MÉTODO PARA PRODUCIR CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS AUTÓLOGAS (TOLDCS) CON ANTÍGENOS ESPECÍFICOS Y SU USO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES).

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con la producción de células dendríticas tolerogénicas para antígenos específicos diseñadas para el uso en enfermedades autoinmunes, en particular para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES).

ESTADO DEL ARTE

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica de etiología desconocida que afecta principalmente a mujeres en edad fértil con una prevalencia de 124 casos por cada 100.000 personas. Desde el punto de vista clínico el lupus afecta a múltiples órganos, incluyendo los riñones, el corazón, los pulmones, la piel y los sistemas músculo-esquelético y hematológico, entre otros. Presenta además una evolución clínica impredecible caracterizada por reactivaciones o brotes alternados con periodos de remisión. Aunque la mortalidad del LES ha disminuido significativamente en los últimos 50 años, un paciente que desarrolla LES a la edad de 20 años tiene un 15% de probabilidades de morir a los 35 años de edad por el lupus mismo o una complicación asociada. El LES presenta además una morbilidad agregada importante. A modo de ejemplo, una de las complicaciones más relevantes en términos del impacto en sobrevida y calidad de vida para los pacientes es la nefritis lúpica (NL) que afecta hasta a un 50% de los pacientes con lupus. A pesar de los importantes esfuerzos realizados para optimizar el tratamiento de esta manifestación, todavía un 10-30% de los pacientes que presenta NL llega a insuficiencia renal terminal y requiere por lo tanto diálisis y/o trasplante renal. Asimismo, los pacientes

con lupus tienen una mortalidad entre 2 y 5 veces mayor que la población general, presentan hasta un 23% de discapacidad laboral y en el caso de mujeres en edad reproductiva, esto se acompaña de dificultades para concebir y mayor morbilidad-mortalidad durante el embarazo que mujeres sanas.

Asimismo, la FDA aprobó el año 2011 por primera vez en 30 años una nueva droga (belimumab) para el tratamiento del LES. Sin embargo, este medicamento y el resto de las drogas de uso habitual en esta enfermedad, incluyendo micofenolato mofetil (MMF), ciclofosfamida y los esteroides, son tratamientos no curativos e inmunosupresores no específicos que se asocian a complicaciones importantes como infecciones oportunistas. Recientemente, el grupo investigador del proyecto ALMS (NCT00377637) que estudió el uso de MMF en nefritis lúpica, publicó los resultados de la fase de mantención de dicho ensayo donde se comparó la droga en estudio v/s azatioprina. Destaca en los resultados que un 33,3% de los pacientes que usó azatioprina y un 23,5% de los que usó MMF presentó eventos adversos serios que motivaron el retiro del estudio en un 39,6% y 25,2% de los pacientes respectivamente. Otros agentes biológicos aprobados para su uso en otras patologías autoinmunes tales como el rituximab, no han demostrado eficacia en estudios clínicos controlados en lupus y, al igual que los inmunosupresores tradicionales, pueden también contribuir a la aparición de infecciones oportunistas.

La presente invención consiste en un procedimiento para obtener células dendríticas (DCs) autólogas específicas para antígenos provenientes de células apoptóticas para inmunoterapia para LES. En la búsqueda del estado del arte, se encontraron documentos relacionados con la obtención y uso de células dendríticas para tratamiento de enfermedades inmunológicas. El documento más cercano a la tecnología en estudio es la solicitud de patente WO2001085207 donde proponen usar Células Apoptóticas para disminuir la capacidad de las DC de estimular una respuesta celular a través de la inducción de anergia a células T. Además, incluyen diversas alternativas para modular la presentación de antígenos apoptóticos por DCs y el uso de factores maduradores de DCs. En este caso,

son las células apoptóticas las que ejercen la acción moduladora en la función de las células dendríticas. En ninguna parte se menciona la relación de células apoptóticas con Lupus Eritematoso Sistémico. En la presente invención, el objetivo del uso de células apoptóticas es distinto, no busca ser per se lo que promueva la modulación de la función de las DCs y no es relevante el cómo son presentados los antígenos apoptóticos por las DCs que serán capaces de inducir anergia en células T. El objetivo del uso de células apoptóticas es lograr que las DCs de la presente invención sean específicas para que sólo se module la respuesta de células T para antígenos contenidos en las células apoptóticas, que tienen un rol relevante en la patogenia del Lupus Eritematoso Sistémico. Es más, se evaluó durante los experimentos realizados que las células apoptóticas no indujeran maduración de las DCs, es decir, que no aumentaran su capacidad inmunogénica porque nunca estuvo en los objetivos de uso que modularan la inmunogenicidad de las DCs. La modulación de la función de las DC se logra usando Rosiglitazona (RGZ) y Dexametasona (DEXA).

La publicación de Carreño y cols. “Induction of Tolerogenic Dendritic Cells by NF-κB Blockade and Fcg Receptor Modulation” describe el uso de DCs tratadas con Rosiglitazona y andrografólido para tratamiento de modelo murino de esclerosis múltiple y se sugiere que puede ser usado para otras enfermedades autoinmunes como Lupus donde se desconoce el antígeno. Se dan los protocolos para tratar los animales directamente con estas drogas y para generar DCs tolerogénicas (tolDCs) con Rosiglitazona y Andrografólido. En la presente invención, se propone el uso de Rosiglitazona y Dexametasona en conjunto para generar DCs tolerogénicas, lo que no aparece en la publicación de Carreño y colaboradores. Además, en dicha publicación se propone tratar a los ratones directamente con las drogas inhibidoras de NF-κB rosiglitazona y andrografólido, no con DCs tratadas con estas drogas como es lo que se propone en la presente invención. El tratamiento con DCs tratadas lo hacen en modelo murino de esclerosis múltiple. La única mención a la posibilidad de tratar LES con DCs tolerogénicas es sutil y nunca incluye la idea de incluir células apoptóticas para inducir anergia en Linfocitos T que reconozcan antígenos que provienen de estas

células. Es más, se menciona específicamente que los antígenos en Lupus son desconocidos, nunca se propone que puede usarse como fuente de antígenos a células apoptóticas. Incluso esto queda como un potencial obstáculo.

