas CD25+ al cabo de tres días de un cultivo de linfocitos mezclados por medio de selección positiva con microgránulos magnéticos anti-CD25 directamente conjugados ($5 \text{ uL}/10^7$ células; Miltenyi Biotec, Auburn, CA) purificándose en una columna LS+. La fracción negativa de las células CD25 se coloreó posteriormente con el uso de microgránulos magnéticos anti-CD3 recubiertos con mAb ($10 \text{ uL}/10^7$ células; Miltenyi Biotec) aplicándose a una segunda columna magnética. Después de purificación, se añadió bortezomib a concentraciones diferentes a los linfocitos CD25 positivos y negativos durante 48 horas, efectuándose la evaluación de la apoptosis en ambas fracciones tal como anteriormente se ha especificado. Para evaluar además el número absoluto de Annexin V-PE más células negativas 7-AAD dentro de las diferentes subpoblaciones de células, en 5 casos las muestras fueron adquiridas simultáneamente con el uso de Tubos Trucount^{MR} (BD), que contienen un número calibrado de micro-gránulos fluorescentes. A continuación se efectuó el recuento absoluto de Annexin V-PE más 7-AAD de células negativas con el uso de la siguiente ecuación: (número de acontecimientos en la región que contiene Annexin V-PE más células negativas 7-AAD/número de acontecimientos en la región de recuento absoluto de gránulos) x (número de gránulos por ensayo/volumen del ensayo). Finalmente, con el fin de evaluar el papel de la activación de la caspasa en la apoptosis inducida por bortezomib, se añadió el inhibidor de pancaspasa Z-VAD-FMK (20 uM) (Sigma) una hora antes de añadirse bortezomib a las muestras cultivadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de la droga. Por último se calculó del Z-VAD-FMK en el recuento absoluto de Annexin V-PE y/o de células positivas 7-AAD.

1.5 Análisis Western Blot

10^6 células se sembraron en frascos de 25 cm^2 (Corning, NY), sin estimulación o bien estimuladas con 5 ug/ml PHA durante 24 h. A continuación, se añadieron medios de cultivo o bortezomib 100 nM durante 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 horas. Las células se lavaron a continuación con PBS (Gibco) y se lisaron en tampón de lisis enfriado en hielo (NaCl 140 mM , 10 mM EDTA, 10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, Tris 20 mM a un pH de 7,0, 1 uM de pepstatina, 1 ug/ml de aprotinina, 1 ug/ml de leupeptina, ortovanadato sódico 1 mM). Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. a 4°C y durante 10 minutos, recogiendo los sobrenadantes. Los extractos de células se sometieron a SDS/PAGE al 10% y se secaron sobre la membrana de PVDF (Miliporos). Las membranas se incubaron con anti-IkB α (1:2000), anti-NF- κ B p65 (1:2000) (ambos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.), bcl-2 (1:2000), caspasa 3 (1:30.000) y caspasa 9 (1:1000) (de BioSciences). Los anticuerpos del primer paso fijados a la membrana se hicieron reaccionar con anti-conejo (Bio-Rad) o anti-ratón (Amersham, Pharmacia) conjugados a peroxidasa de rábano picante, y las bandas se visualizaron con un sistema de detección basado en luminol con intensificación por p-yodofenol⁽¹⁵⁾.

1.6 Análisis estadístico

Para cada variable, se calcularon los valores medios y su desviación típica (SD) así como el rango y la mediana, con el uso del programa de software (SPSS 11.0, Chicago IL). La comparación entre grupos se realizó por análisis de varianza (y a continuación se efectuaron los ensayos de Scheffé y Tukey para confirmar las diferencias entre grupos). Se realizó una Medición Bidireccional de Análisis Múltiple Repetido (MR-MANOVA bidireccional) a fin de comparar el efecto de las diferentes dosis de la droga dentro de los distintos tipos de cultivo. Los valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados significativos.

Ejemplo 2

Resultados

2.1 Las células T activadas muestran un aumento de la sensibilidad al bortezomib

Para investigar si bortezomib afectaba a la proliferación o supervivencia de los linfocitos T, se efectuaron ensayos MTT con linfocitos T en reposo, estimulados con PHA o estimulados con MLR. El tratamiento con bortezomib disminuyó la absorción de MTT, especialmente a concentraciones de 10 nM y superiores (figura 1). Es interesante

señalar que la sensibilidad a bortezomib resultó ser claramente superior en las células T estimuladas con PHA o MLR, si se comparaban con las células T en reposo, tal como indicaron las inclinaciones de las curvas de absorción de MTT. Además, cuando se cultivaron linfocitos T en presencia de células dendríticas (DC), la velocidad de proliferación mostró valores intermedios entre PHA y MLR, y la inhibición del crecimiento en presencia de la droga presentó igualmente valores intermedios entre PHA y MLR (figura 1).

La actividad NF- κ B se controla por la interacción con su inhibidor, I κ B. Este último, a su vez, se regula por fosforilación, que se dirige al I κ B para destrucción proteolítica. A fin de evaluar el efecto de bortezomib en la degradación de I κ B y la expresión de NF- κ B, se cultivaron células T en reposo o estimuladas con PHA. Al cabo de 24 h, se añadió bortezomib y se dejó actuar durante diferentes periodos de tiempo. El análisis *Western blot* confirmó que las células T estimuladas con PHA sobreexpresaron el NF- κ B, comparados con la de control (figura 2A). Además, bortezomib indujo una disminución de la expresión de NF- κ B dentro de los linfocitos T estimulados, y este efecto fue más evidente mientras aumentaba el periodo de incubación. Confirmó igualmente que, en células T estimuladas con PHA, el I κ B se degrada, mientras que la adición de bortezomib inducía la acumulación de formas fosforiladas de I κ B (Figura 2B).

