

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 336**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2009 E 09719558 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **29.12.2010 EP 2265954**

54 Título: **Métodos y moléculas inmunoterapéuticos**

30 Prioridad:

**11.03.2008 GB 0804459**

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

**12.02.2013**

73 Titular/es:

**CELL MEDICA LIMITED (100.0%)  
27 Fitzroy Square  
London W1T 6ES, GB**

72 Inventor/es:

**TOPP, MAX STANLEY**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio**

**ES 2 395 336 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y moléculas inmunoterapéuticos.

5 **[0001]** La presente invención se refiere a métodos inmunoterapéuticos, y moléculas y células para usar en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia de la infección *Aspergillus*, que incluye la inmunoterapia adoptiva.

**[0002]** El listado o discusión de un documento aparentemente antes publicado en esta especificación no debería ser necesariamente tomado como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general.

10 **[0003]** Las complicaciones infecciosas son la causa principal de muerte en individuos inmunosuprimidos e inmunocomprometidos, que incluyen pacientes que reciben trasplantes de células madre hemotopoyéticas alogénicas (HSCT). Las micosis sistémicas son muy frecuentes y también los patógenos más perjudiciales que invaden pacientes <sup>1,2</sup> con inmunodeficiencias. *Aspergillus fumigatus* es el hongo más importante en este subgrupo, causando sobre todo infecciones invasivas de la orofaringe y el sistema respiratorio con una mortalidad de hasta el 80% en algunas cohortes<sup>3</sup> de pacientes. Con el avance de nuevas modalidades de tratamiento para ofrecer a pacientes no médicamente aptos de otro modo una HSCT alogénica potencialmente curativa, la incidencia de Aspergillosis Invasiva (IA) y la mortalidad atribuida a ella se ha incrementado más en los últimos años. Este cambio epidemiológico se observó a pesar del amplio uso de nueva quimioterapia antifúngica tal como voriconazol <sup>3,4</sup>. Por tanto están altamente garantizadas opciones más eficaces de prevención y tratamiento para el control de infecciones *A. fumigatus* en pacientes que experimentan HSCT alogénico.

15 **[0004]** *Aspergillus* es un grupo de alrededor de 200 especies de moho halladas en todo el mundo. Como está distribuido por doquier, se estima que los humanos inhalan presuntamente varios cientos de conidios de *Aspergillus* cada día. Algunas de las especies de *Aspergillus* se asocian con enfermedades infecciosas patógenas en humanos y animales, que incluyen *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus flavus*. La enfermedad alérgica se atribuye principalmente a *A. fumigatus* y *A. clavatus*. *Aspergillus fumigatus* es un hongo filamentoso y saprófito que sobre todo se encuentra en la tierra.

20 **[0005]** A pesar del constante contacto con patógenos, los individuos sanos en general no desarrollan infecciones sintomáticas de *Aspergillus* lo que implica que una respuesta inmune local eficaz debe ser existente y capaz de quitar la infección<sup>5</sup>. La primera línea de defensa para evitar que los conidios de *A. fumigatus* se conviertan en hifas invasivas patógenas son macrófagos alveolares que fagocitan conidios inhalados y eliminan el patógeno mediante intermedios intracelulares reactivos con oxígeno (ROI)<sup>6,7</sup>. Si *A. fumigatus* sin embargo comenzara a invadir al huésped comenzando la germinación, la segunda línea de defensa innata se activa. Granulocitos neutrofilicos se adhieren a la pared hifal y liberan tanto ROI como enzimas hidrolíticas en proximidad cercana al hongo dando lugar a un daño irreparable a la pared fúngica<sup>6</sup>.

25 **[0006]** En receptores de SCT alogénica múltiples factores adversos contribuyen a la alta incidencia de infecciones de *A. Fumigatus*. En primer lugar, la barrera epitelial y mucosal respiratoria es dañada considerablemente por los regímenes condicionantes dando lugar a germinación más extendida de conidios<sup>1</sup> inhalados. En segundo lugar, los recuentos de granulocitos neutrofilicos se reducen transitoriamente en el paciente tratado resultando en una línea secundaria inferior de defensa innata. Los recuentos de granulocitos neutrofilicos se reconstituyen en promedio en el día 12-15 tras el trasplante de células madre periféricas alogénicas, conllevando una protección enormemente aumentada contra la infección bacteriana. Pero a pesar de esta temprana reconstitución neutrófila en receptores de HSTC alogénicas, el índice de infecciones fúngicas continua elevada durante los posteriores meses<sup>3,4</sup>.

30 **[0007]** Una explicación potencial para esta observación es la supresión inmune prolongada llevada a cabo para la prevención y tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), que implica que la inmunidad adaptativa puede también contribuir al control del IA. Esta hipótesis está reforzada por numerosos sistemas de modelo murino que muestran que la infección previa con dosis subletales de conidios de *A. Fumigatus* y otros antígenos fúngicos protege a los ratones contra la reexposición letal con el patógeno<sup>8-10</sup>. Además, la transferencia adoptiva de células T CD4<sup>+</sup> procedentes de animales inmunizados transfiere inmunidad protectora a ratones receptores naive por lo demás susceptibles, enfatizando el papel

crucial de la inmunidad adaptativa en la protección del huésped<sup>11,12</sup>. Además de estos datos, las condiciones de aplicación de experimentos con ratones que favorecen una respuesta celular T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub> CD4<sup>+</sup> T revelaron que solamente células TH<sub>1</sub> CD4<sup>+</sup> T protegieron al huésped de la exposición letal con *Aspergillus*, mientras que la inducción de respuestas T<sub>H2</sub> a menudo agravaron la enfermedad<sup>8,13</sup>.

5 **[0008]** El alérgeno de *Aspergillus* f16 ha sido el foco de estudios por otros, y se han investigado <sup>27,28,48</sup> inmunorespuestas a varios péptidos.

10 **[0009]** Trabajos recientes por el grupo de inventores usando extracto de *A. fumigatus* crudo así como trabajos realizados por otros grupos, demostraron que humanos sanos también presentan una respuesta de memoria para este hongo patógeno<sup>14-17</sup>. Como en roedores, la respuesta de células T está dominada por las células T CD4<sup>+</sup> con un fenotipo sesgado por T<sub>H1</sub>. Sin embargo, no ha sido posible hasta ahora convertir estos hallazgos básicos en aplicaciones medicas porque la población de células T de memoria específica para *A. fumigatus* no ha sido adicionalmente caracterizada por identificación de antígenos inmunogénicos.

15 **[0010]** Las enfermedades humanas asociadas con *Aspergillus* incluyen Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA), Aspergilosis Invasiva (IA), Aspergiloma, y sinusitis *Aspergillus* crónica. ABPA es causada por la presencia de *Aspergillus* en la región broncopulmonar que lleva a inflamación y respuestas alérgicas. Bronquiectasia y degeneración pulmonar a largo plazo se desarrolla con síntomas parecidos al asma. La Aspergilosis invasiva es asociada con inmunodeficiencias. La infección normalmente comienza en los pulmones y puede transferirse a otros órganos. La tasa de mortalidad asociada con IA es elevada. El aspergiloma aparece cuando otras afecciones crean cavidades en los pulmones que permite que las esporas de *Aspergillus* germinen y colonicen la zona, formando una bola fúngica. La enfermedad es a menudo crónica e incurable. La sinusitis *Aspergillus* crónica se desarrolla en el seno nasal de forma parecida al aspergiloma en los pulmones. Existe una creencia cada vez mayor de que muchos problemas sinusales crónicos son un resultado de reacciones alérgicas a los hongos.

20 **[0011]** Ramadan et al (2005) Clin. Exp. Immunology 139, 257-267 describe la generación de respuestas de células T T<sub>H1</sub> dirigidas a un epítipo restringido de HLA de Class II del alérgeno *Aspergillus* f16.

**[0012]** Banerjee et al (2001) Clin. Exp. Allergy 31, 761-770 describe la clonación y expresión del alérgeno *Aspergillus fumigatus* Asp f16.

25 **[0013]** Presentamos datos sobre la identificación del contexto de HLA en que un epítipo inmunodominante del antígeno Asp f16 se presenta para el reconocimiento del sistema inmune en humanos. Este es HLA-DRB1\*04, el alelo MHC Clase II más abundante en la población humana y demostramos que dichas células T específicas de epítipo pueden ser activadas por células que presentan antígenos alimentados con conidios o hifas germinantes de *A. fumigatus*. Además también demostramos que células inmunes innatas pueden estar condicionadas por inmunidad de células T específicas de *Aspergillus* que resulta en la matanza aumentada de *Aspergillus fumigatus* por células inductoras innatas.

30 **[0014]** Sorprendentemente, hemos hallado que células T CD4<sup>+</sup> específicas para el péptido restringido HLA-DRB1\*04 que contienen el epítipo o un fragmento inmunogénico del mismo son específicamente activadas por la germinación de conidios e hifas de *A. fumigatus*, mientras que los conidios en reposo tienen únicamente capacidad estimuladora limitada y otros patógenos fúngicos como *Candida albicans* fallan al inducir la activación..

35 **[0015]** Las células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Aspergillus* son útiles en terapia de células T adoptiva que puede ser beneficiosa en pacientes con evidencia de enfermedad relacionada con *Aspergillus*, o para terapia profiláctica o preventiva, por ejemplo en receptores de HSCT asintomáticos. El descubrimiento de la restricción de HLA del péptido inmunodominante FHT permite la identificación de pacientes específicos que pueden beneficiarse del uso de este péptido en protocolos de inmunoterapia. Además de esto cualquier producto celular fabricado usando este péptido puede usar el descubrimiento de la restricción de HLA para enumerar y definir el producto celular así como rastrear las células T específicas de *Aspergillus* directamente *ex vivo* usando técnicas tales como la tecnología MHC multímera como se indicó antes. *ex vivo* usando técnicas tales como la tecnología multímera MHC como se trata antes.

40 **[0016]** Los siguientes péptidos, péptidos, polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped son útiles en la práctica de la invención.

45 **[0017]** Un primer aspecto de la invención proporciona un péptido de peso molecular menor que 5000 que

comprende la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW, donde el péptido es capaz de unir HLA-DRB1 04 y donde cuando se une a HLA-DRB1 04 el HLADRB1 04 péptido-unido es capaz de identificar células T específicas para *Aspergillus fumigatus*.

5 [0018] El péptido específico con la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW ha sido llamado el péptido FHT, y se ha mostrado que se une a HLA-DRB1 \*04.

[0019] HLA-DRB1\*04 incluye los subtipos DRB1\*0401, DRB1\*0402, DRB1\*0403, DRB1\*0404 y DRB1\*0408. Para evitar cualquier duda incluimos todos ellos en el término DRB 1\*04.

[0020] El péptido de la invención se unirá a HLADRB1 \*04 que es uno de los alelos HLA Clase II más frecuentes en la población humana.

10 [0021] Si se une o no un péptido a HLADRB1\* 04 puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica. Un método adecuado se muestra en el Ejemplo 1, con particular referencia a la Figura 2B. Un método es introducir el péptido en PBMCs tomados de un HLADRB1\*04 humano y determinar si se obtiene o no una respuesta activadora o proliferativa que es indicativo de unión. La unión a HLA-DRB1\*04 puede también ser determinada usando los métodos descritos en las Figuras 7 y 8.

15 [0022] El reconocimiento de patógenos o enfermedades dañinos que causan mutaciones dentro del propio tejido sucede mediante dos mecanismos dentro del sistema inmune humano. Las moléculas de anticuerpos expresadas por células B se unen con moléculas biológicas, normalmente expresadas sobre la superficie de microorganismos invasores o de las propias células anormales, de modo altamente específico y etiquetarán estas moléculas de un modo que desencadenará una respuesta inmune apropiada. Además de la respuesta  
20 de anticuerpos, patógenos y enfermedad que causan mutaciones pueden ser detectados debido a proteínas únicas expresadas por los patógenos o las mutaciones. Estas proteínas se dividen en pequeños fragmentos de péptidos por sistemas de degradación de proteínas continuos y naturales en la célula humana. Los fragmentos de péptidos se unirán con moléculas especiales, denominadas moléculas MHC Clase I y MHC Clase II, expresadas en la superficie de todas las células. En el humano, estas moléculas son denominadas  
25 moléculas HLA y se numeran según el gran número de alelos que existen en la población humana.

[0023] En el humano, los fragmentos de péptidos derivados de patógenos se unen con moléculas específica de HLA y se transportan a la superficie de la célula. Los péptidos son capturados en una configuración particular que permite que los péptidos sean detectados por receptores de células T ("TCRs") expresados en la superficie de células T. Mediante selección natural y procesos de desarrollo que están vinculados a la  
30 capacidad del sistema inmune para detectar señales de peligro en conexión con la presencia de un organismo extraño, el del cuerpo humano producen células T con TCRs que pueden reconocer y distinguir entre fragmentos de péptido derivados de un patógeno dañino y péptidos que se derivan de microorganismos dañinos o del propio tejido sano.

[0024] Moléculas MHC Clase I presentan péptidos derivados principalmente de proteínas encontradas dentro de la célula para células CD8+ T, también denominadas células citotóxicas T o CTL. Los péptidos que se unen a moléculas MHC Clase I son normalmente de 8-10 aminoácidos de longitud. Las moléculas MHC Clase II presentan péptidos derivados de proteínas u organismos que han sido endocitosados del medio extracelular. Las moléculas MHC Clase II presentan péptidos para células CD4+ T, también denominadas células cooperadoras T aunque las células CD4+ T pueden también tener funciones directas  
40 citotóxicas. Los péptidos que se unen a moléculas MHC Clase II son relativamente libres en términos de longitud, aunque los péptidos de Clase II normalmente entran dentro de un intervalo de 13 -17 aminoácidos, por ejemplo 14 o 15 o 16 aminoácidos.

[0025] Una particular ventaja de un péptido de la invención, particularmente el péptido FHT, es que se une a la molécula HLA-DRB1\*04 que está presentada en un alelo HLA muy corriente en la población del  
45 paciente, de ahí que es posible tratar muchos más pacientes que un péptido que está en un alelo HLA raro. Entre los individuos que expresan HLA DRB1\*04, se hallaron células T de respuesta en todos los casos ensayados que indica que el péptido FHT representa un epítipo inmunodominante.