La publicación de solicitud de Patente Internacional WO2012160200 propone el uso de esteroides y vitamina D para generar DCs maduras con propiedades tolerogénicas. El tiempo de cultivo con esteroides es de 4 días y dice textual "para obtener DC maduras". Luego cultivan estas células en un ambiente de citoquinas pro-inflamatorias, donde se identifican a las DCs maduras por la presencia de CD14 en superficie y a las tolerogénicas por la expresión de MERTK. En la presente invención se propone obtener DCs inmaduras (iDCs) usando Dexametasona (glucocorticoide) y Rosiglitazona (tiazolidinediona), que no se menciona en esta solicitud de patente y que no es similar a Vitamina D. El método de la presente invención es distinto, ya que se cultivan con Rosiglitazona y Dexametasona. En ninguna parte de este documento se sugiere o propone que las DCs deben tener especificidad dada por el tratamiento con algún antígeno específico. Es más, en ninguna parte se sugiere que en el caso de LES la fuente de antígenos pudiera ser el uso de células apoptóticas. Las DCs de la presente invención son CD14 (-), es decir no lo expresan y no se evalúa la presencia de MERTK, por lo que se trata de productos distintos originados de metodologías distintas.

Para la generación de inmunoterapia basada en DCs, es relevante la especificidad antigénica, ya que una de las ventajas de este tipo de terapia es la disminución de la respuesta contra antígenos propios sin afectar una respuesta efectiva contra agentes externos. Sin embargo, uno de los principales obstáculos que complican actualmente el desarrollo de inmunoterapia en LES es el desconocimiento del autoantígeno específico responsable del desarrollo de la enfermedad. Debido a que los pacientes con lupus presentan una deficiencia en la eliminación de los residuos celulares generados en el proceso de apoptosis, es que se ha postulado que éstos serían fuente de autoantígenos. Es por esto, que la presente invención propone el uso de células apoptóticas como fuente de

autoantígenos para dirigir la actividad de las DCs tolerogénicas (tolDCs) exclusivamente hacia linfocitos autorreactivos (Figura 1).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fenotipos de célula dendrítica. Las células inmaduras, de bajo potencial inmunogénico, maduran en presencia de estímulos pro-inflamatorios como el LPS adquiriendo un fenotipo con elevada capacidad de activar linfocitos T y aumento en expresión de marcadores de superficie CD80, CD83, CD86 y CD40. En cambio, cuando las células inmaduras reciben estímulos anti-inflamatorios pueden convertirse en células tolerogénicas que inducen tolerancia en linfocitos T sin el potencial de volverse inmunogénica.

Figura 2. Diseño experimental para la generación de Células Dendríticas Inmaduras (iDCs) y Tolerogénicas (tolDCs) pulsadas con células apoptóticas.

Figura 3: Generación de células apoptóticas por radiación UV-B. A: Dot plot representativo de linfocitos no expuestos a luz UV-B (basal). B: Tratados con Staurosporine (Novex, Carlsbed, CA, USA) (1µM) por 24 horas (control + de apoptosis). C: Tratados por 50 minutos a 56ºC (control + de necrosis). D: Expuestos durante 1,5 horas a radiación UV-B. E: Distribución porcentual de linfocitos por cuadrante tratados con PI y Anex-V-FITC luego de 1,5 horas de exposición a radiación UV-B de un individuo control.

Figura 4. Diseño experimental para la determinación de la capacidad de las DCs de endocitar células apoptóticas.

Figura 5: Análisis por citometría de flujo de la incorporación de células apoptóticas por DCs derivadas de monocitos. A: Histograma de la autofluorescencia de las células y determinación de la población CD11c+. B: Histograma para la determinación de señal positiva para CFSE (FITC+). C: Población CD11c + de un individuo control. D: Histograma de población FITC+ obtenida a partir de una población CD11c+ en células de un individuo control.

Figura 6: Microscopia confocal de la endocitosis de células apoptóticas por DCs derivadas de monocitos de un paciente con LES en presencia de células apoptóticas autólogas. En el panel izquierdo de la figura, se observan DCs marcadas con la tinción BODIPY TR Ceramide que se une al aparato de Golgi de las células vivas. En el panel central, se aprecian las células apoptóticas teñidas con CFSE. En el panel derecho, se observa la superposición de las imágenes anteriores que muestran la endocitosis de las células apoptóticas por parte de las DCs (flechas blancas).

Figura 7: Expresión de los marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en células dendríticas humanas derivadas de monocitos tratadas con lipopolisacárido (LPS) de *S. Typhimurium* (1µg/ml) y co-cultivadas con células apoptóticas autólogas (12,5 µg/ml contenido de DNA, generadas por radiación UV-B) en presencia de RGZ (10 µM) y RGZ + Dexa (1 µM) (n= 14 pacientes LES). El asterisco indica *P<0,05 (Friedman Test) al comparar la estimulación con LPS y las DCs tratadas con RGZ, DEXA, co-cultivadas con células apoptóticas y desafiadas con LPS. La línea representa el valor que corresponde a las DCs tratadas con vehículo. Apocell: células apoptóticas; DEXA: dexametasona; RGZ: rosiglitazona.