2.2. Bortezomib disminuye la viabilidad de las células T activadas o alorreactivas

Para analizar si la disminución de absorción de MTT en respuesta a bortezomib se debía a una mayor muerte de las células, investigamos el efecto de la droga en los linfocitos T, utilizando coloración con Annexin V-PE y 7 amino-actinomicina (7-AAD) por citometría de flujo. Como puede verse en la Figura 3A, el porcentaje de acontecimientos negativos al Annexin V-PE y a la 7 amino-actinomicina (7-AAD), que corresponden a linfocitos T viables, disminuyó significativamente en las muestras estimuladas con PHA a concentraciones de la droga inferiores a 10 nM. Por el contrario, en las células T no estimuladas, la viabilidad sólo quedó escasamente afectada por bortezomib (figura 3B). Además, cuando comparamos el efecto de bortezomib entre los linfocitos T en reposo y estimulados con PHA, aumentó las diferencias en términos de viabilidad de las células entre ambos subgrupos cuando se aumentaban las dosis de la droga (figura 3C). Una observación importante es la de que estas diferencias en términos de viabilidad se observaron igualmente entre linfocitos T a los reactivos y en reposo en MLR. Así, al cabo de tres días de un cultivo de linfocitos mezclados, se cultivaron linfocitos T positivos a CD25 (aloneactivos) y negativos (en reposo), separados por clasificación de las células activadas magnéticamente, en presencia de diferentes concentraciones de bortezomib. Con el fin de cuantificar con exactitud el número de células viables en ambas subpoblaciones, las muestras se analizaron por citometría de flujo con el uso de tubos TruCount^{MR}, con gránulos fluorescentes, tal como se especifica en M&M. Es interesante señalar que, como puede verse en la figura 4, la viabilidad de los linfocitos T disminuyó significativamente en el subconjunto de células T con CD25+, mientras que el número de linfocitos T viables permaneció prácticamente constante dentro del grupo de células T negativas a CD25 a diferentes concentraciones de la droga. Así, el porcentaje medio de viabilidad de las células T fue del 75% frente al 95% ($p=0,3$) entre los linfocitos T CD25+ y CD25- cultivados a 10 nM mientras que fue del 55% frente al 93% ($p=0,003$) a una concentración de 100 nM. Debido al escaso número de acontecimientos restantes dentro de la subpoblación de células CD25+ a dosis superiores de bortezomib, el análisis sólo pudo realizarse en 2 casos a 1000 nM. En consecuencia, confirmamos que los linfocitos T activados se hacen susceptibles al efecto citotóxico de la droga mientras que la viabilidad de los linfocitos T en reposo no queda gravemente afectada por bortezomib.

Para confirmar adicionalmente la depleción selectiva de las células T alorreactivas después de MLR, se efectuaron reacciones MLR secundarias con el uso, como células efectoras, de linfocitos T previamente cultivados con o sin bortezomib y, como células estimulantes, linfocitos T irradiados procedentes del mismo donante utilizado en la reacción MLR primaria o de un donante tercero. El porcentaje medio de células T activadas en la MLR secundaria, evaluado por la expresión de CD69, fue del 7,3% entre las células T que no habían sido previamente expuestas a bortezomib y del 6,1% y del 3,8% entre las cultivadas previamente con bortezomib a 10 nM y 100 nM, respectivamente, con $p=0,8$. Es interesante observar que, cuando analizamos separadamente la expresión de CD69 después de la reacción MLR secundaria entre linfocitos T co-cultivados con células T estimulantes del mismo donante, comprobamos que el porcentaje medio de células T CD69-positivas era del 7,1%, 4,1% y 2,9% entre los linfocitos T cultivados previamente sin bortezomib o a una dosis de 10 nM y 100 nM de la droga, respectivamente ($p=0,05$). Por el contrario, cuando se utilizaban células de un donante tercero en las MLR secundarias como células estimuladoras, estas cifras fueron del 7,5%, 7,6% y 4,7% ($p=0,5$) (figura 5), indicando así no sólo la apoptosis selectiva de los linfocitos T a los reactivos sino también una depleción altamente específica de los linfocitos T a los reactivos contra los antígenos del donante primario. Cuando la activación se evaluó a través de la expresión de CD25, se obtuvieron valores similares (datos no ilustrados).

2.3 Mecanismos de la apoptosis inducida por bortezomib en los linfocitos T activados

Con el fin de analizar los mecanismos de la apoptosis inducida por bortezomib entre linfocitos T activados o alorreactivos, realizamos el análisis *Western blot*, evaluando el efecto de la droga en la activación de las caspasas, y la expresión de los factores antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia bcl-2. Para ello, se cultivaron células T no estimuladas o estimuladas con PHA, añadiéndose bortezomib y permitiéndosele actuar durante diferentes periodos de tiempo. Como se ilustra en las figuras 6A y B, la activación de las caspasas 9 y 3, tal como indica la presencia de subfragmentos disociados, se observó entre los linfocitos T activados expuestos a bortezomib durante 6 y 24 horas,

respectivamente. La activación de la caspasa 9 precedió a la de la caspasa 3, como era de esperar, ya que la primera se encuentra en posición anterior a la caspasa 3 (la activación de la caspasa 8 fue difícil de evaluar, ya que estas células expresaron bajas cantidades - datos no ilustrados). Es interesante el hecho de que la expresión de bcl-2 aumentara entre los linfocitos T activados, en comparación con las células T en reposo. La adición de bortezomib provocó una disminución de bcl-2 simultáneamente con la aparición de una forma Mr inferior, resultado de la disociación de bcl-2, tal como puede observarse en la figura 6C. Estos resultados sugirieron que la activación de las caspasas y la degradación subsiguiente del bcl-2 podrían mediar la apoptosis inducida por bortezomib entre los linfocitos T activados.

Para evaluar si la apoptosis inducida por bortezomib entre las células T estimuladas dependía o no de la activación de la caspasa, se añadió el inhibidor de pancaspasa Z-VAD-FMK a linfocitos T expuesto a la droga durante 24 horas. Como se ilustra en la figura 7, el Z-VAD-FMK rescató las células T de la apoptosis inducida por bortezomib.

2.4 Bortezomib modifica el comportamiento de los marcadores de activación y de la secreción de citoquinas

Hasta ahora hemos demostrado que bortezomib induce la muerte celular, particularmente entre linfocitos T activados. Dado que bortezomib regula el NF- κ B, y este último interviene en la activación de los genes-diana vinculada no sólo a la actividad anti- apoptótica sino también a la respuesta inmunogénica, quisimos evaluar igualmente si el bortezomib podría o no modificar el modelo de activación y de secreción de citoquinas dentro de las células T activadas viables restantes. En primer lugar, analizamos la intensidad de la expresión de los marcadores de activación de células T CD25 y CD69, en presencia o ausencia de bortezomib. Como se presenta en la tabla 1, el canal de fluorescencia media (MFC) de CD25 entre células T activadas disminuyó con la adición de bortezomib de manera dependiente de la dosis. Además, en cultivos estimulados con PHA y CD3/CD28, observamos una disminución significativa del MFC del CD69, así como una reducción del porcentaje de linfocitos T CD69⁺, que varió de un 60% a 1 nM a un 48% a 1000 nM.