[0026] Por "péptido" incluimos no solamente moléculas en que los residuos aminoácidos están unidos por enlaces péptidos (-CONH-) sino también moléculas en que la unión peptídica es invertida. Dichos retro-  
50 inverso péptidomiméticos pueden hacerse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Mézière et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica hacer pseudopéptidos

que contienen cambios que implican al esqueleto, y no a la orientación de las cadenas laterales. Mézière *et al* (1997) muestra que, al menos para las respuestas de células cooperadoras de clase T y MHC Clase II, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retro-inversos, que contienen uniones NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

- 5 **[0027]** Asimismo, el enlace peptídico puede ser totalmente prescindible siempre que se use una fracción apropiada de enlace que retenga el espaciado entre los átomos Cα de los residuos aminoácidos; se prefiere particularmente si el fragmento de enlace tiene sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente las misma planaridad de una unión peptídica.
- 10 **[0028]** Se apreciará que el péptido puede ser convenientemente bloqueado en su N- o C-terminal a fin de ayudar a reducir la susceptibilidad de digestión exoproteolítica. Asimismo, se apreciará que el péptido de la invención pueda estar en forma de sal o pueda contener ésteres adicionales de grupos -OH o -COOH o amidas de grupos -NH<sub>2</sub>. Los péptidos de la invención son definidos en las reivindicaciones. Las siguientes definiciones de "porción de al menos II aminoácidos", y "variante" se usan respecto al complejo HLA-péptido de la invención.
- 15 **[0029]** Por una "porción de al menos II aminoácidos" de la secuencia aminoácida dada queremos decir al menos 11 o 12 o 13 o 14 aminoácidos consecutivos de la secuencia dada de forma que el péptido que contiene la porción y preferiblemente la propia porción es aún capaz de unir la molécula de HLA en básicamente el mismo modo que un péptido que consiste en la secuencia aminoácida dada o el péptido FHT. Preferiblemente, el péptido que comprende la porción es capaz de unirse a la molécula HLA en sustancialmente el mismo modo que un péptido que consta de la secuencia aminoácida dada.
- 20 **[0030]** Por una "variante" de la secuencia aminoácida dada queremos decir que las cadenas laterales de uno o dos o tres de los residuos aminoácidos están alteradas (por ejemplo por sustitución con la cadena lateral de otro residuo aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de forma que el péptido es aún capaz de unirse a la molécula HLA en sustancialmente el mismo modo que un péptido que consiste en la secuencia aminoácida dada. Por ejemplo, un péptido puede estar modificado de modo que al menos mantiene, si no mejora, la capacidad de interactuar con y unirse a HLADRB1\* 04. y de manera que al menos mantiene, si no mejora, la capacidad de generar células T CD4\* activadas que pueden reconocer *Aspergillus fumigatus*. Normalmente, las alternativas aminoácidas son conservadoras por naturaleza, tal como los de los grupos Gly, Ala; Ile, Leu, Val; Ser, Thr; Tyr, Phe, Trp; Glu, Asp; Gln, Asn, His, Met, Cys, Ser.
- 25 **[0031]** Se prefieren péptidos de al menos 15 aminoácidos, Así, la invención también incluye péptidos de 16 o 17 o 18 o 19 o 20 o 21 o 22 o 23 o 24 o 25 aminoácidos que contienen la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW. Como antes se indicó, los péptidos de la invención son capaces de unirse a HLA-DRB1 \*04.
- 30 **[0032]** Aquellos residuos aminoácidos que no son esenciales para interactuar con el receptor de células T pueden modificarse por sustitución con otro aminoácido cuya incorporación no afecta sustancialmente la reactividad de las células T y no elimina la unión al alelo HLA relevante.
- 35 **[0033]** Los péptidos de la invención (y para uso en la invención) son menos de 5 000 y normalmente unos 4 000 o 3 000 o 2 000. En términos del número de residuos aminoácidos, los péptidos de la invención pueden tener menos de 30 o 20 o 19 o 18 o 17 o 16 o 15 o 14 o 13 o 12.
- 40 **[0034]** Se apreciará de lo siguiente que en algunas aplicaciones los péptidos de la invención pueden usarse directamente (es decir no son producidos por expresión de un polinucleótido en una célula del paciente o en una célula dada a un paciente ); en dichas aplicaciones se prefiere que el péptido tenga menos de 30 o 25 o 24 o 23 o 22 o 21 o 20 o 19 o 18 o 17 o 16 o 15 o 14 o 13 o 12 residuos.
- 45 **[0035]** Los péptidos de la invención son capaces de unirse a HLA-DRB1\*04. Se prefiere particularmente que los péptidos se unan selectivamente a HLA-DRB1\*04.
- [0036]** Se prefiere adicionalmente que los péptidos de la invención sean unos que puedan usarse para generar células T CD4+ específicas de péptidos que median la matanza específica de *Aspergillus fumigatus* y en particular conidios e hifas germinantes de *A. fumigatus* bien a través de funciones inductoras citotóxicas o por mejora de las funciones inmunes innatas (ver Ejemplos).
- 50 **[0037]** Los péptidos de la invención son particularmente útiles en métodos inmunoterapéuticos para

5 combatir la infección de *Aspergillus*. En particular, el péptido en combinación con la molécula HLA específica puede usarse para seleccionar y definir células T adecuadas, y rastrearlas una vez que se ponen en el paciente, como se trató antes. Se prefiere particularmente que en todos los métodos inmunoterapéuticos de la invención que el paciente a tratar sea uno que lleve HLA-DRB1\*04 Clase II (es decir tenga un genotipo positivo en HL4 Clase II- DRB1\*04), y tenga la célula que presenta antígeno que expresan HLA-DRB1\*04.

10 **[0038]** Los péptidos de (y para uso en) la invención son unos que ligan HLA-DRB1\*04 y cuando se unen así el complejo HLA-DRB1\*04-péptido, cuando está presente en la superficie de una célula adecuada que presenta antígenos, es capaz de provocar una respuesta inmune mediada por células T que media o ayuda a mediar el ataque de los sistemas inmunes sobre *Aspergillus fumigatus*. En particular, la producción de citoquinas por una célula T CD4+ puede mediar el ataque sobre *A. fumigatus*.

**[0039]** Es bien sabido que una longitud óptima para que un péptido se una a una molécula HLA Clase II es alrededor de 13 a 17 aminoácidos, tal como 13, 14, 15, 16 o 17, preferiblemente 15 aminoácidos.

15 **[0040]** Un péptido particular preferido para uso en los métodos, formulaciones farmacéuticas y medicamentos de la invención consiste en la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW.

20 **[0041]** Si un péptido que es mayor que alrededor de 15 residuos de aminoácidos se usa directamente para unirse a una molécula HLA Clase II, se prefiere que los residuos que flanquean la región central de unión de HLA sean unos que no afecten sustancialmente la capacidad del péptido para unirse a la molécula HLA o para presentar el péptido a una célula T específica de *Aspergillus*. Sin embargo, se apreciará que pueden usarse péptidos mayores, especialmente cuando sean codificados por un polinucleótido, puesto que estos péptidos más grandes pueden ser fragmentados por células adecuadas que presentan antígenos.

25 **[0042]** Los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados usando cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo por el modo de poliamida Fmoc de síntesis de péptidos en fase sólida como se revela por Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 y sus referencias. Reactivos para la síntesis de péptidos están generalmente disponibles de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK así como de muchos otros proveedores comerciales de reactivos biológicos y químicos. La purificación puede ser efectuada por cualquiera o una combinación de técnicas tales como cromatografía de exclusión de tamaños y (principalmente) cromatografía líquida de alto rendimiento. El análisis de péptidos puede hacerse usando cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y por análisis espectrométrico de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB).

30 **[0043]** Como se discute en más detalle abajo, estos péptidos pueden usarse para crear multímeros MHC por medio de los cuales el péptido es capaz de unirse a y en consecuencia estabiliza la molécula específica HLA-DRB1\*04. Esto permite que la molécula HLA sea multimerizada y conjugada a una molécula fluorescente o un lecho magnético. Este multímero puede después reconocer y unirse directamente a una célula T específica de *Aspergillus* mediante el TCR. Al usar esta técnica las células puede ser directamente seleccionadas de células cultivadas o frescas o enumeradas tanto en productos de terapia celular como en muestras de sangre de pacientes que hayan recibido un producto de terapia celular. Es imposible usar esta tecnología de multímeros MHC sólo con conocimiento del péptido, ya que la célula T sólo se unirá al péptido que se presenta en el contexto de la molécula correcta HLA.

**[0044]** Se apreciará que el péptido se usa normalmente en un contexto específico de HLA-DRB1\*04.

35 **[0045]** Un segundo aspecto de la invención proporciona un polipéptido que es una fusión de un péptido de la invención y otro péptido como se especifica en las reivindicaciones. El otro péptido puede estar fusionado al terminal N del péptido de la invención o al terminal C del péptido de la invención o, en algunas realizaciones otros péptidos (el mismo o distinto) pueden estar unidos a tanto el terminal N o el terminal C del péptido de la invención. Normalmente, estos péptidos pueden ser útiles para asegurar que el Péptido FHT sea dirigido a través de la vía endosómica para presentación de MHC Clase II. Alternativamente, estos péptidos fusionados pueden estar unidos a sustancias inmunogénicas conocidas de forma que la estructura combinada de péptidos es más eficaz en la inducción de una respuesta inmune humana eficaz contra el *Aspergillus*.

50 **[0046]** El péptido de la invención puede estar comprendido dentro de, o fusionado a una molécula HLA de

forma que el péptido pueda ocupar la ranura de unión al péptido de la molécula HLA. Moléculas de fusión de este tipo, aunque se use un péptido distinto, han sido sintetizadas por Mottez et al (1995) J. Exp. Med. 181, 493-502. Preferiblemente, la molécula HLA a la se fusiona que el péptido de la invención es HLA-DRB1\*04.

5 **[0047]** Un polipéptido de fusión preferido de la invención está entre un péptido de la invención y cadena invariante de MHC Clase II que estabiliza la molécula MHC Clase II y que está implicado dirigir la Molécula HLA por la vía endosómica que lleva a la expresión sobre la superficie de una célula.

**[0048]** Se notará que el polipéptido se usa normalmente en un contexto específico de HLA-DRB1\*04.

10 **[0049]** Un tercer aspecto de la invención proporciona un polinucleótido que codifica un péptido como se define en el primer aspecto de la invención o un polipéptido como se define en el segundo aspecto de la invención. El polinucleótido puede ser ADN o ARN y puede o no contener intrones mientras codifica para el péptido. Por supuesto, son solamente los polipéptidos que contienen residuos aminoácidos que ocurren naturalmente unidos por enlaces peptídicos que ocurren naturalmente los que son codificables por un polinucleótido.

15 **[0050]** Se apreciará que el polinucleótido se usa normalmente en un contexto específico de HLA-DRB1\*04.

**[0051]** Un cuarto aspecto de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un péptido según el primer aspecto de la invención o un polipéptido según el segundo aspecto de la invención.

**[0052]** Se notará que el vector de expresión sea normalmente usado en un contexto específico de HLA-DRB1\*04.

20 **[0053]** Métodos para manipular, cambiar y clonar moléculas de ácido nucleico son bien conocidas en la técnica, por ejemplo Sambrook J y Russell, DW, Clonación Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press describe dichas técnicas incluyendo métodos PCR.

25 **[0054]** Los vectores de expresión adecuados incluyen vectores basados en virus como adenovirales o retrovirales o vectores de virus de vacunas o vectores lentivirales o vectores MV de replicación deficiente.

**[0055]** Vectores generales adecuados de clonación incluyen plásmidos, bacteriófagos (incluyendo bacteriófagos  $\lambda$  y filamentosos), fagémidos y cósmidos.

**[0056]** Células huésped adecuadas incluyen células bacterianas, de levadura, de mamíferos e insectos. Bacterias particulares incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*.

30 **[0057]** Células de levadura particulares incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*.

**[0058]** Células particulares de mamíferos incluyen células CHO, células COS y otras células de mamíferos tales como células que presentan antígenos.

35 **[0059]** Se notará que ciertas células huésped de la invención son útiles en la preparación de los péptidos o polipéptidos de la invención, por ejemplo células de insecto, mamífero, levadura y bacterianas. Por ello, un quinto aspecto de la invención proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención o un vector de expresión de la invención. Se prefiere particularmente que la célula huésped sea una célula huésped humana, tal como una célula que presenta antígenos, que transporta HLA-DRB1\*04 Clase II.

40 **[0060]** Un sexto aspecto de la invención proporciona un método de producción de un péptido del primer aspecto de la invención o un polipéptido del segundo aspecto de la invención, el método comprendiendo cultivar células huésped que contienen un polinucleótido o vector de expresión que codifica el péptido o polipéptido y obtener el péptido o polipéptido de la célula huésped o medio de cultivo. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden también sintetizarse químicamente como se trató antes.

45 **[0061]** Los péptidos de la invención pueden usarse en la producción de células T, particularmente células T CD4<sup>+</sup>, específicas para el polipéptido f16 de *Aspergillus fumigatus* y en particular para un péptido que tiene la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW o una porción de la misma, por ejemplo una porción con 11 o

12 o 13 o 14 aminoácidos contiguos, y que puede ser presentados por HLADRB1\* 04.

- 5 **[0062]** Así, aspectos adicionales de la invención proporcionan composiciones que comprenden un péptido según el primer aspecto de la invención o un polipéptido según el segundo aspecto de la invención cuyas composiciones son adecuadas para crear clones de células T, particularmente clones de células T CD4<sup>+</sup>, específicas para los péptidos, en particular el péptido FHT, cuando se presenta por HLA-DRB1\*04. Dichas composiciones son normalmente estériles y sin pirógenos. La composición es normalmente una composición farmacéutica que contiene un soporte farmacéuticamente aceptable. Normalmente, para la generación de células T, particularmente células T CD4<sup>+</sup>, los péptidos se usan en el intervalo de 200 µM a 1 nM.
- 10 **[0063]** Normalmente, la composición es una composición acuosa. En algunos casos puede ser deseable incluir un agente solubilizante de péptidos tal como DMSO en la composición.
- [0064]** Se notará que el polinucleótido o vectores de expresión de la invención pueden también proporcionarse en una composición farmacéutica que contenga un soporte farmacéuticamente aceptable. Normalmente, estas composiciones serían estériles y sin pirógenos.
- 15 **[0065]** Los péptidos, polipéptidos, polinucleótidos y vectores de expresión pueden ser envasados y presentados para uso como un medicamento. En particular, son para uso en la lucha contra la infección *Aspergillus*. Por "combatir la infección *Aspergillus* " incluimos tratar pacientes que tienen una infección de *Aspergillus*, por ejemplo pacientes que tienen ABPA o Aspergilosis Invasiva (IA) o Aspergiloma o sinusitis de *Aspergillus* crónica. También incluimos administrar los péptidos, polipéptidos, polinucleótidos, vectores de expresión (bien solos o en combinación con, o presentes en o sobre, un antígeno combinado de HLA adecuado que presenta células tales como una célula dendrítica o célula B o monocitos o un APC sintético) no únicamente para pacientes que tengan una infección de *Aspergillus*, sino también para aquéllos en riesgo de infección de *Aspergillus*. Pacientes en riesgo de infección de *Aspergillus* incluyen los que están inmunocomprometidos o inmunoagotados como los que experimentan HSCT alogénico, pacientes de trasplantes de órganos, pacientes autoinmunes que reciben medicamentos inmunosupresores, pacientes con trastornos inmunogenéticos, pacientes de SIDA, o pacientes sometidos a quimioterapia para cáncer o pacientes de leucemia. Así, se notará que "combatir" incluya prevenir (o ayuda a prevenir) la infección de *Aspergillus* y tratar a un paciente profilácticamente.
- 20 **[0066]** Alergia a *Aspergillus*, en particular a *A. fumigatus*, es un problema médico. La invención también incluye el uso de los péptidos, polipéptidos, polinucleótidos y expresiones para combatir la alergia de *Aspergillus*, particularmente la alergia a *A. fumigatus*. Por "combatir la alergia a *Aspergillus*" incluimos tratar la alergia o evitar la alergia. Los péptidos de la invención son particularmente útiles a este respecto.
- 25 **[0067]** La infección de *Aspergillus* puede ser una infección con cualquier *Aspergillus* spp, y en particular una ssp o cepa de *Aspergillus* que incluye la proteína f16 en el proteoma fungico, y más particularmente incluye los péptidos de la invención, particularmente el péptido FHT como parte de la misma. Normalmente, el paciente tiene o está en riesgo de tener una infección de *Aspergillus fumigatus*. Preferiblemente, el paciente es HLA-DRB1\*04-positivo.
- 30 **[0068]** La invención también incluye un método de combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente, el método comprendiendo administrar al paciente una cantidad eficaz de un péptido o polipéptido o polinucleótido o vector de expresión de la invención (ya sea solo o en combinación con, o presente en o sobre, un antígeno adecuado que presente células tal como una célula dendrítica o célula B o célula T o monocito) donde la cantidad del péptido o polipéptido o polinucleótido o vector de expresión sea eficaz para provocar una respuesta anti- *Aspergillus* en dicho paciente. Preferiblemente, el paciente es HLA-DRB1\*04-positivo. Preferiblemente, la célula que presenta antígenos es HLA-DRB1\*04-positiva. La eficacia de este método de la uso de la invención puede normalmente medirse ensayando para presencia de células T específicas de *Aspergillus* en un paciente que de lo contrario no es capaz de generar una respuesta inmune.
- 35 **[0069]** La respuesta anti-*Aspergillus* puede medirse por Elispot, tinción intracelular de citoquinas o por un ensayo de proliferación, o usando tecnología de multimeros MHC.
- 40 **[0070]** Un aspecto más de la invención incluye un kit de partes que comprende un péptido según la invención o un polipéptido según la invención o un polinucleótido según la invención o un vector de
- 45

expresión según la invención y una célula que presenta antígeno. El kit de partes es útil en la preparación de células T activadas específicas de *Aspergillus* como se describe abajo. Preferiblemente, la célula que presenta antígenos es HLA-DRB1\*04 positiva.