Figura 8: Perfil de secreción de citoquinas IL-6, e IL-12p70 en sobrenadantes de cultivos de células dendríticas de pacientes con LES derivadas de monocitos tratadas con lipopolisacárido (LPS) de S. Typhimurium (1µg/ml) y co-cultivadas con células apoptóticas autólogas (12,5 µg/ml contenido de DNA, generadas por radiación UV-B) en presencia de RGZ (10 µM) y DEXA (1µM). La figura muestra una disminución significativa en la secreción de IL-6 e IL-12p70 usando ambos tratamientos. IL-6 se expresa como “fold increase” respecto a la condición sin tratamiento.*p<0,05 Wilcoxon Test.

Figura 9: Ensayo de viabilidad celular con XTT en las DCs de pacientes con LES. La figura muestra que la viabilidad celular de las DCs no se ve alterada en presencia del tratamiento con las drogas inmunosupresoras (n=6) al ser comparadas con DCs no tratadas que sólo

reciben el vehículo (VEH). Células apoptóticas (Apocell) generadas por irradiación con luz UV-B fueron empleadas como control negativo de viabilidad.

Figura 10: Determinación de la activación de linfocitos de sangre periférica (PBL) con los marcadores CD69 y CD71, luego de ser tratados con sobrenadantes de DCs cultivadas en el laboratorio por 24 hrs. La figura muestra el porcentaje de células CD69+ y CD71+ para cada condición. n=1 control sano. Control positivo: células tratadas por 24 hrs con Concanavalina A (Con-A, 10 µL/ml); SN: sobrenadante; Apocell: Células apoptóticas.

Figura 11. Diseño experimental de ensayo de Reacción Linfocitaria Mixta. iDC corresponde a Células Dendríticas inmaduras, mDC corresponde a Células Dendríticas maduras, y tolDC corresponde a Células Dendríticas tolerogénicas.

Figura 12. Ensayo funcional de tolDC en reacción linfocitaria mixta con linfocitos T alogénicos. Se cuantificó la expresión de CD25 (Figura A) y CD71 (Figura B), y la dilución de la sonda CFSE por proliferación, de linfocitos T CD4+ al quinto día de co-cultivo con tolDCs. En los gráficos se representan los porcentajes de linfocitos T CD4+ CD25+, y CD4+ CD71+ al quinto día de co-cultivo (n=1). αCD3 + αCD28 es el control positivo de activación de Linfocitos T. R+D: dexametasona y rosiglitazona.

Figura 13. Ensayo funcional de tolDC en reacción linfocitaria mixta con linfocitos T alogénicos. Se cuantificó la expresión de CD71 (Figura A), y la dilución de la sonda CFSE por proliferación (Figura B), de linfocitos T CD4+ al quinto día de co-cultivo con tolDCs. En los gráficos se representan los porcentajes de linfocitos T CD4+ CD71+, y que proliferaron (CD4+ CFSElow) al quinto día de co-cultivo. (n=1). UT: sin tratar. R/D: dexametasona y rosiglitazona.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos que re-establecen la tolerancia del sistema inmune a órganos propios, método para producir dichas tolDCs con antígenos específicos; uso de dichas tolDCs con antígenos

específicos en la producción de una terapia para tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención considera tres aspectos principales. En un primer aspecto, la presente invención corresponde a un método para producir células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos. En un segundo aspecto, la presente invención corresponde a células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos que re-establecen la tolerancia del sistema inmune a órganos propios, cuando son administradas a un paciente que lo necesite. Finalmente, un tercer aspecto de la presente invención corresponde al uso de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos en la producción de una terapia para tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

Una realización del primer aspecto de la invención, corresponde a un método para producir células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos. En una realización particular, el método para producir células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos comprende los siguientes pasos:

(a) cultivar precursores de células dendríticas *in vitro* en medio libre de suero animal, usando las citoquinas, IL-4 y GM-CSF, para diferenciarlos en células dendríticas;

(b) producir células apoptóticas;

(c) cultivar las células dendríticas obtenidas en la etapa (b) en presencia de compuestos con actividad anti-inflamatoria;

(d) co-cultivar las células dendríticas del paso (d) con las células apoptóticas de la etapa (c), de manera de propiciar la endocitosis de las células apoptóticas por parte de las células dendríticas;

(e) determinar a través de la identificación por medio de evaluación fenotípica la obtención de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos.

En una realización particular, los precursores de células dendríticas de la etapa a) son seleccionados de monocitos, progenitores de médula ósea o directamente desde sangre periférica o sangre de cordón umbilical.

En otra realización particular, la diferenciación se lleva a cabo al cultivar los precursores y citoquinas IL-4 y GM-CSF en condiciones de entre 30 y 45°C, y entre 1 y 10% de CO_2. Más específicamente a 37°C y 5% de CO_2.

En otra realización, las células apoptóticas de la etapa c) son producidas al exponer células a un estímulo apoptótico seleccionado entre radiación ultravioleta tipo B (UV-B), presencia de sustancias químicas (staurosporina, metotrexato), activación de receptores específicos (interacción Fas-Fas ligando) o inhibición del transporte de electrones mitocondrial (heptacloro, rotenona). En otra realización, las células desde las cuales provienen las células apoptóticas corresponden a células sanguíneas, células musculares, células epidérmicas, células epiteliales, células de madre o líneas celulares humanas. En una realización particular, las células sanguíneas son linfocitos de sangre periférica, plaquetas, neutrófilos o monocitos. En una realización más específica, las células sanguíneas son linfocitos de sangre periférica.

En otra realización, el cultivo de las células dendríticas en presencia de compuestos con actividad anti-inflamatoria de la etapa d) se realiza por un período de entre 5 y 48 horas. En una realización más específica, los compuestos con actividad antiinflamatoria se seleccionan entre rosiglitazona (RZG) y dexametasona (DEXA) o una combinación de ellos. En una realización más específica, las células dendríticas se cultivan en presencia de entre 5 y 30 µM de RGZ, en presencia de entre 0,5 y 5 µM de DEXA.