Además, evaluamos la expresión intracelular de IFN- γ , así como el porcentaje de disminución de los linfocitos T IFN- γ -positivos por un aumento de las dosis de bortezomib, siendo el porcentaje medio (rango) de células INF+CD4⁺ del 11,42% (0,22-24,01%), 8,97% (0,4-18,97%), 3,39% (0,38-7,12%) y 1,2% (0,23-2,07%) en muestras cultivadas sin bortezomib o una concentración de la droga de 10 nM, 100 nM y 1000 nM, respectivamente (p=0,06, figura 8A y B). Por otra parte, entre los linfocitos T activados identificados por su pauta FSC/SSC así como por la expresión de CD25, el número de células T IFN-positivas disminuyó también significativamente con un porcentaje medio (rango) de linfocitos T CD25+IFN⁺ del 32,88% (28,41-37,36%), 20,87% (15,45-26,3%) y 3,49% (3,06-3,93%) entre muestras cultivadas sin bortezomib o a una concentración de 10 nM y 100 nM de la droga, respectivamente (p=0,033, figura 9A y B). Además, en relación con los linfocitos T CD8⁺, el porcentaje medio de células activadas varió entre el 21,2% (5,7-53,17%), el 5% (2,3-8,6%) y el 1,7% (0-4,3%) de células CD8+CD25⁺ para cultivos sin bortezomib o a una concentración de 10nM y 100nM, respectivamente, (p=0,06), mientras que estas cifras fueron del 39,3% (26,5-62,5%), del 23,7% (8,5-34,6%) y del 9,8% (0-20,4%) para los linfocitos T CD8+granzima⁺, respectivamente, (p=0,003).

Finalmente, en 9 casos, se realizaron los ensayos ELISA y observamos que los niveles de IL-2 disminuían en los sobrenadantes de los cultivos cuando se aumentaba la concentración de bortezomib, como puede verse en la figura 10. Conviene mencionar que en muestras activadas por 3 PHA, en las que se ensayó la concentración de 1000 nM, se halló en el sobrenadante un aumento de nivel de citoquinas. Es interesante señalar que estos casos son los que mostraban la más importante apoptosis de los linfocitos T, sugiriendo que la lisis de las células T activadas inducía la liberación al medio de citoquinas.

Así pues, bortezomib no sólo redujo el número de linfocitos T activados viables sino que modificó igualmente la activación y el comportamiento de las citoquinas entre las células T activadas restantes.

TABLA I

	Muestras estimuladas por PHA		
	% CD3+CD25+ células restantes	CD25 MFC entre células T activadas restantes	CD69 MFC entre células T activadas restantes
Bortezomib 0 nM	90	971	207
Bortezomib 10 nM	82	929	230
Bortezomib 100 nM	73*	771*	200

Bortezomib 1000 nM	69*	642*	174*
	Muestras estimuladas con α CD3/ α CD28		
	% CD3+CD25+ células restantes	CD25 MFC entre células T activadas restantes	CD69 MFC entre células T activadas restantes
Bortezomib 0 nM	64	555	276
Bortezomib 10 nM	56	433	256
Bortezomib 100 nM	34*	208*	201
Bortezomib 1000 nM	5*	85*	166*

Intensidad de la expresión de CD25 y CD69 evaluada como canal de fluorescencia media (MFC) entre linfocitos T activados. (*) $p < 0.05$ comparado con el valor respectivo de las muestras sin bortezomib

1- **Ghosh S, May M, Koppp E.** NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators to immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260, 1998

2- **O'Sullivan B, Thomas R.** CD40 ligation conditions dendritic cells antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B. *J Immunol* 168: 5491-5498, 2002

3- **Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga S et al.** Essential role of NF- κ B inducing kinase in T cell activation through the CDR/CD3 pathway. *J Immunol* 169: 1151-1158, 2002

4- **Andreaskos E, Smith C, Monaco C et al.** I κ B kinase 2 but not NF- κ B inducing kinase is essential for effective DC antigen presentation in the allogeneic mixed lymphocytes reaction. *Blood* 101: 983-991, 2003

5- **Jun J, Goodnow C.** Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nature Immunol* 4 (11): 1057-1064, 2003

6- **Masuda E, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N.** Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal* 10: 599-611, 1998

7- **Macian F et al.** Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109: 719-731, 2002

8- **Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T et al.** In vivo anergized CD4+ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 979-984, 1996

9- **Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A.** An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 273(5280):1325, 1996

10- **Karin M, Lin A et al.** NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227, 2002

11- **Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella V, Elliot P, Adams J, Anderson K.** The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research* 61: 3071-3076, 2001

12- **Li B, Dou Q.** Bax degradation by the ubiquitin/proteasome dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 3835-3855, 2000

13- **Palombella V, Rando O, Goldberg A, Maniatis T.** The ubiquitin proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78: 773-785, 1994

14- **Mitsiades N, Mitsiades C, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC.** Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99 (11): 4079-4086, 2002

15- **Esparis-Ogando A, Alegre A, Aguado B, Mateo G, Gutiérrez N, Blade J, Schenk D, Pandiella A, San Miguel JF.** Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias. *Int J Cancer* 114(4):665-7, 2005

16- **Martino R, Caballero D, Pérez-Simón JA et al.** Evidence for a Graft-versus-leukemia Effect after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Reduced-intensity Conditioning in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndroms. *Blood* 100 (6): 2243-2245, 2002

17- **Pérez-Simón JA, Martino R, Alegre A et al.** Chronic but not acute Graft versus host disease improves outcome in multiple myeloma patients after nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Br J Hematol* 121: 104-108, 2003

18- **Michalek J, Collins RH, Durrani HP et al.** Definitive separation of graft versus leukemia and graft versus host specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Nat Acad Sci USA* 100 (3): 1180-1184, 2003

19- **Sun K, Welniak L, Panoskaltsis-Mortari A et al.** Inhibition of acute graft versus host disease with retention of graft versus tumor effects by the proteasome inhibitor Bortezomib. *Proc Nat Acad Sci USA*, 101 (21): 8120-8125, 2004

20- **Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sánchez ML, Cañizo MC, Fernández ME, Vaquero JM, Laso FJ, Escribano L, San Miguel JF.** Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHCII+/lineage-cells. *Clin Exp Immunol.* 1999 dec; 118(3):392-401.