5 [0071] Otro aspecto más de la invención incluye una célula que presenta antígenos donde sus moléculas HLA Clase II son cargadas con un péptido de la invención. Normalmente, en todas las realizaciones relevantes de la invención la célula que presenta antígenos contiene una molécula HLA-DRB1\*04 que presenta el péptido.

10 [0072] Células que presenta antígenos preferidas son células dendríticas o células B o monocitos derivadas del donante en el caso del tratamiento de paciente que experimentan HSCT alogénico, y para otros tratamientos las células que presentan antígenos son preferiblemente células dendríticas autólogas o células B o células T (es decir derivadas del paciente a tratar).

15 [0073] Las células que presentan antígeno pueden cargarse con el péptido *in vitro* como se describe en detalle abajo. Alternativamente, la célula que presenta antígenos pueden ser una célula recombinante que expresa el péptido o polipéptido de la invención a partir de un polinucleótido o vector de expresión adecuado.

20 [0074] La célula que presenta antígenos, tal como una célula dendrítica, una célula B o un monocito que está presentando el péptido o polipéptido puede usarse como una vacuna y puede ser envasada y presentada para uso como medicamento. La célula que presenta antígenos que está presentando el péptido puede ser preparada como una composición farmacéutica (es decir por preparación en un soporte farmacéuticamente aceptable) y puede también ser envasada y presentada para uso en combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente. Preferiblemente, la célula que presenta antígenos es autólogo, o es compatible con el paciente a quien va a ser administrada en base a una estrecha concordancia de HLA.

25 [0075] La invención por tanto también incluye un método para combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente, el método comprendiendo administrar al paciente una cantidad eficaz de una célula que presenta antígeno que se carga con el péptido donde la cantidad de dicha célula que presenta antígeno es eficaz para provocar una respuesta anti-*Aspergillus* en dicho paciente. Preferiblemente, el paciente es uno que porta HLA-DRB1\*04 Clase II. Preferiblemente la célula que presenta antígeno HLADRB1\* 04 de Clase II, y presenta el péptido. Las células que presentan antígenos pueden usarse en dosis de células desde  $10^2$  a  $10^7$  células por kg de peso del paciente, dependiendo de si las células son autólogas o únicamente de HLA concordante. En este aspecto de la invención, las células que presentan antígenos puede ser infundido para activar células T *in vivo*.

30 [0076] Células T se activan por células que presentan antígenos tales como células dendríticas. De ahí que la terapia celular pueda implicar células T que hayan sido activadas *ex vivo* y luego infundidas en el paciente.

35 [0077] Así, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para seleccionar células T específicas de *Aspergillus*, el método comprendiendo el contacto de una población de células T con un péptido o polipéptido de la invención presentado en una molécula HLA-DRB1\*04 Clase II a la que dicho péptido se une.

40 [0078] Preferiblemente, la población de células T son procedentes de un individuo que ha estado expuesto a *Aspergillus*, en particular *A. fumigatus*.

[0079] El péptido de la invención puede usarse para generar una expansión de células T específicas para *Aspergillus* para pacientes que son HLA-DRB1\*04 positivos y existen diversas maneras en las que la invención puede usarse.

45 [0080] Como se mencionó previamente el conocimiento de que el péptido se une a la molécula HLA-DRB1\*04 y sólo se reconoce por células T respondedoras en este contexto significa que puede suceder la creación de multímeros MHC que se unirán directamente a las Células T. Este reactivo puede usarse para seleccionar directamente las células específicas de *Aspergillus* del cultivo en masa a fin de infundir células con alta pureza en un paciente.

50 [0081] La invención también incluye el uso de multímero MHC conjuntamente con multímeros adicionales de otras especificidades (a definir) para caracterizar totalmente el producto antes de la infusión para

asegurar la pureza y seguridad del producto. Después de la infusión de Células T de *Aspergillus* al paciente la reconstitución de la inmunidad específica de *Aspergillus* podría ser controlada en el paciente usando el multímero FHT/HLADRB1\* 04 directamente *ex vivo*.

5 [0082] Una aplicación adicional de esta tecnología sería que en lugar de confiar en la capacidad innata de presentación de antígeno de las propias células del paciente para presentar el péptido de la invención a fin de expandir las células que presentan antígeno, podría usarse una célula artificial que presenta antígeno que consiste sea en líneas celulares deficientes en todas las MHC salvo HLA-DRB1\*04 pulsada con el péptido o células que presentan antígeno que pueden ser modificadas para suministrar la coestimulación requerida para la expansión de células T junto con la combinación de péptidos HLA-DRB1\*04 a fin de  
10 estimular y expandir las células T específicas de *Aspergillus*. Estas realizaciones de la invención son tratadas en mayor detalle abajo.

15 [0083] Métodos adecuados para la selección de Células T específicas de *Aspergillus* incluyen el uso de análisis ELISPOT para confirmar las células T de respuesta, como descrito en el Ejemplo 1. Se obtiene sangre de HLA-DRB1\* tipificado de donantes o pacientes. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por medio de centrifugación en Solución Separadora de Biocol (Biochrom, Berlin, Alemania) y bien usada directamente tras la preparación o criopreservada para su posterior uso. Las células son cultivadas en RPMI1640 con L-Glutamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, suplementado con 10% de suero humano acumulado desactivado térmicamente y 100 U/ml de Penicilina-Estreptomina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Líneas de células T específicas de *Aspergillus* son generadas por incubación de  
20  $1 \times 10^7$  PBMC entero por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos con el antígeno péptido FHT durante 7 días. Los cultivos de linfocitos son suplementados con 5 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron, Ratingen, Alemania) cada dos días y el mediodo cultivo es repuesto cuando se necesite. Los clones de células T se generan por estimulación de PBMCs repetidamente con 1 ua/ml de péptido FHT una vez semanalmente durante 4 semanas. Posteriormente los clones de célula T son generados por dilución limitante en placas de  
25 96 pocillos y expandidos usando el protocolo de expansión como descrito por Beck *et al*14. Este sistema de cultivo a pequeña escala puede ser ampliado y adaptado a un "sistema cerrado" por el que pueden ser generadas células T de calidad clínica adecuadas para infusión de nuevo en los pacientes.

30 [0084] Métodos adecuados para seleccionar células T específicas de *Aspergillus* incluyen el uso de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Después de la exposición del donante o paciente de PBMCs al péptido FHT, las células T respondientes son etiquetadas en base a marcadores de activación tal como la regulación ascendente de CD69 o por características de comportamiento tal como la secreción de IFN- $\gamma$ . El etiquetado se logra usando un anticuerpo específico para el marcador de activación o la citoquina segregada y tal anticuerpo está conjugado a un fluorocromo. Las células pueden después ser separadas y seleccionarse mediante un citómetro de flujo equipado para análisis de FACS.

35 [0085] Alternativamente, el etiquetado de las células T respondientes está en base a la unión de un multímero MHC (HLADRB1\* 04), que está conjugado a un marcador fluorescente, al TCR específico en la superficie de la célula T específica de *Aspergillus*.

40 [0086] Métodos adecuados para la selección de Células T incluyen el Sistema de Ensayo de Secreción de Citoquinas que se fabrica por Miltenyi Biotec e implica cuatro pasos claves: 1) exposición de PBMCs (que contienen células que presentan antígeno) de una muestra de sangre a un antígeno inmunogénico (cualquier antígeno, pero en la presente invención sería un péptido de la invención, en particular el péptido FHT); 2) las células T específicas de *Aspergillus* (es decir péptido FHT) respondientes comienzan a segregar IFN- $\gamma$  que está asociado con una respuesta inmune de célula T activa y efectiva y estas Células T respondientes son etiquetadas con un anticuerpo de captura biespecífico que simultáneamente se une a  
45 CD45 (un marcador de célula T) e IFN- $\gamma$ ; 3) un segundo anticuerpo luego etiqueta el IFN- $\gamma$  capturado y al hacerlo etiqueta la célula T que ha segregado el IFN- $\gamma$  este segundo anticuerpo está también conjugado a una perla magnética; 4) las células se pasan a través de una columna magnética y las células T respondientes (que reconocieron el Péptido FHT como probado por la secreción de IFN- $\gamma$  son retenidas en la columna por la perla magnética unida. Las células no etiquetadas son lavadas bien y después se apaga  
50 el campo magnético y las células etiquetadas son liberadas y recogidas como la fracción positiva.

[0087] Se describen métodos para hacer y usar multímeros MHC cargados con péptidos, por ejemplo, en Altman et al (1996) Science 274, 94-96; Kuabel et al (2002) Nature Medicine 8, 631-637; y Neudorfer et al (2007) J. Immunol. Methods 320, 119-131.

**[0088]** La pureza de una población de células T puede determinarse usando el complejo de péptido/multímero MHC etiquetado por fluorescencia como se trata antes.

5 **[0089]** Métodos adecuados para seleccionar células T también incluyen el Sistema de Multímeros MHC, disponible de Proimmune y Stage Pharmaceutical, que funciona creando una construcción artificial de moléculas HLA Clase II que se unen, en el presente caso, al péptido de la invención (por ejemplo el péptido FHT). Estas moléculas HLA autónomas pueden construirse en configuración multimérica de modo que un solo multímero tiene 4-5 moléculas HLA cada una cargada con un péptido de la invención tal como el péptido FHT. Estos multímeros puede ser adjuntos a una perla magnética como antes. Los multímeros son liberados en una muestra de sangre, y el HLA:constructo de péptido se unirá con los receptores de células T que reconocen el Péptido FHT y por ello etiquetará las células T que reconocerán y montarán una respuesta inmune contra el *Aspergillus*. La muestra celular se pasa a través de una columna magnética, y las células etiquetadas son retenidas y después liberadas como se describe antes.

15 **[0090]** Se apreciará de lo anterior que la invención incluye un complejo que comprende una molécula HLADRB1\*04 de Clase II unida a un péptido según el primer aspecto de la invención. Convenientemente, el complejo es un complejo soluble y no unido a una célula. Preferiblemente, la molécula de Clase II es un multímero MHC, como los tratados antes. Preferiblemente, el péptido en el complejo es el péptido FHP, pero puede ser cualquier otro péptido de la invención que formará un complejo, y será útil en provocar una respuesta anti-*Aspergillus* de célula T. Como es claro, el complejo puede usarse para aislar células T específicas de *Aspergillus* como se trató antes. El complejo puede ser también usado para identificar una Célula T específica de *Aspergillus* en una muestra.

20 **[0091]** Así, la Molécula HLA-DRB1\*04 de Clase II que presenta el péptido puede estar presente en la superficie de una célula que presenta antígeno, por ejemplo que está presente en PBMC, o puede ser una molécula sintética HLA soluble de Clase II.

25 **[0092]** Convenientemente, el antígeno se carga en moléculas HLA Clase II expresadas sobre la superficie de una célula adecuada que presenta antígeno contactando una cantidad suficiente del péptido de la invención, por ejemplo el péptido FHT, con una célula que presenta antígeno en ausencia de otros polipéptidos que pueden completar la unión al alelo HLA objetivo. Convenientemente, la célula que presenta antígeno puede ser transfectada con un polinucleótido o vector de expresión de la invención, y la maquinaria celular carga polipéptidos adecuados dentro de las moléculas HLA Clase II para presentación.

30 **[0093]** Preferiblemente, las células T específicas de *Aspergillus* son CD4<sup>+</sup>, como células CD4<sup>+</sup> TH1, o son células T regulatorias (que son particularmente relevantes para combatir alergias) las células cooperadoras TH1 pueden convertirse a células T regulatorias por exposición a unas células CD8<sup>+</sup> de anticuerpo CD28 (superagonista). Normalmente, entonces, las células son CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y/o CD25<sup>+</sup> y/o Foxp3<sup>+</sup> y/o GITR<sup>+</sup> y/o CD127<sup>+</sup>.

35 **[0094]** En una realización el antígeno se enlaza a la molécula MHC Clase II expresada en la superficie de la célula que presenta antígeno con un enlace flexible adecuado de tal manera que el péptido pueda ocupar la ranura de unión de la MHC Clase II, o alternativamente el antígeno se enlaza a la Cadena Invariante que estabiliza la molécula MHC Clase II y se implica en dirigir la molécula por la vía endosomal común a la presentación de la Clase II de polipéptidos. Así, las célula que presentan antígeno pueden ser células que contienen un polinucleótido (por ejemplo vector de expresión) que codifica el polipéptido de fusión tratado antes.

40 **[0095]** La célula que presenta antígeno puede ser modificada genéticamente para asegurar la expresión de la molécula HLA DRB1\*04 sola o en combinación con los péptidos o polipéptidos de la invención o en combinación con los péptidos de la invención o polipéptidos de la invención y moléculas coestimuladoras que son útiles para mejorar la inmugenicidad del péptido y la capacidad resultante para producir células T específicas de *Aspergillus*. Las células que presentan antígeno pueden exponerse a diversas citoquinas tales como IL-2, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ , que son conocidas por activar células T y para dirigir una respuesta T<sub>H</sub>1.

50 **[0096]** La célula T específica de *Aspergillus* es aislada para uso posterior. Con algunas técnicas es posible aislar un número suficiente de células T específicas para uso terapéutico directamente, pero puede ser necesario expandir o clonar las Células T para producir un número suficiente. Para inmunoterapia adoptiva generalmente se prefiere usar una técnica que permita el aislamiento de un número suficiente de células directamente puesto que esto puede lograrse en un día (mientras que la expansión de la célula puede llevar

varias semanas).

**[0097]** Un procedimiento adecuado para identificar clones de donante específicos de patógenos se describe en Perruccio et al (2005) Blood 106, 4397-4406.

5 **[0098]** Las células T específicas de *Aspergillus* que son dirigidas contra los péptidos de la invención son útiles en terapia. Así, un aspecto adicional de la invención proporciona células T específicas de *Aspergillus* obtenibles por los métodos precedentes de la invención.

10 **[0099]** Un aspecto más de la invención proporciona una célula T específica de *Aspergillus* que es capaz de reconocer el péptido FHT presentado por HLA-DRB1\*04. Normalmente, esta célula T es CD3<sup>+</sup>. Puede ser CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o puede ser CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Normalmente, esta célula T producirá citoquinas y proliferará cuando esté en presencia del péptido FHT cuando se presente por HLA-DRB1\*04, por ejemplo cuando se presente por un célula que presenta antígeno que expresa HLA-DRB1\*04.

15 **[0100]** Las células T activadas específicas de *Aspergillus* de la invención pueden ser envasadas y presentadas para uso como un medicamento. La invención también incluye una preparación farmacéutica que comprende células T específicas de *Aspergillus* de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente, el vehículo es estéril y sin pirógenos. La invención también incluye las células T específicas de *Aspergillus* envasadas y presentadas para uso en combatir la infección de *Aspergillus*. Preferiblemente, los pacientes a tratar son unos que llevan HLA-DRB1\*04 Clase II.

20 **[0101]** Para el tratamiento de pacientes después de HSCT alogénico, las células T específicas de *Aspergillus* normalmente son aisladas de donantes que proporcionan las células madre. Si el número de células T específicas de *Aspergillus* no es suficiente mediante recuperación directa de las células del donante, entonces las células pueden ser expandidas por técnicas bien establecidas de proliferación de células.

25 **[0102]** Sin embargo, en algunas realizaciones las células T son autólogas (es decir del paciente), y en algunas realizaciones las células T pueden ser un donante no relacionado, por ejemplo de un banco de células T que han sido HLA tipificadas.

**[0103]** Las células T específicas de *Aspergillus* activadas pueden ser almacenadas de cualquier modo adecuado, por ejemplo por criopreservación en medio que contiene suero y DMSO como se conoce bien en la técnica.