En una realización específica, el co-cultivo de las células dendríticas de la etapa e) con células apoptóticas se realiza considerando una cantidad de células apoptóticas, expresado como contenido de DNA, de entre 5 y 20 µg/ml. Se utiliza para esto medio libre de suero animal, como por ejemplo AIM-V (GIBCO® AIM V® Medium Grand Island, NY, USA).

En otra realización, el co-cultivo de las células dendríticas con las células apoptóticas se lleva a cabo por un período de tiempo de entre 5 y 48 horas.

En otra realización de la invención, la identificación de tolDCs de la etapa f) se realiza evaluando: (i) la producción de las citoquinas IL-6, y IL-12p70 que debe ser disminuida con respecto a DCs maduras inmunogénicas; y (ii) ausencia o expresión reducida de marcadores de superficie en comparación con DCs maduras inmunogénicas, donde los marcadores de superficie son seleccionados entre CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos. En una realización más específica, la evaluación de la producción de IL-6, y IL-12p70 y de la expresión de marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos se realiza a través de la técnica seleccionada de ELISA, citometría de flujo, Western Blot y también a nivel de transcripción o RNA mensajero por RT-PCR.

Un segundo aspecto de la invención, corresponde a células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos obtenidas a partir del método anteriormente expuesto. En una realización específica, los antígenos específicos son autoantígenos, y no porque provengan de un paciente, sino que en enfermedades autoinmunes la respuesta inmunológica es contra un elemento propio, por lo tanto el antígeno es autoantígeno. En una realización específica de la invención, las células dendríticas provienen de: monocitos, progenitores de médula ósea o directamente desde sangre periférica o sangre de cordón umbilical. En otra realización, los antígenos específicos provienen desde células apoptóticas. En una realización más específica, las células apoptóticas provienen de células que han sido sometidas a un estímulo apoptótico. En una realización específica, el estímulo apoptótico al cual se someten las células se selecciona entre radiación ultravioleta tipo B (UV-B), presencia de sustancias químicas (staurosporina, metotrexato), activación de receptores específicos (interacción Fas-Fas ligando) o inhibición del transporte de electrones mitocondrial (heptacloro, rotenona). Más específicamente, el estímulo empleado es radiación ultravioleta tipo B (UV-B).

En otra realización, las células desde las cuales provienen las células apoptóticas corresponden a células sanguíneas, células musculares, células epidérmicas, células epiteliales, células de madre o líneas celulares humanas. En una realización particular, las células sanguíneas son linfocitos de sangre periférica, plaquetas, neutrófilos o monocitos.

En una realización específica, las células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) de la invención son identificadas por medio de evaluación fenotípica. En una realización más específica, la identificación de tolDCs se realiza evaluando: (i) la producción de las citoquinas IL-6, y IL-12p70 que debe ser disminuida con respecto a DCs maduras inmunogénicas; y (ii) ausencia o expresión reducida de marcadores de superficie en comparación con DCs maduras inmunogénicas, donde los marcadores de superficie son seleccionados entre CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos. En una realización más específica, la evaluación de la producción de IL-6, y IL-12p70 y de la expresión de marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos se realiza a través de la técnica seleccionada de ELISA, citometría de flujo, Western Blot y también a nivel de transcripción o RNA mensajero por RT-PCR.

En un tercer aspecto de la invención, se describe el uso de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos en la producción de una terapia para tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

En una realización específica, la invención describe el uso de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos, que sirve en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

Ejemplo 1: Obtención de DC específicas para antígenos relevantes en LES

Inducción de apoptosis mediante radiación ultravioleta tipo B (UV-B) en linfocitos de sangre periférica

En esta etapa se procedió a evaluar diferentes tiempos de exposición a radiación UV-B para obtener células apoptóticas a partir de linfocitos provenientes de sangre periférica de individuos sanos inicialmente y luego de pacientes con LES. Para corroborar la inducción de apoptosis, se usó tinción con Ioduro de Propidio (PI) y Anexina V (Anex) y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Dichas células en estado de apoptosis son posteriormente usadas para pulsar DCs con el fin de proveer autoantígenos (Figura 2). En la Figura 3 se muestra que un tiempo de exposición de 1,5 hrs a radiación UV-B es apropiado para inducir apoptosis (PI+ Anex+) en estas células.

Evaluación de la capacidad de las DCs de pacientes con LES de endocitar células apoptóticas.

Posteriormente, se evaluó si las DCs generadas en la prueba anterior tienen la capacidad de endocitar células apoptóticas para procesar los antígenos y luego presentarlos a Linfocitos T autorreactivos. Las células apoptóticas generadas por exposición a radiación UV-B fueron marcadas con la tinción celular succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para poder ser detectadas con citometría de flujo. Las DCs fueron incubadas durante 24 hrs. con células apoptóticas marcadas con CFSE. En este experimento se seleccionó la población CD11c+ que permite identificar a DCs. La detección de CFSE en la población de células CD11c+ (39,5%) es indicativo de la fagocitosis de las células apoptóticas por parte de las DCs (Figuras 4 y 5).

Brevemente, las células apoptóticas generadas por radiación UV-B fueron marcadas con CFSE y co-cultivadas durante 24 hrs con DCs. Las DCs fueron marcadas con tinción vital BODIPY-TR Ceramide (Life Technologies) y como se observa en la Figura 6, la composición de la imagen muestra que las DCs son capaces de endocitar células apoptóticas tanto en un individuo control (panel B) como en un pacientes LES (panel C).