21- **Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis H, Prabhakar U.** Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods* 293: 127-142, 2004

22- **Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen A, Bandini G, Devergie A, Schattenberg A, Frassoni F, Guglielmi C, Iacobelli S, Michallet M, Kolb H, Ruutu T, Niederwieser D.** Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood* 100: 3877 - 3886, 2002

23- **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chain (CD25): breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1996

24- **Martin PJ, Pei J, Gooley T, Anasetti C, Appelbaum F, Deeg J, Hansen J, Nash J, Petersdorf E, Storb R, Ghetie V, Schindler J, Vitetta E.** Evaluation of a CD25-specific immunotoxin for prevention of graft-versus-host disease after unrelated marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 10 (8): 552-560, 2004

25- **Davies JK, Koh MB, Lowdell MW.** Antiviral immunity and T-regulatory cell function are retained after selective alloreactive T-cell depletion in both the HLA-identical and HLA-mismatched settings. *Biol Blood Marrow Transplant* 10 (4): 259-68, 2004

26- **Weil R, Israel A.** T-cell receptor and B-cell receptor mediated activation of NF- κ B in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 16: 374-381, 2004

27- **Barkett M, Gilmore TD.** Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924, 1999

28- **Catz SD, Jonson JL.** Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor κ B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20: 7342-7351, 2001

29- **Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW.** Suppression of tumor necrosis factor induced cell death by inhibitor of apoptosis cIAP2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10057-10062, 1997

30- **Monney L, Otter I, Olivier B, Ozer H, Haas A, Omura S, Borner C.** Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by bcl-2. *J Biol Chemistry* 273: 6121-6131, 1998

31- **Kriehuber E, Bauer W, Charbonnier AS, Winter D, Amatschek S, Tamandl D, Schweifer N, Stingl G and Maurer D.** The balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* (in press)

32- **Sun K, Wilkins D, Anver M, Sayers T, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar B, Welniak L, Murphy W.** Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft versus host disease: delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood* (in press)

33- **Pérez-Simón J A, Díez-Campelo M, Martino, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, de León A, Valcarcel D, Carreras E, Cañizo MC, Sierra J, San Miguel J.** Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft versus host disease after allogeneic transplantation. *Br J Hematol* 130(3):394-403, 2005

ES 2 320 056 A1

34- **Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis H, Prabhakar U.** Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*, 293: 127-142, 2004

5 35- **Zhou X, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Ryeon W, Abe R, Hamaoka T, Naramura M, Gu H, Fujiwara H.** Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol* 168: 3347-3854, 2002

10 36- **Rao A, Luo C, Hogan P.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Ann Rev Immunol* 15: 707-747, 1997

37- **Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG.** Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Blood* (in press)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Composición que comprende un cultivo mixto de linfocitos T obtenida tras generar la depleción selectiva “*in vitro*” de aquellos linfocitos T alorreactivos con Bortezomib, para su uso como medicamento.

2. Composición según la primera reivindicación, donde dicho cultivo mixto comprende linfocitos T del donante y células mononucleadas del receptor.

10 3. Composición según la primera reivindicación, donde dicho cultivo mixto comprende linfocitos T del donante y células dendríticas del receptor.

4. Composición según la primera reivindicación, donde dicho cultivo mixto comprende linfocitos del donante y células de estirpe endotelial o epitelial del receptor.

15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el tratamiento de trasplantes.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de trasplantes hematopoyéticos.