**[0104]** Los métodos de la invención incluyen por ello métodos de inmunoterapia adoptiva.

30 **[0105]** Se notará que los multímeros MHC cargados con péptido (HLA-DRB1\*04-complejo de péptidos de la invención) puede usarse para determinar si una muestra de sangre contiene células T específicas de *Aspergillus*. Esto puede hacerse en una muestra de un paciente antes del tratamiento y/o durante el curso del tratamiento o tras el tratamiento.

35 **[0106]** Las células T específicas de *Aspergillus* contienen un receptor de célula T (TCR) que está implicado en el reconocimiento de células que expresan el polipéptido. Es útil si el ADNc que codifica el TCR es clonado de las células T específicas de *Aspergillus* y transferido en células autólogas o derivadas del donante para expresión, obviando de ese modo la necesidad de encontrar células T específicas de *Aspergillus* que se produzcan de modo natural que expresen el TCR.

40 **[0107]** Los TCRs de clones de células T específicas de *Aspergillus* de la invención específicos para los péptidos del primer aspecto de la invención como se presentan por HLA-DRB1\*04 están clonados. El uso de TCR en clones de células T específicas de *Aspergillus* se determina usando (i) anticuerpos monoclonales específicos de la región variable de TCR y (ii) RT-PCR con iniciadores específicos para familias de genes V $\alpha$  y V $\beta$ . Una biblioteca de ADNc se prepara de poli-A ARNm extraído de los clones de células T específicas de *Aspergillus*. Se usan iniciadores específicos para la porción del terminal C de las cadenas TCR  $\alpha$  y  $\beta$  y para la porción del terminal N de los segmentos identificados V $\alpha$  y  $\beta$ . El ADNc completo para la cadena TCR  $\alpha$  y  $\beta$  se amplifica con una polimerasa de ADN de alta fidelidad y los productos clonados en un vector de clonación adecuado. Los genes de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  clonados puede ser ensamblados en un TCR de cadena simple por el método descrito por Chung et al (1994) Proc. Natl. Acad Sci. USA 91, 12654-12658. En esta constructo de cadena simple el segmento V $\alpha$ J es seguido de el  
45  
50 segmento V $\beta$ DJ, seguido de el segmento C $\beta$  seguido del segmento citoplásmico y transmembrana de la

- cadena CD3  $\xi$ . Este TCR de cadena simple es luego insertado en un vector retroviral de expresión (puede usarse un panel de vectores en base a su capacidad para infectar linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano maduro y para mediar la expresión de genes: el sistema del vector retroviral Kat es una posibilidad preferida (ver  
 5  
 Roberts et al (1994) Blood 83, 43). Se usa retrovirus amfotrófico de título alto para infectar linfocitos CD4<sup>+</sup> purificados aislados de la sangre periférica de pacientes con tumor según un protocolo publicado por Roberts et al (1994) Blood 84, 2878-2889. Se usan anticuerpos anti-CD3 para desencadenar la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> purificadas, lo que facilita la integración retroviral y expresión estable de TCRs de cadena simple. La eficiencia de transducción retroviral se determina por tinción de basado en T CD4<sup>+</sup> infectadas con anticuerpos específicos para el TCR de cadena simple.
- 10 **[0108]** Los pacientes pueden ser tratados con en entre 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> (más probablemente 10<sup>7</sup>) células T autólogas transducidas específicas de *Aspergillus*.
- [0109]** Otros sistemas adecuados para introducir genes dentro de Células T se describen en Moritz et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4318-4322. Eshhar et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 720-724 y Hwu et al (1993) J. Exp. Med. 178, 361-366 también describen la transfección de células T.
- 15 **[0110]** Así, un aspecto más de la invención proporciona un TCR que reconoce un péptido de la invención, en particular el péptido FHT, en una molécula HLA-DRB1\*04. Normalmente, el péptido se presenta sobre una célula dendrítica o monocito que presenta el antígeno a células T. Las Células T luego segregan citoquinas que a su vez activan monocitos y neutrófilos para una matanza mejorada de *Aspergillus*.
- 20 **[0111]** Al igual que el TCR, se incluyen en la invención moléculas funcionalmente equivalentes al TCR. Estas incluyen cualquier molécula que es funcionalmente equivalente a un TCR que puede realizar la misma función que un TCR. En particular, dichas moléculas incluyen TCRs de cadena simple de tres dominios genéticamente modificados como se hacen por el método descrito por Chunget al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12654-12658, y referido antes.
- 25 **[0112]** Normalmente, el TCR o una molécula funcionalmente equivalente al TCR, reconoce una molécula HLA Clase II expresada sobre la superficie de un célula que presenta antígeno y cargada con un péptido según el primer aspecto de la invención.
- 30 **[0113]** La invención también incluye un polinucleótido que codifica el TCR o la molécula funcionalmente equivalente, y un vector de expresión que codifica el TCR o la molécula funcionalmente equivalente del mismo. Los vectores de expresión que son adecuados para la expresión del TCR de la invención incluyen vectores virales tal como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores de vacunas (incluyendo la cepa MVA deficiente en replicación). Se prefiere, sin embargo, que los vectores de expresión sean unos que sean capaces de expresar el TCR en una célula T después de la transfección.
- 35 **[0114]** La invención también incluye células T, preferiblemente células T CD4<sup>+</sup>, que se han transfectado con un polinucleótido o vector de expresión que expresaba el TCR o molécula funcionalmente equivalente antes mencionado. Las células T pueden obtenerse del paciente o, en el caso de un paciente de HSCT alogénico, de un donante muy similar respecto al tipo HLA.
- 40 **[0115]** La invención también incluye un método de combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente, o de combatir la alergia a *Aspergillus* en un paciente, el método comprendiendo la administración al paciente de un número efectivo de células T específicas de *Aspergillus* de la invención, o una población de células T que se han activado usando el péptido o polipéptido de la invención pero que no se han seleccionado. Para evitar dudas, las células T específicas de *Aspergillus* incluyen las obtenibles por el método para producir células T activadas específicas de *Aspergillus in vitro*, descrito antes, células T específicas de *Aspergillus* CD4<sup>+</sup> que son CD3<sup>+</sup> y que reconocen el péptido de la invención, en particular el péptido FHT como se presenta por un HLA-DRB1\*04, y las preparadas por transfección de una célula T con un polinucleótido o vector de expresión que expresa el TCR o molécula funcionalmente equivalente antes mencionado. Las  
 45 células T de la invención son capaces de combatir la infección de *Aspergillus* selectivamente por segregación de citoquinas en respuesta al antígeno. Preferiblemente el paciente es uno que tiene HLA-DRB1\*04 Clase II.
- 50 **[0116]** Las células T pueden ser autólogas o pueden ser HLA concordantes. Si el paciente está experimentando HSCT alogénico, normalmente las células T específicas de *Aspergillus* son del donante. Cuando la alergia a *Aspergillus* debe ser combatida en el paciente, se prefiere que las células T sean

células cooperadoras T<sub>H</sub>1 o células T regulatorias.

5 [0117] Así, para pacientes que demuestran una reacción alérgica a antígenos de *Aspergillus*, los péptidos de la invención pueden usarse para seleccionar células T regulatorias específicas de antígenos que pueden suprimir respuestas alérgicas. Se notará que las células T regulatorias puedan ser identificadas por marcadores específicos tales como CD25, Foxp3, GITR, y CD127 y la coexpresión de estos marcadores con especificidad de antígeno para los péptidos de la invención permitirá la selección de células T regulatorias para modular respuestas alérgicas a antígenos de *Aspergillus*. Así, un aspecto adicional de la invención proporciona un método de selección de células T regulatorias para la supresión de una respuesta alérgica a *Aspergillus*, el método comprendiendo el uso de los péptidos de la invención en combinación con marcadores para células T regulatorias a fin de crear una formulación celular que pueda usarse para suprimir reacciones alérgicas a *Aspergillus*. Convenientemente, la formulación celular puede hacerse usando niveles altos de IL-2 y células T regulatorias pueden seleccionarse como CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

15 [0118] La eliminación eficaz de patógenos del cuerpo humano a veces depende de la respuesta apropiada de la célula T. Las respuestas T<sub>H</sub>1 están asociadas con vías celulares que implican funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas mientras que las respuestas T<sub>H</sub>2 normalmente implican la producción de anticuerpos por células B que son "auxiliadas" por células T de T<sub>H</sub>2. La eliminación de infecciones *Aspergillus* está normalmente asociada con respuestas T<sub>H</sub>1, y la selección y expansión *ex vivo* de células T T<sub>H</sub>1 específicas de antígenos que usan los péptidos de la invención con la posterior infusión de las células T T<sub>H</sub>1 expandidas en el paciente podría facilitar la eliminación de la infección de *Aspergillus* reestructurando la respuesta inmune dominante en el paciente.

20 [0119] Los péptidos de la invención, solos o en combinación con antígenos de otro patógeno, pueden usarse para activar células inmunes dentro de una muestra de sangre o de tejido o un derivado celular de los mismos obtenida del paciente o un donante sin significativa selección o purificación adicional de tipos de células (una "Formulación de Células no Seleccionadas") con miras a infundir la Formulación de Células no Seleccionadas en un paciente a fin de tratar o evitar la infección de *Aspergillus* sea como objetivo o como uno de diversos patógenos que puedan causar infección en un paciente.

25 [0120] Normalmente, la Formulación de Células no Seleccionadas se caracteriza usando el péptido de la invención complejado con un complejo soluble MHC (HLA-DRB1\*04).

30 [0121] Un aspecto más de la invención proporciona un método de combatir la infección de *Aspergillus*, el método comprendiendo los pasos de (1) obtener células T del paciente; (2) introducir en dichas células un polinucleótido que codifique un TCR, o una molécula funcionalmente equivalente, como se define antes; y (3) introducir las células producidas en el paso (2) en el paciente. Las células T transfectadas son capaces de ayudar a combatir el *Aspergillus*, en particular *A. fumigatus*. Preferiblemente, los pacientes a tratar tienen HLA -DRB1 \*04 Clase II.

35 [0122] Un aspecto más de la invención proporciona un método de combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente, el método comprendiendo los pasos de (1) obtener células dendríticas u otras células que presentan antígeno de dicho paciente; (2) contactar dichas células dendríticas u otras células que presentan antígeno con un péptido o polipéptido o polinucleótido o vector de expresión de la invención *ex vivo*; y (3) reintroducir las células dendríticas u otras que presentan antígeno en el paciente. Preferiblemente, los pacientes a tratar tienen HLA-DRB1 \*04 Clase II.

40 [0123] Los métodos para combatir la infección de *Aspergillus*, y las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención pueden combinarse con otros tratamientos antifúngicos, como el uso de voriconazol.

45 [0124] Grupos particularmente preferidos de pacientes a tratar incluyen (a) pacientes que están inmunosuprimidos después de HSCT alogénico, que pueden ser tratados con Células T específicas de *Aspergillus* de la invención seleccionadas del donante de las HSCs; (b) pacientes que están inmunosuprimidos debido a quimioterapia, infección de VIH o por uso de medicamentos inmunosupresores para enfermedades autoinmunes, que pueden tratarse con células T específicas de *Aspergillus* de la invención seleccionadas del paciente (porque estas probablemente están presentes en números muy pequeños, el número de células puede expandirse en una base *ex vivo*); (c) pacientes de alergia en los que se usan células T regulatorias específicas de antígeno, o se infunden células T<sub>H</sub>1 para redirigir una respuesta T<sub>H</sub>2. En todos los casos se prefiere que el paciente y el donante tengan el alelo HLA-DRB1\*04.

**[0125]** Los péptidos de la invención pueden usarse para crear un anticuerpo monoclonal o policlonal bien a nivel específico de paciente o a nivel de fabricación por lotes donde el anticuerpo se usa para evitar o tratar la infección por *Aspergillus* o para inducir una respuesta inmune celular o humoral primaria o secundaria a *Aspergillus* en un paciente. El anticuerpo incluirá derivaciones idiomáticas de anticuerpos específicos para el Péptido FHT, FHTYTIDWTKDAVTW. Preferiblemente, el anticuerpo reconoce los péptidos de la invención cuando se presentan por una molécula HL4 - DRB1\*04 Clase II.

**[0126]** Así, un aspecto más de la invención proporciona un método de preparación de un anticuerpo que reconoce el péptido FHTYTIDWTKDAVTW. El método puede implicar inmunización de un animal como conejo o ratón o caballo o camello. El método puede usar tecnología de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales. El método puede usar técnicas de selección *in vitro* como visualización de fagos. Preferiblemente, el péptido se presenta por una molécula Clase II HLA -DRB1\*04.

**[0127]** El anticuerpo puede envasarse y presentarse para uso en medicina, particularmente para uso en combatir infección de *Aspergillus*. La invención también proporciona un método de combatir la infección de *Aspergillus* en un paciente administrando una cantidad eficaz del anticuerpo al paciente. Preferiblemente, el paciente es uno que tiene HLADRB1\* 04 de Clase II.

**[0128]** El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Se conocen métodos de preparación de anticuerpos para administración, que incluyen composiciones farmacéuticas.

**[0129]** Los péptidos de la invención pueden usarse dentro de una estrategia de diagnóstico para determina si un paciente pueda estar infectado por *Aspergillus* como evidenciado por el sistema inmune del paciente que demuestra una respuesta diagnósticamente relevante a los péptidos de la invención, normalmente cuando se presentan por HLA-DRB1\*04, o para determinar si un paciente puede ser vulnerable a infección por *Aspergillus* por una respuesta insuficiente o defectuosa a los péptidos de la invención en particular al péptido FHT. Las aplicaciones de diagnóstico incluyen el uso de los péptidos de la invención, normalmente cuando se presentan por HLADRB1\* 04, para identificar donantes adecuados para trasplantes de células madre hematopoyéticas alogénicas donde el objetivo es tener un donante que demuestre inmunidad a *Aspergillus*. El número de células respondientes puede ser muy bajo, de modo que una clasificación de células a pequeña escala puede requerirse para determinar esto. Por ello, la invención incluye un método para determinar si un individuo está infectado con *Aspergillus*, el método comprendiendo determinar si un individuo contiene cualquier célula T específica de *Aspergillus*, cuyas células T son capaces de unirse y ser activadas por una molécula HLA Clase II, en particular HLA-DRB1\*04 que presenta un péptido de la invención. Dichas células T pueden identificarse y cuantificarse, por ejemplo usando los sistemas de selección de célula T tratados antes. Los individuos que contienen células T específicas de *Aspergillus* probablemente combaten una infección, mientras que los individuos que no las contienen, o contienen únicamente un nivel bajo pueden beneficiarse de inmunoterapia adoptiva según la invención. Por otro lado, los individuos que son identificados como conteniendo las células T específicas de *Aspergillus* pueden ser útiles como donantes.

**[0130]** Las moléculas TCR específicas de *Aspergillus* de la invención pueden usarse dentro de una estrategia de diagnóstico para determinar si un paciente puede estar infectado por *Aspergillus* como se evidencia por el etiquetado de células T específicas de *Aspergillus* con moléculas autónomas TCR específicas de *Aspergillus* unidas a un sistema apropiado de etiquetado (normalmente un anticuerpo adjunto a un fluorocromo). Así, la invención incluye un método de determinar si un individuo está infectado con *Aspergillus*, el método comprendiendo usar una molécula TCR de la invención. Las moléculas solubles TCR son, en algún sentido, parecidas a anticuerpos monoclonales y pueden usarse para cuantificar células que presentan antígenos que están presentando un péptido de la invención.

**[0131]** Muestras adecuadas del paciente incluyen una muestra después del examen broncoscópico, tal como uno obtenido después de lavado pulmonar.

**[0132]** Los pacientes tratados por los métodos terapéuticos de la invención son preferiblemente pacientes humanos. Los pacientes tratados por los métodos terapéuticos de la invención preferiblemente son HLA-DRB1\*04. Por ello, puede ser conveniente determinar si un individuo a tratar es HLA-DRB1\*04 o generalmente determina el genotipo HLA. También se prefiere que el donante de cualquier célula T para uso en los métodos terapéuticos de la invención sea HLADRB1\* 04.