Efecto de co-cultivo de células apoptóticas y DCs en inmunofenotipo de DCs.

Es ampliamente reportado que las moléculas de DNA juegan un rol como autoantígeno en pacientes con lupus y que se exponen al ambiente extracelular durante la apoptosis asociado a proteínas como las histonas en forma de nucleosomas (1). Es por esto que la determinación de DNA constituye una manera de cuantificar las células apoptóticas, metodología que ya ha sido utilizada previamente por otros investigadores (2).

Para los resultados que se muestran en la presente invención, se incluyeron un total de 14 pacientes con LES cuyas características clínicas se detallan en la Tabla 1, a partir de los cuales se generaron DCs y al sexto día se pulsaron con células apoptóticas (12,5 µg/ml de contenido de DNA) por 24 horas previo al análisis. El estado de maduración de las DCs resultantes fue analizado por citometría de flujo usando anticuerpos conjugados anti CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR (Figura 7).

Patient	Gender	Age (yrs)	SLEDAI	Treatment	Arthritis	Immune	NS	Kidney	Haem.	Serositis	MC	ANA
SLE6	F	30	10	None	+	+	-	+	+	+	+	+
SLE7	F	46	4	PDN 5 Mg	-	+	-	-	+	-	+	+
SLE8	F	25	14	HCQ, PDN 15Mg	+	+	-	-	-	-	+	+
SLE9	M	23	8	HCQ, PDN 20Mg,MMF	+	+	-	+	-	-	-	+
SLE10	F	34	2	HCQ, PDN 5Mg,MMF	+	+	-	+	+	-	+	+
SLE11	F	65	0	HCQ, PDN 5Mg	-	+	-	+	+	-	-	+
SLE12	M	24	2	HCQ,MMF	+	+	-	+	-	-	-	+
SLE13	F	24	0	HCQ	+	-	-	-	+	-	+	+
SLE14	F	26	2	HCQ	+	+	-	+	-	-	+	+
SLE15	F	36	0	HCQ	+	+	-	-	+	-	-	+
SLE16	F	35	8	HCQ	-	+	-	-	+	-	+	+
SLE17	F	26	6	HCQ, PDN 10Mg, CYT	-	+	-	-	+	-	+	+
SLE18	F	47	2	HCQ, PDN 5Mg, AZT	-	-	-	-	-	+	+	+
SLE19	F	49	4	HCQ, PDN 10Mg, AZT	+	+	-	-	-	-	+	+
Average (±SD)		35 ± 12,5	4 ± 4,2									

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con LES para el estudio de la generación de DC y estudios de co-cultivo con células apoptóticas. A cada paciente incluido en los estudios se le determina el grado de actividad de la enfermedad a través del índice SLEDAI, a mayor puntaje, mayor actividad, definiéndose como enfermedad activa un SLEDAI > 6. Se incluye además la edad promedio y los criterios para LES que cumple cada paciente. Art. Artritis; Inm. = inmunológico (presencia de anticuerpos anti-DNA, anti-Sm o anti-cardiolipinas); SN: compromiso sistema nervioso (convulsiones o psicosis); Hem. = compromiso hematológico; Sero. = serositis; MC: mucocutáneo; ANA: Anticuerpos anti-nucleares.

Efecto de RGZ y DEXA sobre DC pulsadas con células apoptóticas.

Las DCs derivadas de monocitos fueron obtenidas de pacientes con LES e individuos control y fueron tratadas por 24 hrs con RGZ (10 µM) y DEXA (1 µM) para luego ser co-cultivadas con células apoptóticas (12,5 µg/ml de contenido de DNA) por 24 horas adicionales y se procedió a evaluar la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en un total de 14 pacientes LES (Tabla 1).

En la Figura 7, se observa que las DC en presencia de las células apoptóticas no presentan variación en la expresión de ninguno de los marcadores de maduración estudiados, mientras que el tratamiento con las drogas RGZ + DEXA disminuye significativamente ($p<0,05$, Friedman Test) la expresión de los marcadores de maduración, CD80, CD83 y CD86 en DCs de pacientes con LES co-cultivadas con células apoptóticas en comparación a las células tratadas con LPS de *S. typhimurium*, lo que demuestra la efectividad del tratamiento con las drogas inmunosupresoras en el cambio de fenotipo de las DCs.

Determinación de la activación de las DCs: Secreción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

Con el propósito de corroborar la inducción de un estado tolerogénico en las DCs y tener más elementos que permitan una caracterización lo más completa posible y una aproximación funcional, se procedió a cuantificar la producción de algunas citoquinas relevantes en los sobrenadantes de los co-cultivos de los experimentos anteriores, tales como: interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 12p70 (IL-12p70), secretadas al medio extracelular por las células dendríticas tolerogénicas, por medio de la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés).

Como se observa en la Figura 8, el tratamiento con RGZ + DEXA induce una disminución significativa ($p<0.05$) en la secreción de IL-6, una citoquina multifuncional con propiedades claramente definidas en la regulación de los estados inflamatorios (3) y que durante la presentación antigénica cumple un papel fundamental en la activación y diferenciación de

los linfocitos T CD4+ a alguno de los fenotipos efectores (4), en comparación a las DCs tratadas LPS de S. typhimurium. En la misma figura se observa también una disminución en la secreción de IL-12p70, esta citoquina juega un papel importante en la potenciación de la actividad citotóxica de las células Natural Killers (NK) como también en la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ y el desarrollo de un fenotipo pro-inflamatorio en linfocitos T CD4+.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos y muestra que el producto tolDC (DCs tolerogénicas tratadas con RGZ y DEXA y pulsadas con células apoptóticas) presenta una disminución de la mayoría de los marcadores de superficie relevantes asociados a maduración y a un fenotipo inmunogénico al ser desafiadas con LPS y una disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación con DC no tratadas con RGZ y DEXA.