FIG 1

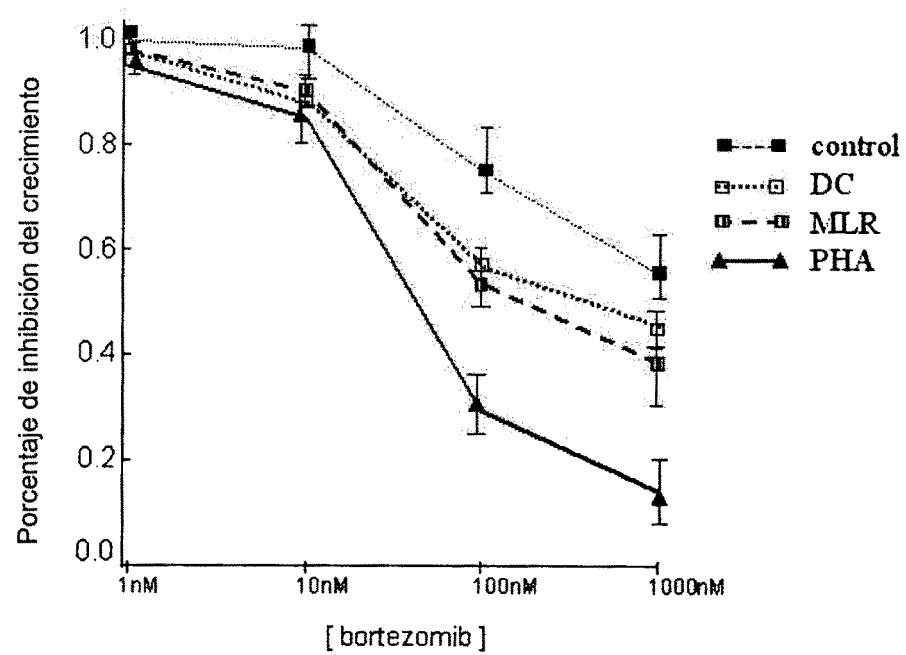


FIG 2

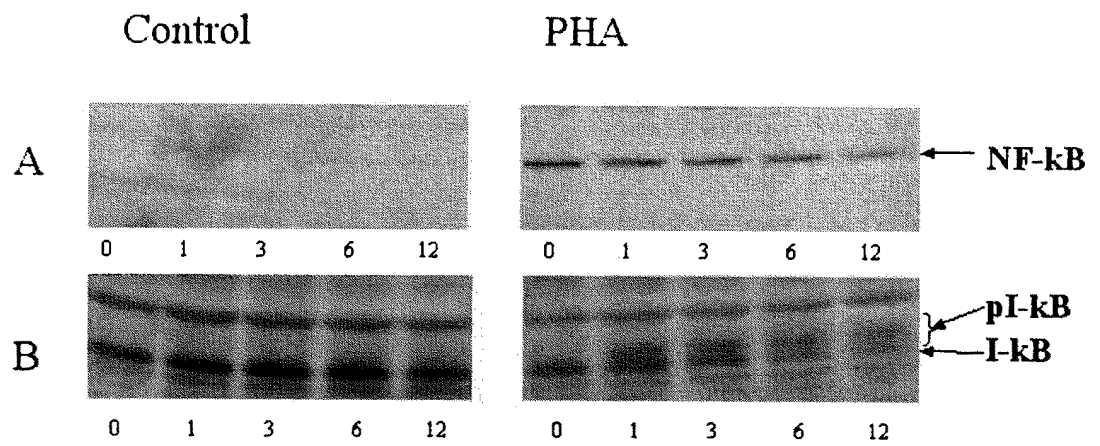


FIG 3A

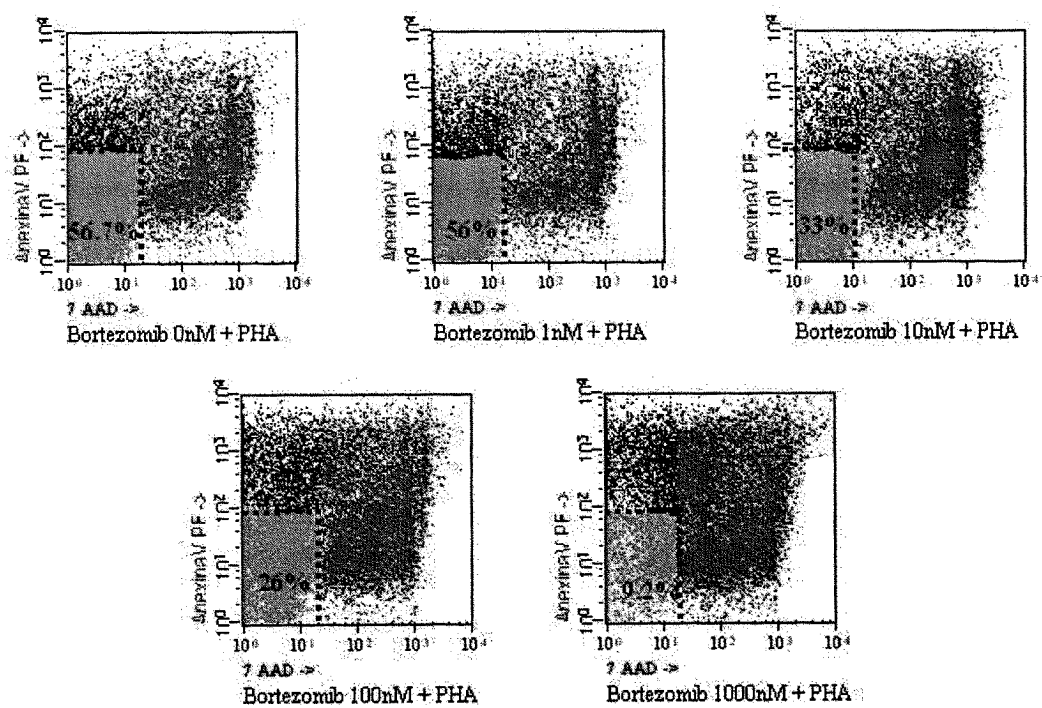


FIG 3B

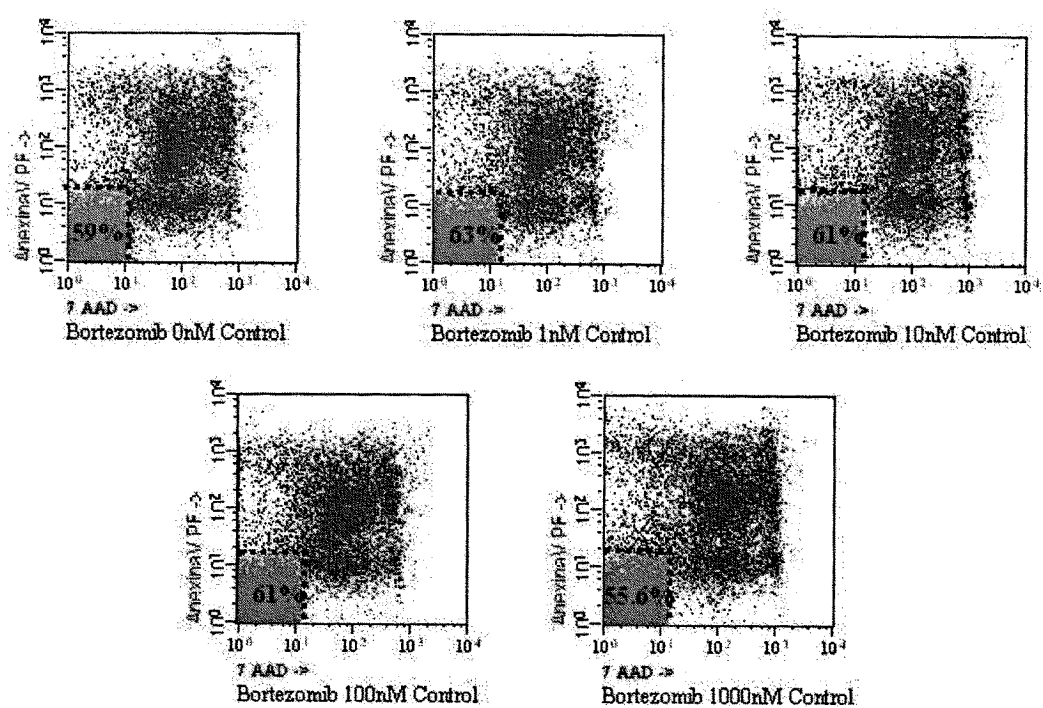


FIG 3C

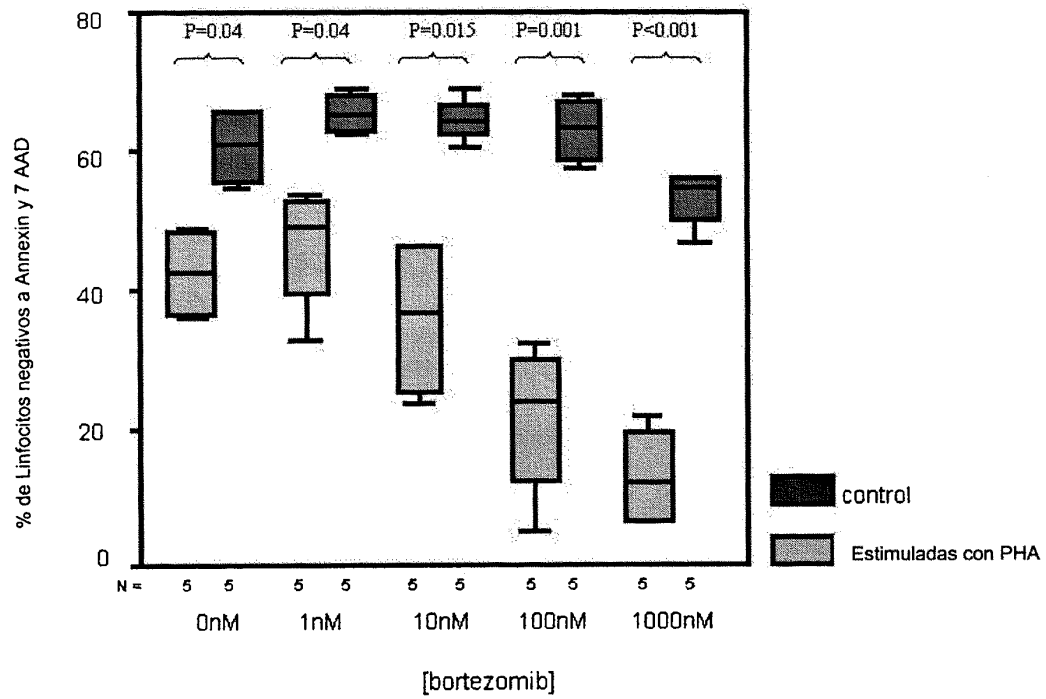


FIG 4

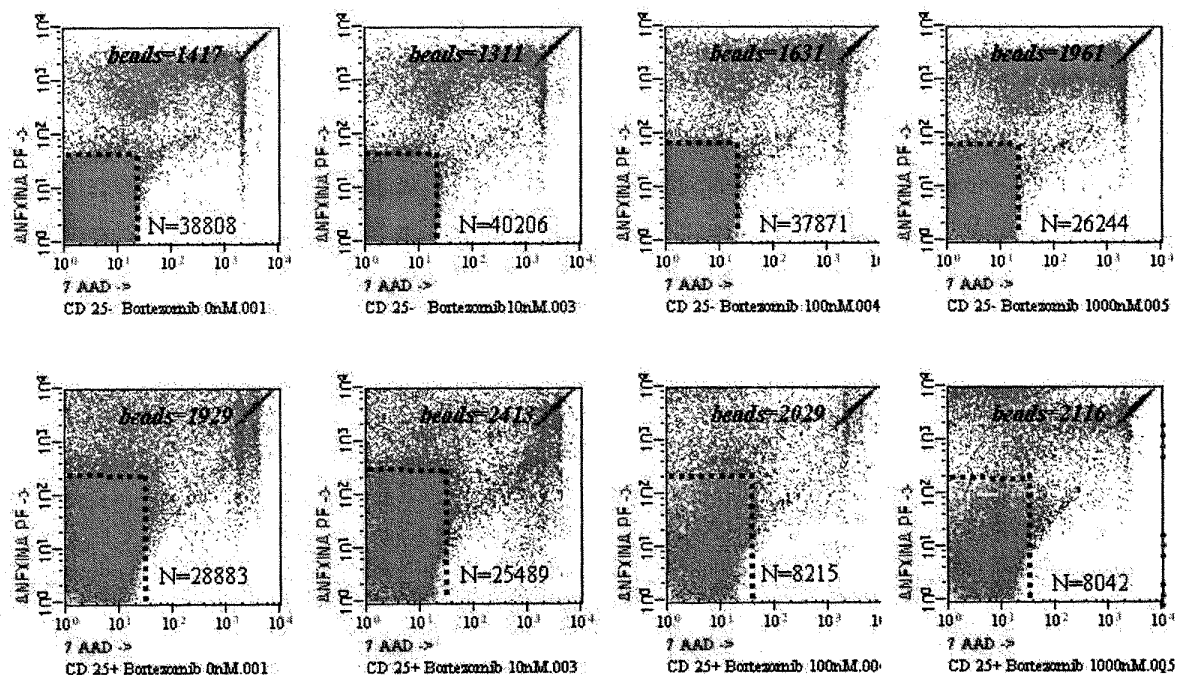


FIG 5

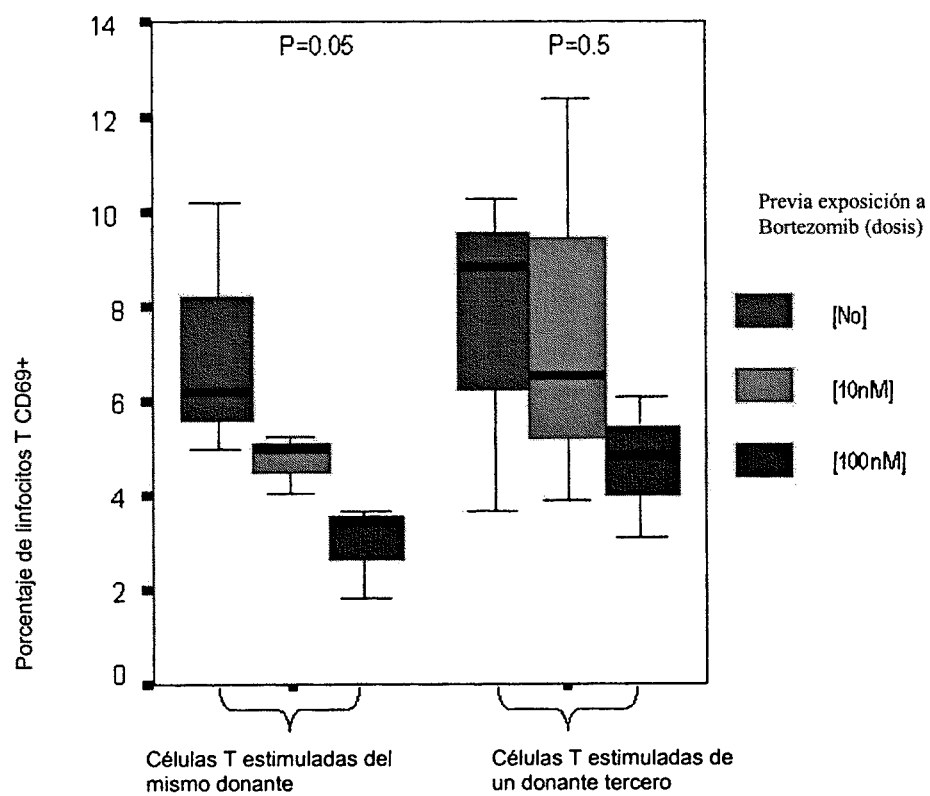


FIG 6