**[0133]** La invención ahora se describirá en más detalle por referencia a los siguientes ejemplos y Figuras no

limitativos.

- 5 **[0134] Figura 1. Individuos sanos poseen células de memoria CD4+ funcionales específicas para la proteína Asp f16 de *A. Fumigatus*.** (A) Restimulación de PBMC de 4 donantes sanos distintos estimulados con proteína Asp f16 recombinante durante 1 semana. (B) Restimulación de PBMC a partir de 4 donantes sanos distintos estimulados con proteína Asp f1-H136L recombinante durante 1 semana. (C) Restimulación de una línea de células T generada por estimulación con proteína recombinante Asp f16 con células B autólogas transducidas con el gen *aspf16* o un gen de fusión *asp f16* - cadena invariante (*li-aspf16*) (ejemplo representativo). (D) Inhibición de presentación de antígenos vía MHC clase II por preincubación de células que presentan antígeno con anticuerpos que bloquean MHC Clase II (ejemplo representativo).
- 10 **[0135] Figura 2. Identificación de un epítipo inmunógeno dominante de la proteína Asp f16.** (A) Secuencia aminoácida de proteína Asp f16 y polipéptidos sintéticos. (B) Restimulación de 3 líneas celulares específicas de proteína recombinante Asp f16 derivadas de distintos donantes sanos positivos de HLA-DRB1\*04 con 5 péptidos distintos sintéticos. (C) Líneas celulares T generadas con proteína recombinante Asp f16 o péptido FHT reestimulado con proteína recombinante y péptido (ejemplo representativo).
- 15 **[0136] Figura 3. Clones de célula T específicos de Asp f16 que específicamente reconocen su antígeno objetivo en células dendríticas incubadas con *A. fumigatus*.** (A) Restimulación de clones de células T específicas para el epítipo FHT de Asp f16 con células dendríticas vacías, células dendríticas incubadas con *C. albicans vital* o conidios de *A. fumigatus* o péptido FHT (ejemplos representativos). (B) Restimulación de un clon de célula T específica de Asp f16 FHAT o específica de CMV con células dendríticas incubadas con *A. fumigatus* vital (ejemplo representativos). (C) Restimulación de clones de células T específicos de Asp f16 FHT con células dendríticas incubadas con *A. fumigatus* vital en presencia de anticuerpos de control o bloqueadores de MHC clase II.
- 20 **[0137] Figura 4. La inmunogenicidad basada en Asp f16 de *A. fumigatus* aumenta durante la germinación y el crecimiento hifal.** Reestimulación de un clon de célula T específico de Asp f16 FHT con células dendríticas incubadas con conidios en reposo matados con etanol (0h) o preparaciones fúngicas matadas 4, 8 y 12 horas después de la germinación (ejemplo representativo).
- 25 **[0138] Figura 5. Clones de célula T específica de Asp f16 activados aumentan la matanza fúngica mediada por monocitos.** Sobrenadantes de clones de células T específicas de *Aspergillus* activados por CD pulsada con péptido o antígeno fúngico inducen la actividad fungicida contra conidios de *Aspergillus* en monocitos. Sobrenadantes de clones co-incubados con CD madura no pulsada o medio de cultivo fueron usados como controles (ejemplo representativo).
- 30 **[0139] Figura 6. Interacción propuesta entre inmunidad innata y adaptativa a *A. fumigatus*.** Los macrófagos alveolares fagocitan y matan la mayoría de los conidios inhalados 1. Los conidios que escapan germinan a hifas 2 que pueden ser destruidas por granulocitos neutrofilicos 3. Células dendríticas procesan antígenos fúngicos 4 y activan células inmunes innatas 5 así como células T<sub>H</sub>1 6 que segregan citoquinas para mejorar más los mecanismos antifúngicos de las células efectoras innatas 7 de ese modo ayudando a eliminar la infección.
- 35 **[0140] Figura 7. Líneas celulares expandidas que usan el péptido FHT contienen células T que se unen específicamente al péptido FHT en el contexto de DRB1\*0401.** PBMC de 3 donantes distintos fueron expandidos con el péptido FHT durante 14 o 21 días (IVS - estimulación *in vitro*). Dos de los donantes eran DRB1\*0401 positivo y uno era DRB1\*0408 positivo. Las expansiones específicas de FHT de células T pudieron ser detectadas usando el péptido FHT unido a un multímero de DRB1\*0401 que muestra que células T específicas para FHT pueden ser detectadas por DRB1\*0401/tinción de multímero FHT.
- 40 **[0141] Figura 8. Clones de células T producen IFN $\gamma$  significativamente en respuesta a la reestimulación con LCL restringido en HLA con péptido cargado que a péptido solo probando la restricción de HLA DRB1\*0401/0408 del péptido FHT.**

Usando dilución limitativa, se generaron clones de células T individuales. Después de la expansión, los clones se dejaron sin estimular, o se estimularon con Péptido FHT o se estimularon con LCL restringido en HLA con FHT cargado La producción de IFN $\gamma$  se midió después en un ELISA estándar. En todos excepto uno de los clones, que presentan el péptido FHT en el contexto de HLA-DRB1\*04 aumentó enormemente la producción de citoquinas específicas comparado con el péptido solo indicando que FHT específicamente se

45

50

une a HLADRB1\*04 y la combinación de FHT y HLA-DRB1\*04 puede unirse y activar funcionalmente células T específicas de *Aspergillus*.

**Ejemplo 1: *Aspergillus fumigatus* y la interacción entre Células T específicas de *Aspergillus fumigatus* y la respuesta inmune innata.**

5 **Resumen**

[0142] La Aspergillosis Invasiva (IA) causada por el hongo patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus* constituye una seria complicación especialmente en pacientes sometidos a trasplante de células madre alogénicas (SCT) y se asocia con la sumamente elevada mortalidad y morbilidad relacionada con la infección. En los últimos años se ha hecho evidente que el control con éxito de la enfermedad depende de respuestas inmunes T<sub>H</sub>1 protectoras que mejoran críticamente la función de células efectoras innatas principalmente responsables de la erradicación del patógeno. Evaluamos las respuestas de la célula T a las proteínas Asp f1 y Asp f16 de *A. fumigatus* respecto a la presencia de células de memoria funcional en donantes potenciales de HSCT. Los datos obtenidos indican que la mayoría de individuos sanos poseen células T<sub>H</sub>1 de memoria específica de Asp f16 que son capaces de reconocer y pueden ser activadas por el patógeno durante la infección. Por el contrario las respuestas de célula T específicas de Asp f1 podrían ser detectadas sólo en una minoría de donantes. Además, fue identificado un epítipo inmunodominante para el alelo más abundante de MHC clase II en la población caucásica, que provoca respuestas T<sub>H</sub>1 en todos los donantes ensayados. Además, los sobrenadantes recolectados de células T activadas específicas de *Aspergillus* aumentaron la matanza fúngica mediante células efectoras innatas. Los datos obtenidos permiten el desarrollo de protocolos inmunoterapéuticos para prevención y tratamiento de infecciones de *Aspergillus fumigatus*.

**Materiales y métodos**

**Clonación, expresión y purificación de proteína recombinante Asp f16 y Asp f1**

[0143] El gen que codifica la proteína Asp f16 de *A. fumigatus* (número de registro AY169706 de NCBI) fueron clonados en el vector de expresión eucariota pADNc3.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con terminal N- y C- FLAG®-Tag (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). El gen fue amplificado de ADNc amablemente proporcionado por Utz Reichard (Universidad de Goettingen, Alemania). El gen que codifica la proteína Asp f1 (número de registro M83781 de NCBI) se clonó en consecuencia, omitiendo la secuencia líder (ADNc amablemente proporcionado por Prof. Dr. Stefan Stevanovic', Universidad de Tuebingen, Alemania). Para hacer posible la expresión de la proteína citotóxica Asp f1 en células eucariotas, introdujimos la mutación puntual His136Leu (Asp f1-H136L) lo que disminuyó significativamente la toxicidad en las células productoras, en base a los hallazgos por Yang y Kenealy<sup>18</sup> y Kao *et al*<sup>19</sup>.

[0144] pADNc3.1-aspf16-FLAG y vector de expresión pADNc3.1- aspf1-H136L-FLAG se introdujo en la línea celular humana transgénica phoenix GALV<sup>20</sup> mediante transfección de fosfato de calcio. Fueron cultivadas células parentales así como productoras transfectadas en medio DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementadas con 10% de suero de ternero inactivado por calor (FCS, Biochrom, Berlin, Alemania) y 100 U/ml de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). 24 horas tras la transfección la expresión transgénica del promotor CMV del vector de expresión se mejoró por adición de 1 mM de butirato de sodio (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) al medio de cultivo 21.

[0145] Para purificar la proteína recombinante expresada citoplásmicamente, las células productoras se lisaron con buffer que contiene 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1% de Triton X-100 suplementado con cóctel inhibidor de proteasa (Roche, Mannheim, Alemania) y la proteína recombinantes etiquetada FLAG fue purificada bajo condiciones nativas usando M2-agarosa según las instrucciones de los fabricantes (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). La pureza de la preparación de proteína se determinó por tinción con coomassie de geles poliacrilamida. Los péptidos sintéticos derivados de la secuencia Asp f16 fueron amablemente proporcionados por Prof. Dr. Stefan Stevanovic' (Universidad de Tuebingen, Alemania).

**Generación de líneas celulares T y clones de células T específicos de antígenos**

[0146] Se obtuvo sangre de donantes sanos HLA-DRB1\*-tipificada tras consentimiento. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en solución de Separación Biocoll (Biochrom, Berlin, Alemania) y se usaron tras la preparación o se crioconservaron para posterior uso. Las

células fueron cultivadas en RPMI 1640 con L-Glutamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), suplementadas con 10% suero humano agrupado inactivado por calor y 100 U/ml de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

5 [0147] Líneas celulares T específicas de antígenos fueron generadas por incubación de  $1 \times 10^7$  PBMC entero por pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con  $5 \mu\text{g/ml}$  de proteína recombinante o  $1 \mu\text{g/ml}$  de antígeno péptido durante 7 días. Los cultivos de linfocitos fueron suplementados con 5 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron, Ratingen, Alemania) cada dos días y el medio de cultivo respuesto cuando fue necesario.

10 [0148] Para la generación de clones de células T específicas de antígenos, se estimularon PBMC repetidamente con  $1 \mu\text{g/ml}$  de péptido FHT una vez por semana durante 4 semanas. A continuación los clones de células T se generaron por dilución limitativa en placas de 96 pocillos y se expandieron usando el protocolo de expansión rápida como descrito por Beck et al<sup>14</sup>. Un clon de célula  $\text{CD4}^+$  específica de  $\text{CMV}_{\text{pp65}}$  usado en los experimentos de control fue generado en consecuencia limitando la dilución de células T estimuladas con antígeno péptido pp65 (amablemente proporcionado por Jan Diekmann).

15

#### Transducción retroviral de linfocitos B para la presentación de antígeno endógenamente sintetizado

20 [0149] El gen *aspf16* y un gen de fusión *li-aspf16* que codifica N terminalmente para los primeros 80 aminoácidos de expansión de membrana de la cadena invariante (*li*) fueron clonados en el vector retroviral pLZNGFR-PGK (amablemente proporcionado por Stanley Riddell, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) permitiendo el aislamiento de células establemente transducidas por expresión de una forma truncada del receptor de factor de crecimiento nervioso como descrito previamente<sup>22,23</sup>. El virus infeccioso usado para la transducción de células primarias B se produjo usando la línea celular de envase retroviral phoenix GALV<sup>20</sup>.

25 [0150] Células B activadas con CD40L fueron generadas y transducidas retroviralmente como descrito previamente<sup>24</sup>. Brevemente, fueron cultivadas PBMC enteras sobre células 3T3 NIH transfectadas con CD40L humanas irradiadas con gamma en medio IMDM (Lonza GmbH, Wuppertal, Alemania) suplementadas con 10% de suero humano agrupado, inactivado por calor, 4 ng/ml de IL-4 (R&D systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) y 0.7  $\mu\text{g/ml}$  de ciclosporina A (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). Las células expansivas fueron transferidas sobre células alimentadoras recién preparadas cada 3-4 días. Se realizó transducción retroviral 7 días tras la iniciación del cultivo en la presencia de 8  $\mu\text{g/ml}$  de polibreno (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) facilitado por infección repartida. Células B establemente transducidas fueron aisladas 7 días tras la transducción en base a la expresión de NGFR usando técnicas magnéticas de separación de células (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Fueron usadas células B transducidas activadas con CD40L en una proporción de 1:10 para reestimulación de líneas celulares autólogas específicas de *Aspf16* generadas por estimulación con proteína recombinante.

35

#### Restimulación de Células T específicas de antígeno con proteína, péptido o células B transducidas y ELISA IFN- $\gamma$

40 [0151] Se aislaron monocitos autólogos de PBMC enteras permitiendo que las células se adhieran a platos de cultivo de tejido durante 2 horas y posterior se realizó lavado extensivo para eliminar las células no adherentes. Para la presentación de antígeno de proteína, se cultivaron monocitos durante la noche en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  de proteína recombinante y se recolectaron por abrasión mecánica al día siguiente. Para presentación del antígeno péptido, se incubaron monocitos durante la noche sin antígeno y se recolectaron y pulsaron células con 1  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno péptido durante 1 hora. Se usaron células B autólogas transducidas como células que presentan antígeno (APC) tras cultivo repetido sobre células alimentadoras transfectadas con CD40L humanas irradiadas con gamma.

45

50 [0152] Clones o líneas celulares T específicas de *Aspergillus* fueron reestimulados con monocitos pulsados con proteína o péptido o células B activadas con CD40L transducidas en una proporción de 5:1 o 10:1, respectivamente, durante 24 horas y se realizó ELISA sándwich con sobrenadante de cultivo usando anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (Endogen, Perbio Science, Bonn, Alemania) según protocolos estándar. En algunos experimentos se preincubaron APC con bien 25  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo de control o anticuerpo de bloqueo MHC Clase II (No. 555556. BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) durante 1 hora antes de la adición de las

células T. El anticuerpo siguió presente durante las 24 horas de coincubación de las células T con APC.

### **Re-estimulación de clones de células T específicas de antígeno con hongos matados con etanol o vivos**

5 **[0153]** Se generaron células dendríticas (CD) de monocitos por adición de 500 U/ml de GM-CSF (PromoCell, Heidelberg, Alemania) y 700 U/ml de IL-4 (R&D systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) al medio de cultivo. Se incubaron células dendríticas inmaduras durante 24h con bien conidios vivos de *A. fumigatus* o *C. albicans* u hongos matados por tratamiento con etanol 0, 4, 8 o 12 horas después de la germinación y posteriormente se coincubaron con clones de células T específicas de *Aspergillus* durante 24 horas adicionales. Células dendríticas usadas para la presentación de proteína o antígeno péptido fueron inducidas a madurar por adición de 25 ng/ml de TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml de IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml de IL-6 (all R&D systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania) y 1  $\mu$ g /ml de PGE<sub>2</sub> (Pharmacia, Ratingen, Alemania) antes del pulsado de antígeno y coincubación con células T específicas de antígeno. En un experimento las células la células dendríticas que presentan antígeno alimentadas con conidios vivos de *Aspergillus* fueron incubadas con bien 25  $\mu$ g /ml de anticuerpo de control o anticuerpo de bloqueo MHC clase II (No 555556, BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) durante 1 hora antes de la adición de células T. El anticuerpo ambién se mantuvo presente durante las 24 horas de coincubación de las células T con CD que presenta antígeno. El sobrenadante de cultivo recolectado tras 24 horas fue usado para determinar la activación de célula T por IFN- $\gamma$  ELISA y para determinar la /matanza fúngica por monocitos usando ensayos de confrontación.