	Marcadores Fenotípicos					Citoquinas	
	CD40	CD80	CD83	CD86	HLA-DR	IL-6	IL-12p70
DCs inmunogénicas (DCs + LPS)	↑	=	↑	=	=	↑	↑
TolDCs (DCs + R + D + Apocell + LPS)	=	↓	↓	↓	=	↓	↓

Tabla 2. Resumen del fenotipo observado en DCs maduras y tolDCs.

Estudios de toxicidad y viabilidad celular de la terapia para LES con DCs tolerogénicas autólogas.

Con el fin de evaluar los efectos de las drogas sobre la viabilidad y metabolismo celular, se procedió a realizar el ensayo de viabilidad XTT, ensayo colorimétrico que estima la actividad celular metabólica. Su fundamento consiste en la reducción de la sal de tetrazolium XTT, la cual es transformada a formazán por la actividad de enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas, generándose como producto un compuesto coloreado, que se genera solo en células viables y cuya cantidad producida es proporcional al número de células viables en la muestra.

Como se observa en la Figura 9, el tratamiento con las drogas no altera el porcentaje de viabilidad celular de las DCs de los pacientes con LES.

Siguiendo la misma línea anterior, se procedió a realizar un experimento para evaluar si las DCs generadas secretan alguna sustancia potencialmente tóxica al medio extracelular que pudiese afectar la viabilidad de las células del organismo que recibirá la terapia. Para realizar este ensayo se utilizó ioduro de propidio (PI) en conjunto con anexina V (Anex V) los cuales se utilizaron para marcar linfocitos de sangre periférica (PBL) de un individuo control que fueron previamente tratados con los sobrenadantes de DCs cultivadas en las condiciones de nuestro protocolo usando las drogas inmunomoduladoras, pero sin ser sometidas al desafío con LPS y que provenían de otro individuo control, por un tiempo de 24 hrs.

Por otra parte, se determinó si estos sobrenadantes de las DCs generadas eran capaces de producir en los linfocitos alguna respuesta de activación y para ello se determinaron en los linfocitos de los PBL tratados los marcadores CD 69 (marcador de activación temprana) y CD 71 (marcador de activación tardía), los cuales se expresan frente a estímulos de activación en líneas celulares linfoides.

En la Figura 10, se observa que el marcador CD71 no varía su expresión al ser tratado con el sobrenadante de las DCs tratadas con el vehículo ni tampoco con el sobrenadante de las DCs tratadas con las drogas y células apoptóticas. Con respecto al marcador CD69, se observa un leve incremento en el porcentaje de células activadas, pero que dista mucho de los niveles de activación del control positivo correspondiente a PBL estimulado con concanavalina A (proteína con la capacidad de inducir actividad mitogénica en los linfocitos T e incrementar la síntesis de productos celulares) y que es similar a los resultados obtenidos con sobrenadantes de DCs tratadas con vehículo.

De estos dos últimos resultados se concluyó que los sobrenadantes de las DCs no alteran la viabilidad de los PBL, como tampoco generan una respuesta de activación en estas células.

Ejemplo 2: Evaluación funcional de la capacidad tolerogénica de las DCs

En el ejemplo anterior, se caracterizaron las cualidades y la estabilidad del inmunofenotipo de las tolDCs como una medida de evaluar su potencial como terapia y tener una aproximación funcional al estudiar la secreción de citoquinas. Para determinar su éxito en una fase pre-clínica, se requieren análisis funcionales propiamente tales in vitro que apunten a evaluar capacidad moduladora de las tolDCs generadas sobre linfocitos T CD4+.

Se realizó entonces un ensayo de Reacción Linfocitaria Mixta (MLR, del inglés Mixed Lymphocyte Reaction) alogénica, utilizando DCs y células T CD4+ de individuos sanos diferentes (Figuras 11 y 12).

TolDCs de un individuo y células T de un individuo distinto previamente teñidas con CFSE fueron cultivadas en 200 µL de medio RPMI 1640 + 10% FBS (razón 1:5) durante 5 días. Como control, se usaron linfocitos T co-cultivados con DCs inmaduras (iDCs), DCs maduras o sin DCs hasta el punto final del experimento. Se evaluó la activación de los linfocitos T al quinto día mediante citometría de flujo por medio de la expresión CD25 y CD71 (Figura 12).

La expresión de CD25 y CD71 (marcadores de activación de Linfocitos T) de las células T cultivadas en presencia de tolDCs inducidas por cada una de las drogas o ambas simultáneamente, es inferior a la observada para las células co-cultivadas con DCs inmaduras. Los resultados demuestran la función tolerogénica de las DCs inducidas por tratamiento con drogas inhibidoras de NF-κB.

Se realizó también el mismo ensayo tomando tolDCs de un paciente con LES y células T de un individuo sano previamente teñidas con CFSE y fueron cultivadas en 200 µL de medio RPMI 1640 + 10% FBS (razón 1:5) durante 5 días. Como control, se usaron linfocitos T co-cultivados con DCs inmaduras, DCs maduras o sin DCs hasta el punto final del experimento. Se evaluó la proliferación y activación de los linfocitos T al quinto día mediante citometría de flujo por medio de la medición de la dilución de CFSE y la expresión CD71 (Figura 13).

La expresión de CD71 (marcador de activación de Linfocitos T) de las células T cultivadas en presencia de tolDCs inducidas por cada una de las drogas o ambas simultáneamente, es

inferior a la observada para las células co-cultivadas con DCs inmaduras. Adicionalmente, se observó que los linfocitos T proliferan menos en presencia de las tolDCs que de las DCs maduras.

Ejemplo 3: Protocolo de generación de tolDCs en Lupus Eritematoso Sistémico.