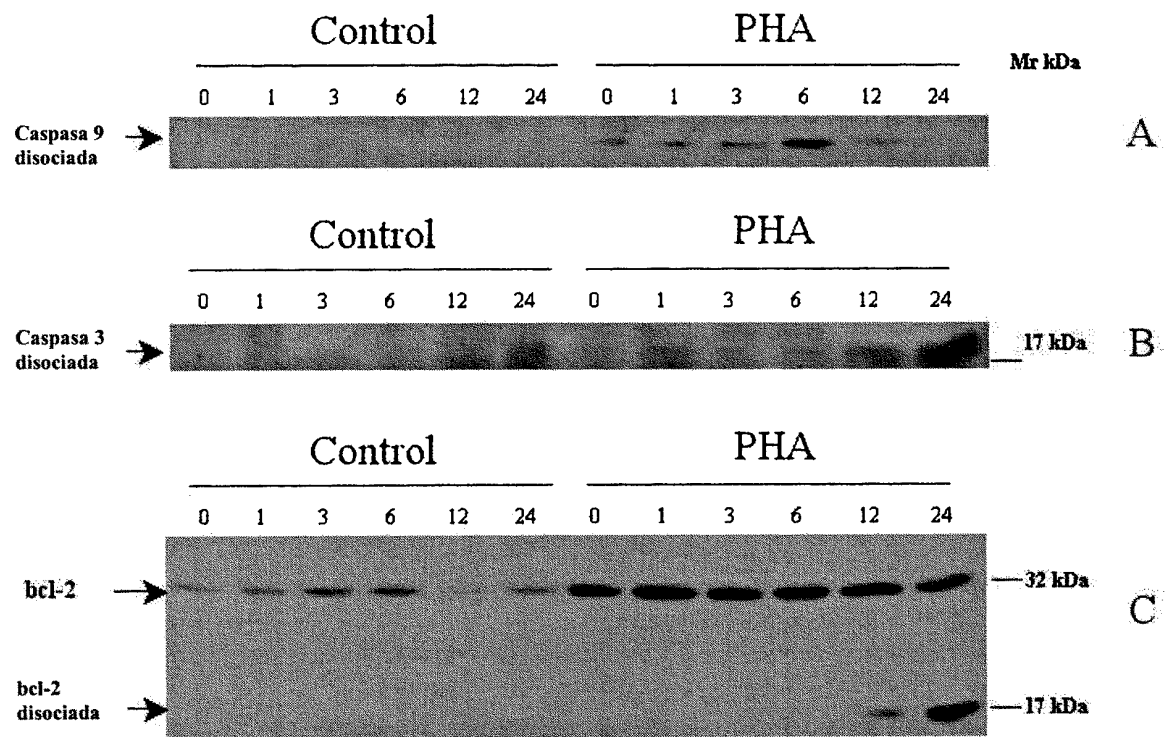


FIG 7

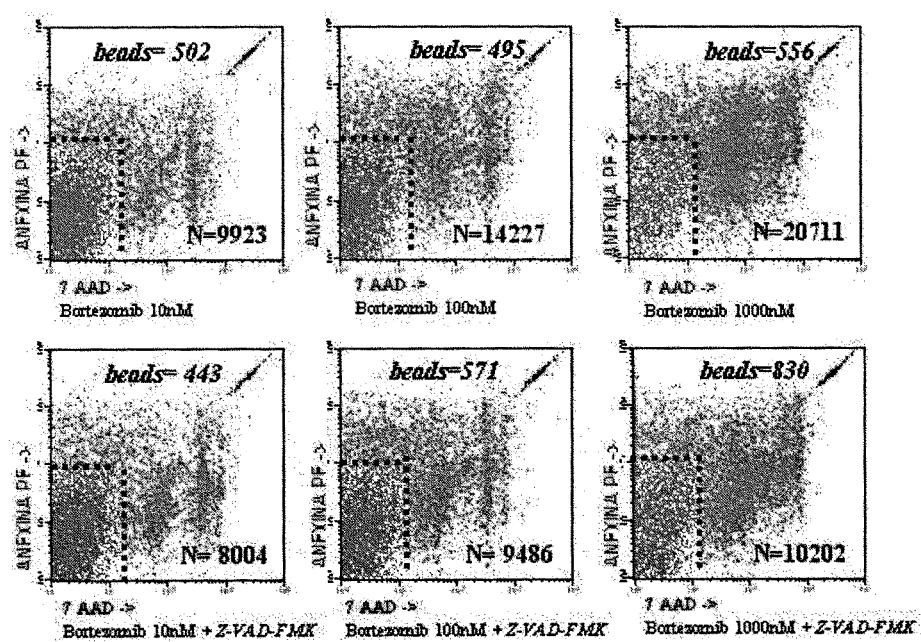


FIG 8

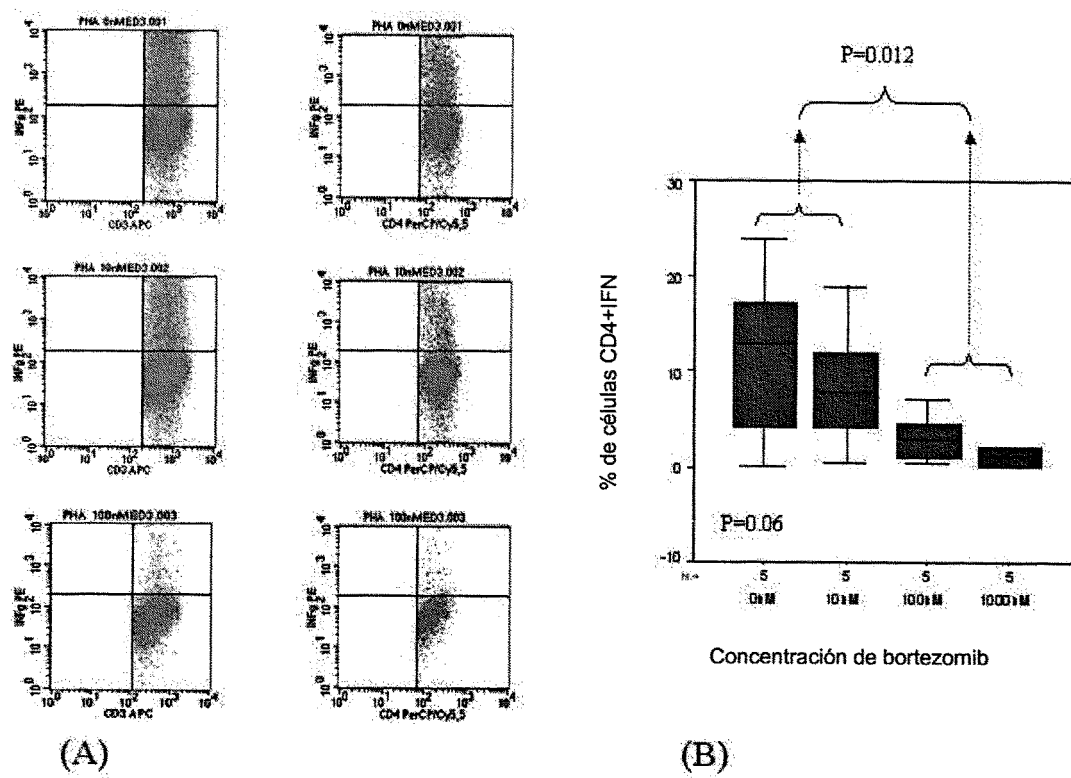


FIG 9

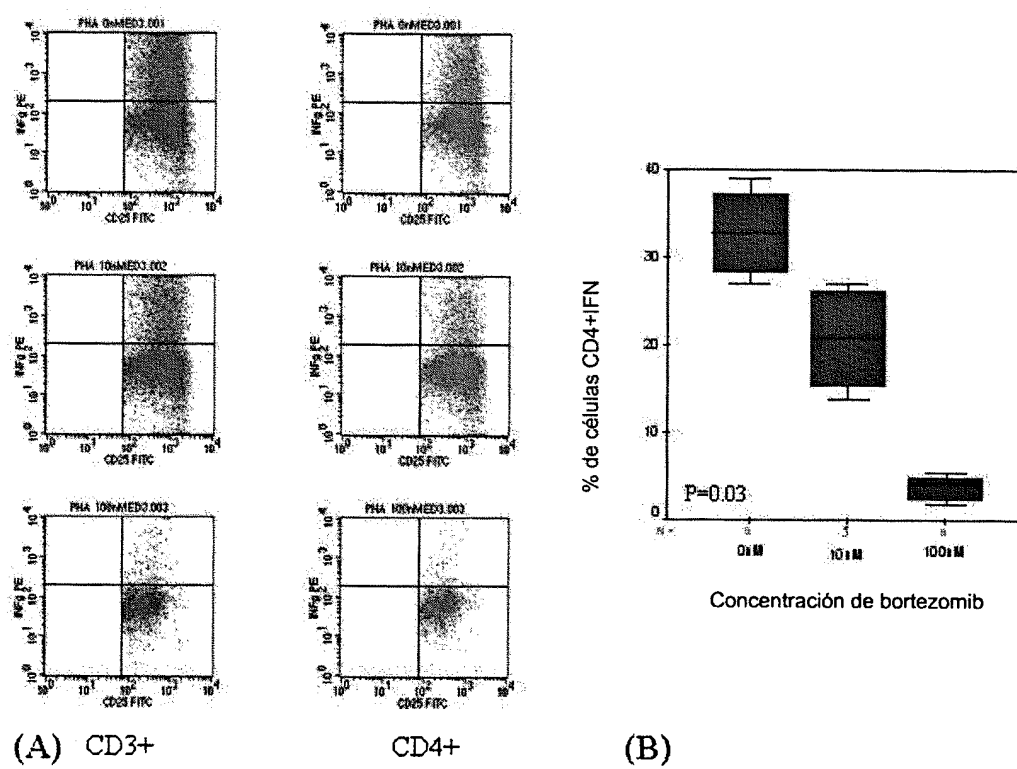
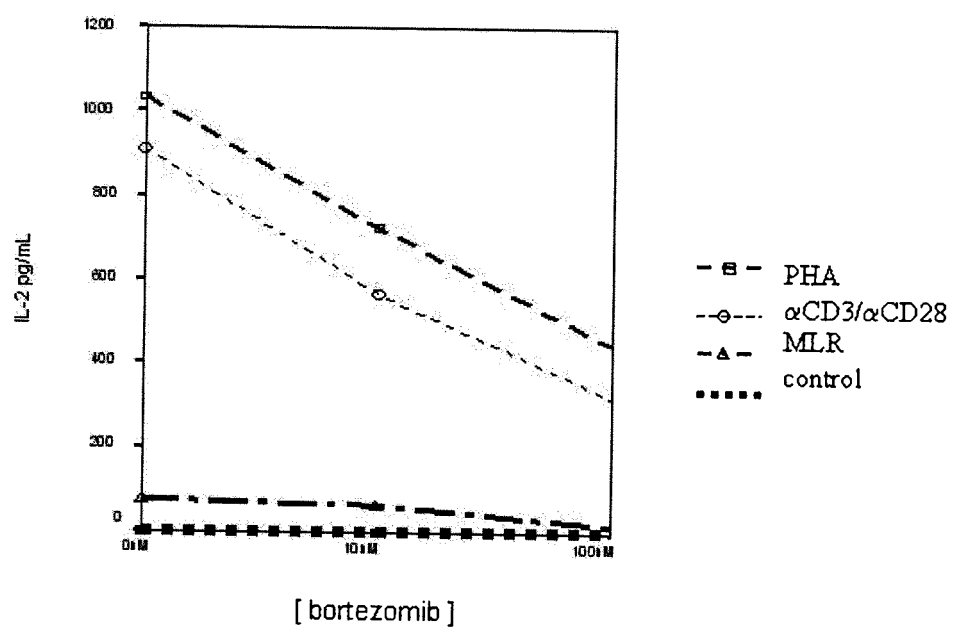


FIG 10





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 320 056

⑫ Nº de solicitud: 200502664

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 02.11.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SUN, K. et al. "Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib". P.N.A.S. 25.05.2004. Vol. 101, nº 21, páginas 8120-8125, todo el documento.	1-6
X	CATLEY, L. et al. "Strategies to improve the outcome of stem cell transplantation in multiple myeloma". THE HEMATOLOGY JOURNAL. 2004. Vol. 5, páginas 9-23, todo el documento.	1-6
X	VODANOVIC-JANKOVIC, S. et al. "NF-kB as a target for the prevention of Graft Versus Host Disease: comparative efficacy of Bortezomib and PS-1145". BLOOD FIRST EDITION. Publicado en línea. 20.09.2005, páginas 1-34, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.04.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)