### **Cuantificación de la matanza fúngica por monocitos**

20 **[0154]** El sacrificio de conidios de *A. fumigatus* por monocitos fue cuantificado usando ensayos de confrontación. Se coincubaron conidios con monocitos con una multiplicidad de infección de 1 durante 1, 2 y 3 horas. Se habían preincubado los monocitos con sobrenadante de células T sin estimular o estimuladas o medio durante 30 min antes del experimento. Los controles fueron puestos a las 0 horas. Cada configuración experimental fue determinada por cuadruplicado. En el momento apropiado las células T fueron lisadas añadiendo 2 ml de H<sub>2</sub>O helada. 50  $\mu$ g de esta suspensión se añadieron a 250  $\mu$ g de solución salina tamponada con fosfato y 90  $\mu$ g de esta dilución se puso en placa sobre agar Sabouraud. Se cuantificaron colonias tras la incubación a 37°C durante la noche. Fueron realizadas al menos tres repeticiones independientes con células de distintos donantes para cada experimento.

### **Resultados**

#### **30 Identificación de una respuesta de memoria específica de proteína a *Aspergillus fumigatus***

**[0155]** Se ha demostrado que las respuestas de memoria de célula T polarizada a T<sub>H</sub>1 específica para *Aspergillus fumigatus* pueden ser detectadas en células de sangre periférica de individuos sanos por estimulación con extracto de proteína derivada de *Aspergillus*<sup>14</sup>. Antígenos candidatos potenciales con propiedades inmógenicas en esta preparación incluyen Asp f1, que ha mostrado ser capaz de provocar respuestas T<sub>H</sub>2 en pacientes que sufren de enfermedad de hipersensibilidad pulmonar<sup>25,26</sup> y Asp f16, que ha mostrado estimular respuestas CD4<sup>+</sup> así como CD8<sup>+</sup> en cultivos de células de sangre de individuos sanos<sup>27,28</sup>. Se produjeron proteínas Asp f1 y Asp f16 recombinantes en un sistema de expresión eucariota y se purificaron por métodos estándar por medio de FLAG-Tags introducidas. Elegimos específicamente un sistema de expresión de mamíferos para sortear la estimulación de células T no específicas por endotoxina derivada de bacterias. A fin de expresar la ribotoxina Asp f1 eficazmente, mutamos el codón que codifica para el residuo de histidina en la posición 136 implicado en actividad catalítica (Asp f1-H136L, descrito por Yang y Kenealy<sup>18</sup> y Kao *et al*<sup>19</sup>), que casi abolió la citotoxicidad en la línea celular productora.

45 **[0156]** PBMC de 4 donantes sanos distintos fueron estimuladas durante 7 días con proteína recombinante purificada Asp f1- H136L o Asp f16. Las líneas celulares T generadas se volvieron a exponer durante 24 horas a ambas proteínas y la cantidad de IFN- $\gamma$  segregado se cuantificó en el sobrenadante por IFN- $\gamma$  ELISA. La cantidad de IFN- $\gamma$  fue comparada con PMBC autólogas recientes. Niveles de citoquina de al menos 50 pg/ml y/o un aumento de más de 5 veces IFN- $\gamma$  en cultivos reestimulados en comparación con niveles de fondo de citoquinas en cultivos no estimulados se definió como respuesta significativa específica de antígeno. Como se muestra en la Figura 1A todos los donantes ensayados mostraron niveles significativos de IFN- $\gamma$  tras una semana de estimulación con proteína Asp f16 recombinante, mientras que solamente uno de 4 donantes respondió fuertemente a la proteína recombinante Asp f1-H136L, los otros 3 donantes mostraron solamente respuestas marginales (Figura 1B). Como Asp f1 provocó solamente una

respuesta en donantes seleccionados, concentramos nuestros esfuerzos en caracterizar la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa respecto a la respuesta inmunodominante a Asp f16.

5 [0157] Para verificar si la producción observada de IFN- $\gamma$  es específica de antígeno y no debida a contaminación de nuestra preparación de proteína, se clonó *aspf16* ADNc en el vector retroviral pLZNGFR-PGK. Para aumentar la presentación de antígenos por la vía de MHC clase II el segmento de genes que  
10 codifica la parte terminal N de membrana expandida de la cadena invariante (*Ii*) se fusionó con *aspf16* ADNc y el gen de fusión *Ii-aspf16* se clonó en el mismo vector retroviral. Células B autólogas activadas con CD40L de donantes seleccionados fueron transducidas con sobrenadantes que contienen viriones codificando bien para la proteína Asp f16 citoplásmicamente expresada o la proteína de fusión que es canalizada en la vía de  
15 presentación de MHC clase II. Células B transducidas fueron seleccionadas en base a la expresión de NGFR y usadas como re-estimuladoras de líneas celulares T específicas de Asp f16 generadas por estimulación con proteína recombinante. Como se muestra en la Figura 1C, solamente células B autólogas transducidas con el gen de fusión *Ii-aspf16* indujeron una producción significativa de IFN- $\gamma$  en líneas celulares específicas de Asp f16, mientras que tanto células B no transducidas como células B modificadas para expresar Asp f16 demostraron citoplásmicamente una producción no significativa de IFN- $\gamma$  en comparación con PBMC autólogas recientes.

20 [0158] Para tratar la cuestión de si la respuesta de células T observada es mediada por células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, se añadió un anticuerpo que neutraliza MHC clase II. Como se muestra en la Figura 1D la producción de IFN- $\gamma$  desencadenada por Asp f16 podría quedar sin efecto en presencia del anticuerpo bloqueante, mientras que un anticuerpo de control no tenía influencia significativa sobre la producción de citoquina desencadenada por Asp f16. Además, el co-cultivo de células B autólogas retroviralmente transducidas que presentan antígeno Asp f16 sintetizado endógenamente con subconjuntos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> preseleccionados inducía solamente producción de IFN- $\gamma$  muy limitada en la fracción CD8<sup>+</sup>, mientras que células CD4<sup>+</sup> mostraron fuerte activación de células de memoria específicas de *Aspergillus*- (datos no mostrados).  
25

#### Identificación de un epítipo inmunogénico de la proteína Asp f16

30 [0159] A fin de definir un epítipo común de MHC clase II de la proteína Asp f16, se sometieron a un análisis donantes de linfocitos para la expresión del alelo más abundante de MHC clase II HLA-DRB1\*04 y líneas celulares T específicas de Asp f16 fueron generadas como se describe. Los péptidos fueron diseñados en base al algoritmo de predicción de epítipo SYFPEITHI 29 y sintetizados para más de 80% de pureza. Líneas celulares T específicas de Asp f16 de HLA-DRB1\*04 en 3 donantes sanos positivos se expusieron a monocitos autólogos pulsados con péptido como se describe en la Figura 2A. La re-estimulación de líneas celulares T de todos los donantes mostró una producción abundante de IFN- $\gamma$  en respuesta al péptido FHT, lo que sugiere que este epítipo es altamente inmunogénico (Figura 2B). Se vieron respuestas menores con el péptido AST únicamente en 2 de cada 3 donantes y una respuesta mínima a los 3 péptidos restantes VKS, GAE y EVD (Figura 2B). Para confirmar estos resultados se realizó una serie de experimentos cruzados, donde PBMC de donantes positivos de HLA-DRB1\*04 fueron estimulados durante una semana con el péptido FHT o la proteína recombinante Asp f16. Todos los cultivos de células T fueron después expuestos tanto al péptido como a la proteína recombinante durante 24 horas y se cuantificó la producción de IFN- $\gamma$ . De nuevo, la producción de citoquina específica pudo ser detectada independientemente de si las líneas de células T eran generadas con péptido o antígeno de proteína (Figura 2C). En general se vieron mayores niveles de citoquina con cultivos estimulados inicialmente con péptido que con t proteína recombinante.  
40

#### 45 Clones de célula T específicos de epítipo Asp f16 reconocen su antígeno objetivo en células dendríticas incubadas con *A. fumigatus* vivos

50 [0160] Los resultados previos hasta ahora demostraron que todos los individuos sanos poseen células T<sub>H</sub>1 de memoria CD4<sup>+</sup> específicas de Asp f16 y que donantes HLA-DRB1\*04 - positivos en general presentan respuestas sustanciales al péptido FHT de Asp f16. Como los hongos patógenos, en comparación con patógenos virales o bacterianos, son organismos altamente complejos con propiedades antigénicas complejas y múltiples, es también de interés determinar si el antígeno específico investigado es eficazmente procesado y presentado por APC pulsado con hongo para estimular la activación de células T. Para investigar si células T específicas de epítipo de *A. fumigatus* pueden ser específicamente activadas por hongos vivos, fueron establecidos clones de célula T CD4<sup>+</sup> específicos de FHT por dilución limitativa, expandidos y reestimulados con células dendríticas autólogas co-incubadas con bien *Aspergillus fumigatus*

vital, *Candida albicans* vital o con el péptido FHT. Como se muestra en la Figura 3A clones de célula T CD<sup>+</sup> específicos de FHT produjeron grandes cantidades de IFN- $\gamma$  en respuesta a CD alimentadas con conidios de *Aspergillus* vivos o péptido sintético, mientras que CD alimentadas con *Candida* vivos no lograron inducir producción significativa de IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> específicas de FHT. En un segundo juego de experimentos, tratamos la cuestión de si las células dendríticas expuestas a *Aspergillus* vivos podrían activar células T no específicamente. Para responder esta pregunta un clon de célula T CD4<sup>+</sup> específico de CMV<sub>pp65</sub> se co-cultivó con CD autóloga con conidios de *Aspergillus* vivos. Como se muestra en la Figura 3B pudieron detectarse niveles considerablemente inferiores de IFN- $\gamma$  en cultivos de clones de células T con especificidad no relacionada en comparación de clones de células T CD<sup>+</sup> específicos de FHT que mostraron fuerte producción de citoquinas. Además, la secreción de IFN- $\gamma$  por el clon de célula T CD4<sup>+</sup> disminuía enormemente si las células dendríticas que presentan antígeno estaban pre-tratadas con anticuerpos bloqueantes MHC clase II, como sería esperado (Figura 3C).

**[0161]** Cuando *Aspergillus fumigatus* entra en su huésped en forma de conidios por vía aérea y comienza la infección invasiva por iniciación de germinación y brote hifal, investigamos si células T CD4<sup>+</sup> específicas de FHT pueden ser activadas bien por conidios, conidios germinantes o hifas.

**[0162]** Diferentes etapas de crecimiento de *A. fumigatus* fueron sacrificadas con etanol en momentos definidos, alimentadas a CD autólogas y añadidas Células T CD4<sup>+</sup> específicas de FHT. Como se ilustra en la Figura 4 únicamente se detectó producción de citoquinas marginales en cultivos cuando se usaron conidios de *Aspergillus* sacrificados con etanol como antígeno. Cantidades crecientes de citoquina pudieron ser detectadas en un modo dependiente del tiempo en sobrenadantes recogidos de cultivos en los que se permitió que *A. fumigatus* germinara y creciera antes de ser sacrificada con etanol. En conclusión, las células T CD4<sup>+</sup> específicas de FHT son específicamente activadas germinando conidios e hifas de *A. fumigatus*, mientras que conidios en reposo tienen solamente capacidad estimuladora y otros patógenos fúngicos como *C. Albicans* no lograron inducir la activación.

#### **Clones de célula T específicas de Asp f16 activadas aumentan el sacrificio fúngico por monocitos**

**[0163]** Para aclarar si los clones de célula T específicos de Asp f16 son en realidad capaces de mejorar la función efectora de células efectoras innatas, monocitos preincubados con sobrenadantes tomados de cultivos de células T activados con células dendríticas pulsadas con péptido FHT o pulsadas con hongos fueron co-incubados con conidios de *A. fumigatus* vital. Tras 3 horas de incubación los monocitos fueron lisados y el lisado puesto en placa sobre agar Sabouraud para determinar el número de conidios viable que sobreviven dentro de los fagocitos (Figura 5). Mientras que el sobrenadante de control tomado de cultivos de células T co-incubadas con CD sin pulsar tenían apenas efecto en la capacidad de sacrificio de monocitos, el sobrenadante tomado de células T activadas con APC pulsadas con péptido FHT o pulsadas con hongos era capaz de reducir significativamente la supervivencia fúngica tras fagocitosis por monocitos, indicando que factores segregados por los clones de células T activados poseen el potencial para mejorar los mecanismos antifúngicos de monocitos.

#### **Discusión**

**[0164]** En este trabajo hemos mostrado que todos los donantes sanos ensayados poseen células de memoria específicas para la proteína Asp f16 de *A. fumigatus* protein, mientras que la Asp f1 recombinante induce respuestas distintas de células T únicamente en donantes seleccionados. Las respuestas observadas estuvieron mediadas por células de memoria específicas de antígeno del tipo de célula auxiliar T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> que responden con segregación de IFN- $\gamma$  al activarse. Condiciones que desvían las respuestas de célula T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 fueron elegidas específicamente ya que se ha mostrado en el pasado que individuos sanos en comparación con individuos afectados muestran respuestas funcionales T<sub>H</sub>1 a *A. fumigatus*<sup>15,17</sup> y solamente respuestas T<sub>H</sub>1 son protectoras contra la infección de *Aspergillus* en ratones<sup>9,11,13</sup>. Además la transferencia adoptiva de células funcionales T<sub>H</sub>1 es capaz de controlar la mortalidad relacionada con *Aspergillus* en receptores de trasplante en modelo de ratones<sup>12</sup> así como un estudio humano<sup>16</sup>, mientras que las respuestas T<sub>H</sub>2 son a menudo perjudiciales para el resultado de la enfermedad invasiva<sup>8,11,30</sup>. Además, las respuestas de células T específicas de *Aspergillus* desviadas por T<sub>H</sub>2 están asociadas con manifestaciones atópicas que incluyen aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)<sup>25,31</sup> así como el inicio tardío de Aspergilosis pulmonar en pacientes tras SCT alogénico.

**[0165]** La activación de células CD8<sup>+</sup> podría no detectarse al estimular bien con proteína o antígeno de péptido, lo que puede deberse a la relativa ineficiencia de presentación cruzada como se indica por otros

grupos<sup>32,33</sup>. Para tratar la aparente ausencia de respuestas de memoria CD8<sup>+</sup> más específicamente, establecimos APC artificiales modificando genéticamente células B autólogas para presentar el antígeno Asp f16, ya que este sistema artificial en general es muy potente en la estimulación de respuestas de célula T CD8<sup>+</sup><sup>23</sup>. A pesar de este enfoque para aumentar la estimulación de células T mediada por MHC clase I pudimos detectar únicamente muy limitadas respuestas de memoria CD8<sup>+</sup> para Asp f16. Por el contrario, usando las mismas APC modificadas para expresar un constructo de fusión de II-Asp f16 dirigido a MHC clase II las respuestas de memoria CD4<sup>+</sup> fueron rápidamente detectadas, confirmando las condiciones apropiadas de estimulación en nuestros cultivos.

**[0166]** El hecho de que la reexposición con Asp f16, pero no Asp f1 indujo respuestas de memoria T<sub>H</sub>1 en la mayoría de donantes ensayados están de acuerdo con datos previos que asocian el antígeno Asp f16 principalmente con respuestas T<sub>H</sub>1, mientras que el antígeno Asp f1 se conecta principalmente con respuestas T<sub>H</sub>2 y enfermedad atópica. El desafío con el antígeno Asp f16 junto con deoxioligonucleótidos CpG como adyuvante por ejemplo induce una respuesta inmune protectora T<sub>H</sub>1 en ratones<sup>9</sup>. La estimulación de células de sangre periférica humana con Asp f16 por otro lado, ha mostrado que induce proliferación y activación de células de memoria de distintos subtipos de linfocitos T, dependiendo de si la sangre fue tomada de individuos o pacientes sanos padeciendo ABPA<sup>27,34</sup>. El antígeno Asp f1 de *Aspergillus* por el contrario, se ha descrito hasta ahora solamente en conexión con respuestas inmunes alérgicas sesgadas por T<sub>H</sub>2 en ratones y humanos<sup>25,26,35</sup>, luego no es sorprendente que respuestas T<sub>H</sub>1 a este antígeno se observaran ocasionalmente en los individuos sanos investigados en este estudio.