A. <u>Aislamiento de sangre periférica o capa leucocitaria no debe ser mayor que 8 horas y suplementado con Heparina</u>

1. Se distribuyó la sangre en tubos cónicos de 50 ml y se diluyó usando PBS 1X hasta alcanzar 35 ml de volumen total.
2. Se agregó 15 ml de Medio para separación de linfocitos Ficoll-Paque en el fondo de un tubo cónico vacío de 50 ml.
3. Se transfirió cuidadosamente la sangre diluida a cada tubo de 50 ml conteniendo el medio Ficoll-Paque.
4. Se centrifugó a 1000xg por 25 minutos a 20°C.
5. Se aspire la capa superior (serum) dejando la capa de células mononuclear inalterada en la interfase.
6. Se transfirió cuidadosamente la capa de células mononuclear a un Nuevo tubo cónico de 50 ml.
7. Se llenó el tubo cónico de 50 ml que contenía la capa de células mononuclear con PBS 1X y se centrifugó a 300xg a 20°C por 10 minutos. Se removió cuidadosamente el sobrenadante y se descartó.
8. Se resuspendió el pellet en 5 ml de buffer de lisis RBC (ACK 1X) por 5 minutes a temperatura ambiente.
9. Se llenó el tubo cónico de 50 ml con PBS 1X y se mezcló suavemente.
10. Se centrifugó a 300xg por 10 minutos and se descartó el sobrenadante.
11. Se repitieron los pasos 7, 8 y 9 una vez.
12. Se resuspendió el pellet en 5 ml de medio AIM-V precalentado. Se realizó conteo de células.

13. Se plantó las células en 6 placas de 6 pocillos $10x10^6$ PBMCs en 1 mL de medio AIM-V.
14. Se incubó por 2 horas a 37°C, 5% CO_2 y se continuó en la sección B.

B. Obtención de linfocitos de sangre periferica y diferenciación a DC.

1. Se removió cuidadosamente el sobrenadante para tomar los linfocitos de sangre periférica (PBL) sin tocar el fondo del tubo. (Se almacenó PBL hasta generar células apoptóticas). Se lavó 3 veces con 1 ml de PBS 1X precalentado a 37°C.
2. Se agregó 1,5 mL de medio AIM-V precalentado conteniendo IL-4 (1000 UI/mL) y GM-CSF (1000 UI/mL) (***Día 1***). Se incubó a 37°C, 5% CO_2.
3. Se agregó citoquinas frescas (IL-4 and GM-CSF) el día 3 y 5, hasta una concentración final (1000 UI/mL) del cultivo sin cambiar el medio.

C. Generación de células apoptóticas

1. Se transfirió la fracción no adherente (PBL) a un tubo cónico de 50 mL y se llenó el tubo con PBS 1X.
2. Se centrifugó a 300xg por 6 minutos.
3. Se re-suspendió en 5 mL del medio AIM-V y se plantó en frasco de cultivo T-25 a 37°C con 5% CO_2. Se cambió el medio AIM-V cada día.
4. Se montó una lámpara UV dentro del gabinete de bioseguridad y se precalentó la lámpara por 10 minutos.
5. Se transfirió cuidadosamente PBL a una placa estéril de 60x15 ml.
6. Se irradió los linfocitos por 1,5 horas, a 2,0 mW/cm^2. Se procedió con la sección D.

D. Co-cultivo de DCs y células apoptóticas (Día 7)

1. Se homogenizó las células apoptóticas y determinó el volumen final después del tratamiento con UV. Se determinó la concentración de AND usando 400 µL de la preparación de las células apoptóticas.
2. Se transfirió las células a un tubo cónico y se centrifugó a 500xg por 10 minutos.
3. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet a una concentración final de 1 µg/mL de ADN.
4. Se agregó 18.75 µL de la preparación de células apoptóticas al medio de cultivo de DC preparado en la sección A.

E. <u>Inducción de DC tolerogénicas (Día 6)</u>

1. Se disolvió rosiglitazona en DMSO para preparar una solución stock (100 µL DMSO/1,79 mg rosiglitazona). De diluyó 5 µL de solución stock con 495 µL de PBS 1X para preparar la solución de trabajo. Se agregó 30 µL de la solución de trabajo al cultivo celular de DC (concentración final = 10 µM).
2. Se disolvió dexametasona en DMSO para preparar una solución stock (100 µL DMSO/0,2 mg dexametasona). Se diluyó 5 µL of solución stock con 20 µL of PBS 1X para preparar la solución de trabajo. Se agregó 1,5 µL de la solución de trabajo al cultivo celular de DC (concentración final = 1 µM).

REFERENCIAS

(1) Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens in systemic autoimmunity: critical partner in pathogenesis. Journal of internal medicine. Jun 2009;265(6):625-631.

(2) Fehr EM, Spoerl S, Heyder P, et al. Apoptotic-cell-derived membrane vesicles induce an alternative maturation of human dendritic cells which is disturbed in SLE. J Autoimmun. Feb 2013;40:86-95.

(3) Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. Cytokine. 2014 Nov;70(1):11-20. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.024. Epub 2014 Jun 28. Review. PubMed PMID: 24986424.

(4) Zhu J, Paul W. CD4 T cells: Fates, functions and faults. Blood, 2008; 112(5):1557-1569.

(5) Nagy ZS, Czimmerer Z, Szanto A, Nagy L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPARγ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. Immunobiology. 2013 Nov;218(11):1336-44. doi: 10.1016/j.imbio.2013.06.011. Epub 2013 Jul 1. PubMed PMID: 23870825.

(6) Hontelez S, Karthaus N, Looman MW, Ansems M, Adema GJ. DC-SCRIPT regulates glucocorticoid receptor function and expression of its target GILZ in dendritic cells. J Immunol. 2013 Apr 1;190(7):3172-9. doi: 10.4049/jimmunol. 1201776. Epub 2013 Feb 25. PubMed PMID: 23440419.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos, CARACTERIZADO porque comprende los siguientes pasos:

(a) cultivar precursores de células dendríticas en medio libre de suero animal, usando las citoquinas, IL-4 y GM-CSF, para diferenciarlos en células dendríticas;

(b) producir células apoptóticas;

(c) cultivar las células dendríticas obtenidas en la etapa (b) en presencia de compuestos con actividad anti-inflamatoria;

(d) co-cultivar las células dendríticas del paso (d) con las células apoptóticas de la etapa (c), de manera de propiciar la endocitosis de las células apoptóticas por parte de las células dendríticas;

(e) determinar a través de la identificación por medio de evaluación fenotípica la obtención de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los precursores de células dendríticas de la etapa a) son seleccionados de monocitos, progenitores de médula ósea o directamente desde sangre periférica o sangre de cordón umbilical.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la diferenciación se lleva a cabo al cultivar los precursores y citoquinas IL-4 y GM-CSF en condiciones de entre 30 y 45°C, y entre 1 y 10% de CO_2.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las células apoptóticas de la etapa c) son producidas al exponer células a un estímulo apoptótico seleccionado entre radiación ultravioleta tipo B (UV-B); presencia de sustancias químicas seleccionadas de staurosporina, metotrexato; activación de receptores específicos tal como

interacción Fas-Fas ligando o inhibición del transporte de electrones mitocondrial con heptacloro o rotenona.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las células desde las cuales provienen las células apoptóticas corresponden a células sanguíneas, células musculares, células epidérmicas, células epiteliales, células de madre o líneas celulares humanas.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque las células sanguíneas son linfocitos de sangre periférica, plaquetas, neutrófilos o monocitos.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el cultivo de las células dendríticas en presencia de compuestos con actividad anti-inflamatoria de la etapa d) se realiza por un período de entre 5 y 48 horas.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque los compuestos con actividad antiinflamatoria se seleccionan entre rosiglitazona (RZG) y dexametasona (DEXA) o una combinación de ellos.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque las células dendríticas se cultivan en presencia de entre 5 y 30 µM de rosiglitazona, y en presencia de entre 0,5 y 5 µM de dexametasona .

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el co-cultivo de las células dendríticas de la etapa e) con células apoptóticas se realiza considerando una cantidad de células apoptóticas, expresado como contenido de DNA, de entre 5 y 20 µg/ml.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADO porque se co-cultiva en medio libre de suero animal.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el co-cultivo de las células dendríticas con las células apoptóticas se lleva a cabo por un período de tiempo de entre 5 y 48 horas.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque en la etapa f), la identificación de tolDCs se realiza evaluando: (i) la producción de las citoquinas IL-6, y IL-12p70 que debe ser disminuida con respecto a DCs maduras inmunogénicas; y (ii) ausencia o expresión reducida de marcadores de superficie en comparación con DCs maduras inmunogénicas, donde los marcadores de superficie son seleccionados entre CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque la evaluación de la producción de IL-6, y IL-12p70 y de la expresión de marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos se realiza a través de la técnica seleccionada de ELISA, citometría de flujo, Western Blot y también a nivel de transcripción o RNA mensajero por RT-PCR.

15. Células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos, CARACTERIZADAS porque son obtenidas a partir del método de la reivindicación 1.

16. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADAS porque provienen de: monocitos, progenitores de médula ósea o directamente desde sangre periférica o sangre de cordón umbilical.

17. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADAS porque los antígenos específicos son autoantígenos.

18. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADAS porque los antígenos específicos provienen desde células apoptóticas.

19. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADAS porque las células apoptóticas provienen de células que han sido sometidas a un estímulo apoptótico.

20. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 19, CARACTERIZADAS porque el estímulo apoptótico al cual se someten las células se selecciona entre radiación ultravioleta tipo B (UV-B); presencia de sustancias químicas seleccionadas de staurosporina, metotrexato; activación de receptores específicos tal como interacción Fas-Fas ligando o inhibición del transporte de electrones mitocondrial con heptachlor o rotenona.

21. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 19, CARACTERIZADAS porque desde las cuales provienen las células apoptóticas corresponden a células sanguíneas, células musculares, células epidérmicas, células epiteliales, células de madre o líneas celulares humanas.

22. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 21, CARACTERIZADAS porque las células sanguíneas son linfocitos de sangre periférica, plaquetas, neutrófilos o monocitos.

23. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADAS porque son identificadas por medio de evaluación fenotípica.

24. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 23, CARACTERIZADAS porque la identificación de tolDCs se realiza evaluando: (i) la producción de las citoquinas IL-6, y IL-12p70 que debe ser disminuida con respecto a DCs maduras inmunogénicas; y (ii) ausencia o expresión reducida de marcadores de superficie en comparación con DCs maduras inmunogénicas, donde los

marcadores de superficie son seleccionados entre CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos.

25. Las células dendríticas tolerogénicas con antígenos específicos de acuerdo con la reivindicación 24, CARACTERIZADAS porque la evaluación de la producción de IL-6, y IL-12p70 y de la expresión de marcadores de superficie CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, o combinaciones de ellos se realiza a través de la técnica seleccionada de ELISA, citometría de flujo, Western Blot y también a nivel de transcripción o RNA mensajero por RT-PCR.

26. Uso de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos, CARACTERIZADO porque es útil en la producción de una terapia para tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

27. Uso de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs) con antígenos específicos, CARACTERIZADO porque sirve en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de Lupus Eritematoso Sistémico (LES).