**[0167]** Fuimos además capaces de determinar un epítipo de la proteína Asp f16 restringido por HLA-DRB1\*04 altamente inmunogénico, que reproduciblemente provocaba la producción de IFN- $\gamma$  específico de antígeno en todos los donantes HLA-DRB1\*04-positivos positivamente ensayados para respuestas a la proteína recombinante. Ramadan *et al* ya han descrito previamente la proliferación y activación de linfocitos de sangre periférica de donantes sanos en respuesta al desafío con proteína Asp f16 y péptidos sintéticos<sup>27,28</sup>; sin embargo, las células respondientes resultaron ser CD8<sup>+</sup> citolíticas así como linfocitos CD4<sup>+</sup> y la contribución de esas células citotóxicas a la defensa del huésped contra *A. fumigatus* no ha sido claramente establecida hasta la fecha. Aunque las células T activadas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> así como las células NK han demostrado ciertamente actividad antifúngica directa contra *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* dependiendo del contacto íntimo célula-célula<sup>14,28,36</sup>, los receptores y ligandos cognados implicados en el reconocimiento y el mecanismo exacto de acción siguen ampliamente indefinidos. Además, los linfocitos T citotóxicos obviamente juegan más bien un papel de apoyo en el control real de *A. Fumigatus in vivo*, como puede verse en ratones selectivamente empobrecidos en la función neutrófila por tratamiento de anticuerpos<sup>37</sup>. Aunque los animales tratados estén exclusivamente comprometido en la función neutrófila y todavía posean un repertorio de célula T funcional, rápidamente sucumben a la infección con dosis subletales de *A. fumigatus*, mientras que animales de tipo salvaje sin tratar son capaces de vencer la infección. Esta observación acentúa claramente el papel fundamental de las células efectoras innatas en la erradicación de infecciones fúngicas que puede ser enormemente mejorado pero no hacerse redundante por linfocitos T específicos de antígeno.

**[0168]** También hemos demostrado que los clones generados de células T T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> específicas de Asp f16 son específica y exclusivamente activados por APC que presentan antígeno Asp f16 derivado de *Aspergillus* bien en forma de péptido sintético, proteína purificada u hongo viable y no tienen reacción cruzada con APC pulsadas con *C. albicans* o proteína Asp f1 purificada. También es de gran interés la observación de que un clon de célula T T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> con especificidad no relacionada respondía únicamente con la secreción de citoquinas comparativamente débil por contacto con CD expuestas a *A. fumigatus* vivo, indicando que el efecto estimulante observado no es atribuible a activación inespecífica de células T debido al medio proinflamatorio generado por células dendríticas tras exposición al hongo vivo. Otro hecho que refuerza la especificidad de antígeno de la respuesta es que la activación de linfocitos T es MHC-restringida, ya que el pretratamiento de células que presentan antígeno con anticuerpo bloqueante MHC clase II daña fuertemente la producción de IFN- $\gamma$ .

**[0169]** Un importante factor adicional relacionado con la inmunidad a *A. fumigatus* es el cambio fenotípico de conidios a hifas durante la germinación, que puede ayudar al patógeno a evadir la defensa del huésped<sup>38</sup>. El cambio de un morfotipo a otro está acompañado por pérdida o cambio de señales específicas de patógeno que son importante para la activación y educación de las células que presentan antígeno<sup>2</sup> así como la determinación de la disponibilidad de antígenos fúngicos durante distintas fases de crecimiento del patógeno. Los clones de célula T específica de péptido FHT Asp f16 de *A. fumigatus* fueron capaces de

reconocer su antígeno objetivo con alta especificidad y sensibilidad en células dendríticas que presentan antígeno de conidios germinantes fagocitados o hifas sobrecrecidas, mientras que sólo se detectaron respuestas marginales tras la fagocitosis de conidios en reposo, sugiriendo que la expresión de proteína del antígeno Asp f16 aumenta fuertemente durante la germinación.

5 **[0170]** Además, sobrenadantes tomados de cultivos de células T co-incubadas con células dendríticas pulsadas con hongos eran capaces de mejorar enormemente la actividad antifúngica de monocitos, uno de los brazos efectores de la inmunidad innata contra la infección de *Aspergillus*. El efecto estimulante ejercido por células activadas T<sub>H</sub>1 específicas de antígeno está probablemente basado en IFN- $\gamma$  segregado y factores estimulantes de colonias como G-CSF y GM-CSF, todos los cuales han demostrado extensamente que mejoran los mecanismos efectores antifúngicos de fagocitos y granulocitos<sup>39-41</sup>. También se ha  
10 mostrado que IFN- $\gamma$  junto con G-CSF es incluso capaz de evitar la supresión inducida por corticosteroides de monocitos y la función neutrófila in vitro<sup>42,43</sup>, un efecto que podría potencialmente también contribuir a eliminar Aspergillosis invasiva en receptores de trasplante inmunosuprimidos. Esta hipótesis se fortalece por experimentos con ratones que muestran que los animales vacunados están protegidos contra la  
15 infección letal posterior con *A. fumigatus*, incluso cuando los ratones son reexpuestos durante el tratamiento con corticosteroides<sup>44</sup>. Un diagrama que ilustra la interacción propuesta entre inmunidad adaptativa e innata en el control de la infección de *A. fumigatus* se muestra en la Figura 6.

**[0171]** Con la posibilidad cada vez más exitosa de la inmunoterapia en la prevención y tratamiento de infecciones virales<sup>45</sup> creemos que la inmunoterapia adoptiva dirigida a *A. fumigatus* será igualmente prometedora. La primera percepción de la potencial aplicación en el tratamiento de Aspergillosis invasiva en receptores de trasplantes se obtuvo ya por Perruccio *et al*<sup>16</sup>, mostrando que la transferencia adoptiva de clones de células T CD4+ específicas de *Aspergillus* generados por estimulación con conidios sacrificados con calor se asoció con control de antigenemia de *Aspergillus* y mortalidad relacionada con la infección en los receptores. La terapia de célula T adoptiva puede ser beneficiosa en pacientes con evidencia de enfermedad invasiva, como se hizo en el estudio mencionado, o como terapia preventiva o profiláctica en receptores de trasplante asintomáticos. Una consideración que favorece la terapia preventiva temprana podría ser el riesgo de activación incontenible de célula T y una liberación excesiva de citoquinas resultante induciendo potencialmente daño tisular masivo si la transferencia adoptiva se realiza en pacientes con crecimiento fúngico establecido ampliamente extendido. Por otro lado, la terapia preventiva de células T depende grandemente de la calidad de los ensayos disponibles de detección para la diagnosis de infección subclínica de *Aspergillus*. Esta cuestión es especialmente de interés ya que la diagnosis temprana de Aspergillosis invasiva continúa siendo difícil, a pesar de la disponibilidad de ensayos relativamente sensibles que detectan galactomanan fúngico en suero y métodos de detección basados en la reacción de cadena de polimerasa o  $\beta$ -glucano<sup>46</sup>. Como una alternativa a la transferencia adoptiva de linfocitos T, otra estrategia es la vacunación con células dendríticas que presentan antígenos derivados de *Aspergillus*. Este enfoque puede usarse bien para impulsar la inmunidad en el donante de célula madre antes de la recogida de célula madre, o alternativamente, en el paciente después de trasplante alogénico<sup>47</sup>.

**[0172]** Estos datos juntos demuestran por primera vez la caracterización de un antígeno inmunodominante derivado de *Aspergillus* y la definición de un epítipo específico para un alelo abundante MHC clase II. Además, células T<sub>H</sub>1 CD4+ específicas para este antígeno pueden ser activadas fácilmente por CD después de la absorción de *Aspergillus* vivo, que a su vez son capaces de condicionar célula efectoras innatas para mejorar el control del hongo. Estos resultados proporcionan enfoques inmunoterapéuticos para prevención y tratamiento de Aspergillosis invasiva en receptores HSCT alogénicos, y otros grupos de pacientes.

45 **Ejemplo 2: Reconstitución Inmune contra *Aspergillus fumigatus* en pacientes después de HSCT alogénico usando células T específicas de *Aspergillus* seleccionadas del donante que usa el Péptido FHT**

**[0173]** Este Ejemplo se basa en el tratamiento de pacientes después de HSCT alogénico. En esta aplicación, el donante que ha proporcionado las células madre hematopoyéticas para el trasplante es positivo para HLA DRB1\*04.

50 **[0174]** El péptido es sintetizado en un sintetizador de Applied Biosystems, ABI 431A (Foster City, CA, EEUU) y posteriormente purificado por HPLC.

**[0175]** Se obtiene sangre de un donante HLA-DRB1\*-tipado después de consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) del donante son aisladas por medio de centrifugación

en Solución de Separación Biocoll (Biochrom, Berlin, Alemania) y usadas directamente tras la preparación o crioconservadas para su posterior uso. Las células son cultivadas en RPMI 1640 con L-Glutamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), suplementadas con 10% de suero humano agrupado inactivado por calor y 100 U/ml de Penicilina-Estreptomina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

5 **[0176]** Líneas de células T específicas de antígeno se generan por incubación de  $1 \times 10^7$  PBMCs enteras por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos con 1  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno de péptido FHT durante 7 días. Los cultivos de linfocitos fueron suplementados con 5 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron, Ratingen, Alemania) cada dos días y el medio de cultivo se repuso cuando fue necesario. Después, las PBMCs fueron estimuladas repetidamente con 1  $\mu\text{g/ml}$  de péptido FHT una vez semanalmente durante 4 semanas. Posteriormente los clones de células T fueron generados por dilución limitativa en placas de 96 pocillos y expandidos usando el protocolo de expansión rápida como descrito por Beck et al<sup>14</sup>.

10 **[0177]** Después del control de calidad y ensayos de potencia para determinar la pureza y capacidad funcional de los clones de célula T para mejorar la respuesta inmune innata contra *Aspergillus fumigatus* (descrito antes en el Ejemplo 1), las células son infundidas en los pacientes después de HSCT alogénico a una dosis de  $10^4$  células T específicas de *Aspergillus* por kg de peso del paciente.

15 **[0178]** Después de la infusión, las células T específicas de *Aspergillus* reconocerán el péptido FHT presentado por la célula que presentan antígeno presentes en el paciente. Las células T específicas de *Aspergillus* segregan citoquinas y otros mediadores solubles de la respuesta inmune humana que activan y reclutan neutrófilos, macrófagos, y otras células del sistema inmune innato para montar una respuesta inmune a través de funciones efectoras innatas contra el patógeno *Aspergillus*.

### **Ejemplo 3: Restricción del péptido FHT**

**Líneas celulares expandidas usando el péptido FHT contienen células T que se unen específicamente al péptido FHT en el contexto de DRB1\*0401**

25 **[0179]** PBMC de 3 donantes distintos se expandieron con el péptido FHT durante 14 o 21 días (IVS – estimulación *In vitro*). Dos de los donantes eran DRB1\*0401 positivo y uno era DRB1\*0408 positivo. Las expansiones específicas de FHT de células T pudieron detectarse usando el péptido FHT unido a un multímero de DRB1\*0401 mostrando que las células T específicas para FHT pueden ser detectadas por tinción de multímero DRB1\*0401/FHT (ver Figura 7).

30 **Clones de célula T producen significativamente más IFN $\gamma$  en respuesta a re-estimulación con LCL restringido en HLA con péptido cargado que a péptido solo probando la restricción de HLA DRB1\*0401/0408 del péptido FHT**

35 **[0180]** Usando dilución limitativa, se generaron clones individuales de célula T. Después de la expansión, los clones bien se dejaban sin estimular, estimulados con péptido FHT o estimulados con LCL restringido en HLA con péptido cargado que a péptido solo probando la restricción de HLA DRB1\*0401/0408 del péptido FHT. La producción de IFN $\gamma$  fue medida luego en un ELISA estándar. En todos excepto uno de los clones, presentar el péptido FHT en el contexto de HLA-DRB1\*04 incrementó enormemente la producción específica de citoquina comparada con el péptido solo indicando que FHT específicamente se une a HLA-DRB1\*04 y la combinación de FHT y HLA-DRB1\*04 puede unirse y activar funcionalmente las células T específicas de *Aspergillus* (ver Figura 8).

### **Referencias**

#### **[0181]**

1. Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. (2001) 9: 382-389.
2. Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. (2004) 4: 1-23.
- 45 3. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. Blood. (2002)100: 4358-4366.
4. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of

- allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. (2003) 102: 827-833.
5. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. (1999) 12: 310-350.
6. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*. (1982) 69: 617-631.
7. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*. (2003) 71: 3034-3042.
8. Cenci E, Perito S, Enssle KH, et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun*. (1997) 65: 564-570.
9. Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, et al. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect*. (2002) 4: 1281-1290.
10. Ito JI, Lyons JM, Hong TB, et al. Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. *Infect Immun*. (2006) 74: 5075-5084.
11. Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol*. (2000) 165: 381-388.
12. Bozza S, Perruccio K, Montagnoli C, et al. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood*. (2003) 102: 3807-3814.
13. Rivera A, Van Epps HL, Hohl TM, Rizzuto G, Pamer EG. Distinct CD4+-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. (2005) 73: 7170-7179.
14. Beck O, Topp MS, Koehl U, et al. Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus*. *Blood*. (2006) 107: 2562-2569.
15. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. (2002) 100: 4521-4528.
16. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. (2005) 106: 4397-4406.
17. Graziutti ML, Rex JH, Cowart RE, Anaissie EJ, Ford A, Savary CA. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response. *J Infect Dis*. (1997) 176: 1579-1583.
18. Yang R, Kenealy WR. Effects of amino-terminal extensions and specific mutations on the activity of restrictocin. *J Biol Chem*. (1992) 267: 16801-16805.
19. Kao R, Shea JE, Davies J, Holden DW. Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin. *Mol Microbiol*. (1998) 29: 1019-1027.
20. Horn PA, Topp MS, Morris JC, Riddell SR, Kiem HP. Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood*. (2002) 100: 3960-3967.
21. Palermo DP, DeGraaf ME, Marotti KR, Rehberg E, Post LE. Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J Biotechnol*. (1991) 19: 35-47.
22. Kondo E, Topp MS, Kiem HP, et al. Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. *J Immunol*. (2002) 169: 2164-2171.
23. Adamopoulou E, Diekmann J, Tolosa E, et al. Human CD4+ T cells displaying viral epitopes elicit a functional virus-specific memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. (2007) 178: 5465-5472.
24. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, et al. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly

- efficient antigen-presenting cells to generate autologous antigen -specific Cells Tfor adoptive immunotherapy. *J Clin Invest.* (1997) 100: 2757-2765.
- 5 25. Chauhan B, Knutsen A, Hutcheson PS, Slavin RG, Bellone CJ. T cell subsets, epitope mapping, and HLA-restriction in pacientes with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Clin Invest.* (1996) 97: 2324-2331.
26. Kurup VP, Banerjee B, Murali PS, et al. Immunodominant péptido epitopes of allergen, Asp f 1 from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Polipéptidos.* (1998) 19: 1469-1477.
27. Ramadan G, Davies B, Kurup VP, Keever-Taylor CA. Generation of Th1 T cell responses directed to aHLAClase II restricted epitope from the *Aspergillus f16* allergen. *Clin Exp Immunol.* (2005) 139: 257-267.
- 10 28. Ramadan G, Davies B, Kurup VP, Keever-Taylor CA. Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the *Aspergillus f16* allergen. *Clin Exp Immunol.* (2005) 140: 81-91.
29. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and péptido motifs. *Immunogenetics.* (1999) 50: 213-219.
- 15 30. Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, et al. Interleukin- 4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis.* (1999) 180: 1957-1968.
31. Kurup VP, Xia JQ, Cramer R, et al. Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice. *Clin Immunol.* (2001) 98: 327-336.
- 20 32. Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol.* (1994) 153: 4925-4933.
33. Maecker HT, Ghanekar SA, Suni MA, He XS, Picker LJ, Maino VC. Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J Immunol.* (2001) 166: 7268-7275.
34. Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Johnson BD, Fink JN. Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin Exp Allergy.* (2001) 31: 761-770.
- 25 35. Chauhan B, Santiago L, Kirschmann DA, et al. The association of HLA-DR alleles and T cell activation with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Immunol.* (1997) 159: 4072-4076.
36. Levitz SM, Mathews HL, Murphy JW. Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today.* (1995) 16:387-391.
- 30 37. Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, et al. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis.* (1998) 178: 1750-1760.
38. Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition durante germination through loss of toll-like receptor- 4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* (2003) 188: 320-326.
- 35 39. Nemanitis J. Use of macrophage colony-stimulating factor in the treatment of fungal infections. *Clin Infect Dis.* (1998) 26: 1279-1281.
40. Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun.* (1993) 61: 1185-1193.
- 40 41. Gil-Lamaignere C, Winn RM, Simitsopoulou M, Maloukou A, Walsh TJ, Roilides E. Inteferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: comparison with *Aspergillus* spp. *Med Mycol.* (2005) 43: 253-260.
- 45 42. Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte

- colony-stimulating factor and gammainterferon. *Infect Immun.* (1993) 61: 4870-4877.
43. Roilides E, Lyman CA, Mertins SD, et al. Ex vivo effects of macrophage colony-stimulating factor on human monocyte activity against fungal and bacterial pathogens. *Cytokine.* (1996) 8: 42-48.
- 5 44. Ito JI, Lyons JM. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis.* (2002) 186: 869-871.
45. Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU. CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells Mol Dis.* (2008) 40: 71-75.
46. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2006) 173: 707-717.
- 10 47. Grigoleit GU, Kapp M, Hebart H, Fick K, Beck R, Jahn G, Einsele H. Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: Induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte response even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor. *J Infect Dis.* (2007) 196: 699-704
- 15 48. Zhu F, Ramadan G, Davies B, Margolis DA, Keever-Taylor CA. Stimulation by means of dendritic cells followed by Epstein-Barr virus-transformed B cells as antigen-presenting cells is more efficient than dendritic cells alone in inducing *Aspergillus* f16-specific cytotoxic T cell responses. *Clin. Exp Immunol.* 151, 284-296

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un péptido de menos de 5000 de peso molecular que comprende la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW donde el péptido es capaz de unirse a HLA-DRB1\*04 y donde cuando está unido a HLADRB1\*04 el HLA-DRB1\*04 unido al péptido es capaz de identificar células T específicas para *Aspergillus fumigatus*.
- 2.** Un péptido según la Reivindicación 1 donde el péptido incluyen uniones no peptídicas.
- 3.** Un polipéptido que es una fusión del péptido de la Reivindicación 1 y otro péptido, donde el otro péptido es una cadena invariante de una molécula HLA y donde el péptido de las Reivindicaciones 1 o 2 es capaz de ocupar la ranura de unión del péptido de la molécula HLA.
- 10 **4.** Un complejo que comprende una molécula HLA-DRB1\*04 de Clase II unida a un péptido, donde el péptido es un péptido de menos de 5000 de peso molecular que comprende la secuencia aminoácida FHTYTIDWTKDAVTW o una porción de al menos 11 aminoácidos de la secuencia aminoácida dada, o una variante de la secuencia aminoácida dada donde las cadenas laterales de uno o dos o tres residuos aminoácidos están alteradas, donde el péptido que comprende la porción, o variante, es capaz de unirse a
- 15 **5.** Un complejo según la Reivindicación 4 que es un complejo soluble.
- 6.** Uso *in vitro* de un complejo según las Reivindicaciones 4 o 5 para aislar una célula T específica de *Aspergillus*, o para identificar una célula T específica de *Aspergillus* en una muestra.
- 20 **7.** Un método para seleccionar células T específicas de *Aspergillus*, el método comprendiendo contactar una población de células T con un péptido presentado en una molécula HLADRB1\* 04 Clase II *in vitro*, donde el péptido es un péptido como se define en la Reivindicación 4.
- 8.** Un método según la Reivindicación 7 donde la molécula HLA Clase II está presente en la superficie de una célula que presenta antígeno.
- 25 **9.** Un complejo según la Reivindicación 4 o un método según la Reivindicación 7 u 8 donde la molécula HLA Clase II es una molécula HLA Clase II soluble sintética.
- 10.** Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 9 donde la célula T específica de *Aspergillus* seleccionada es aislada.
- 30 **11.** Células T específicas de *Aspergillus* que son capaces de reconocer el péptido presentado por HLA-DRB1\*04 como se define en la Reivindicación 4.
- 12.** Un receptor de célula T (TCR) que detecta infección de *Aspergillus*, el TCR siendocobtenible de las células T específicas de *Aspergillus* de la Reivindicación 11, donde el TCR, reconoce moléculas MHC Clase II humanas expresadas en la superficie de una célula que presenta antígeno y cargadas con un péptido como se define en la Reivindicación 4.
- 35 **13.** Un TCR según la Reivindicación 12 que es un TCR de cadena sencilla de tres dominios.
- 14.** Células T específicas de *Aspergillus* como se definen en la Reivindicación 11 o células T que comprenden un polinucleótido que codifica un TCR como se define en la Reivindicación 12 o una población de células T que se ha activado usando el péptido como se define en la Reivindicación 4 para uso en medicina, por ejemplo para uso en combatir la infección de *Aspergillus*, o para uso en combatir la alergia a
- 40 *Aspergillus*, en un paciente, opcionalmente donde las células T específicas de *Aspergillus* son autólogas al paciente, o las células T son de un donante.
- 15.** Un método para determinar la cantidad de células T específicas de *Aspergillus* en un individuo el método comprendiendo contactar una muestra de sangre del individuo con el complejo de la Reivindicación 4.
- 45 **16.** Un polinucleótido que codifica un péptido como se define en la Reivindicación 1 o un polipéptido según la Reivindicación 3 o un TCR como se define en la Reivindicación 12.

17. Una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en la Reivindicación 1 o un polipéptido según la Reivindicación 3 o un polinucleótido según la Reivindicación 16 o células T específicas de *Aspergillus* como se define en la Reivindicación 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 18. Un péptido como se define en la Reivindicación 1 o un polipéptido según la Reivindicación 3 o un polinucleótido según la Reivindicación 16 para uso en medicina, preferiblemente donde el individuo a ser tratado es un individuo humano que tiene HLA-DRB1\*04 Clase II, por ejemplo para uso para combatir la infección de *Aspergillus* o para combatir la alergia a *Aspergillus*.
19. Una vacuna contra infección de *Aspergillus* que comprende un péptido como se define en la Reivindicación 1 o un polipéptido según la Reivindicación 3 o un polinucleótido según la Reivindicación 16.
- 10 20. Una célula que presenta antígeno, tal como una célula dendrítica, que está presentando un péptido como se define en la Reivindicación 1 o un polipéptido según la Reivindicación 3, preferiblemente donde la célula que presenta antígeno tiene HLA-DRB1\*04 Clase II.
- 15 21. Una célula que presenta antígeno según la Reivindicación 20 para uso en medicina, opcionalmente como una vacuna contra infección de *Aspergillus* u opcionalmente para uso en combatir infección de *Aspergillus* en un paciente, preferiblemente donde el paciente es uno que tiene HLA -DRB1\*04 Clase II.
22. Un anticuerpo que selectivamente reconoce al péptido FHTYITIDWTKDAVTW cuando se presenta por HLA-DRB1\*04 Clase II.
23. Un anticuerpo según la Reivindicación 22 para uso en medicina, tal como para uso en combatir la infección de *Aspergillus*, preferiblemente donde el receptor es uno que tiene HLA-DRB1\*04 Clase II.
- 20 24. Un método *in vitro* de determinar si un individuo está infectado o no con *Aspergillus*, el método comprendiendo determinar si un individuo contiene células T específicas de *Aspergillus* como se define en la Reivindicación 11, preferiblemente donde el individuo es uno que tiene HLA-DRB1\*04 Clase II.
- 25 25. Un método *in vitro* para determinar si un individuo está infectado con *Aspergillus*, el método comprendiendo usar un TCR según la Reivindicación 12, preferiblemente donde el individuo es uno que tiene HLA-DRB1\*04 Clase II.

Figura 1 (Página1/2)

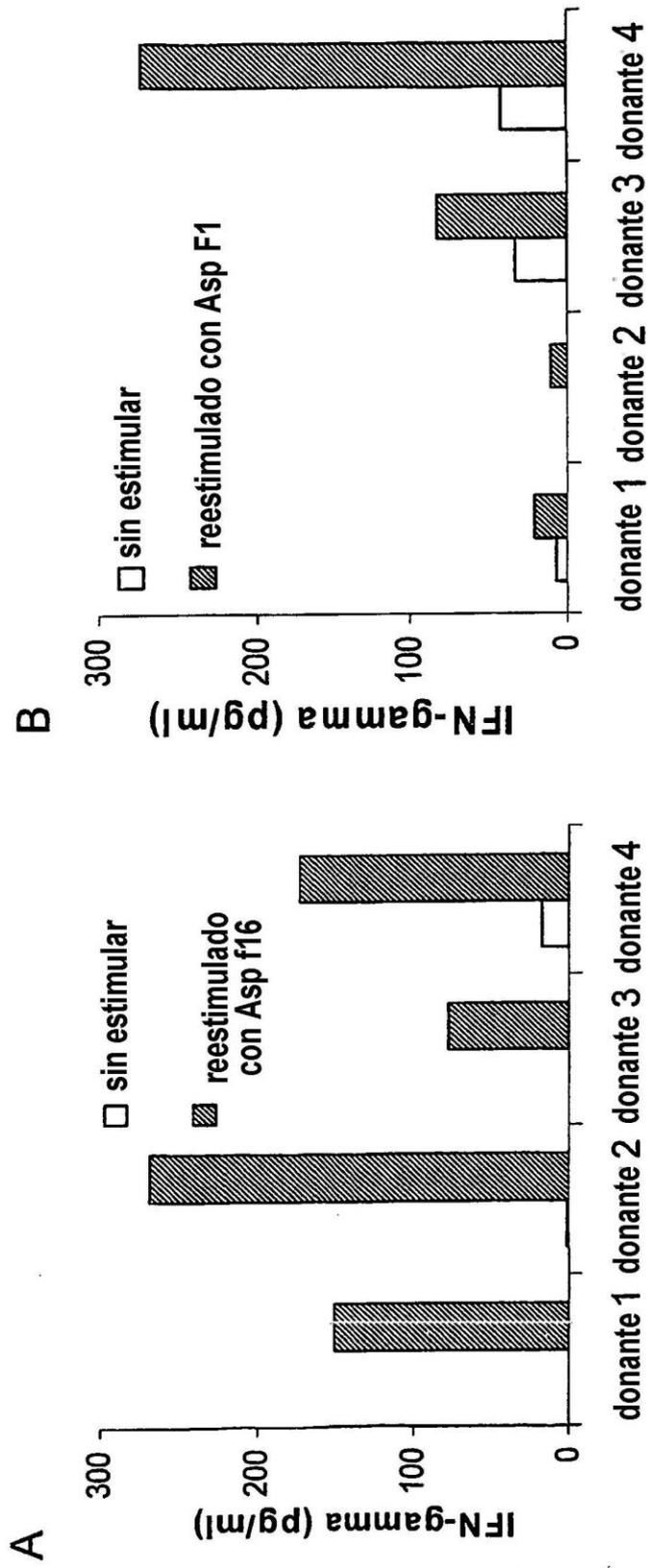


Figura 1 (Página 2/2)

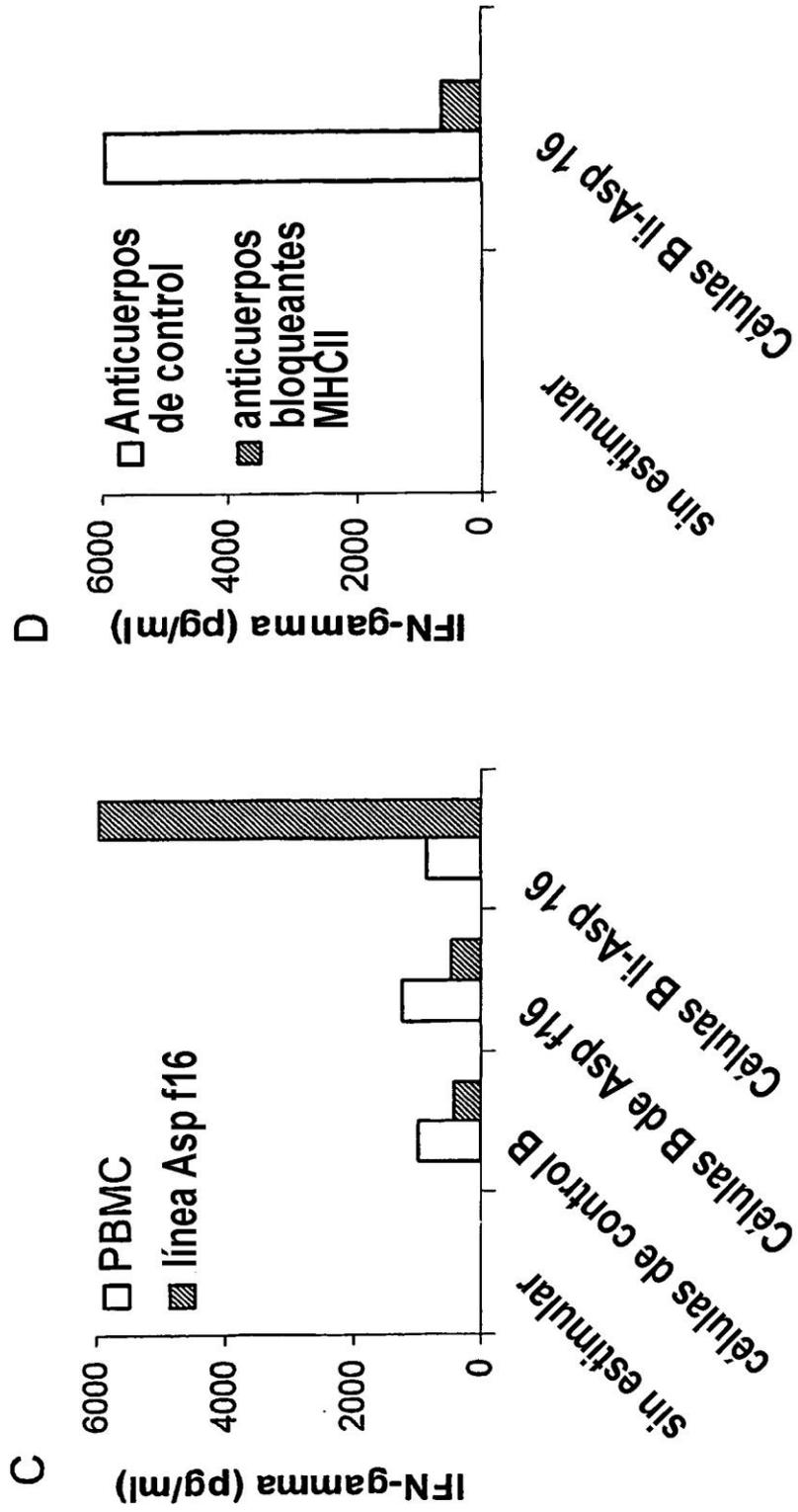


Figura 2 A

1 MYFKYTAALAAVLPLCSAQ TWSKCNPLEKTCPPNKGLAASYADFTSA SALDQWEVTA  
     péptido AST  
 61 GKVPVGPQGA EFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEWMKAAPGTGVSSIVLESDDLDEV  
     péptido GAE  
 121 DWEVLGGDITQVQTNYFGKGDITTYDRGTYVPVATPQEIFHTYIDWTKDAVTWSIDGAV  
     péptido EVD  
     péptido FHT  
 181 VRILTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDPSPKGTIEWAGGLTDYSA GPYTM YKSV  
 241 RIENANPAESYTYSNDSGSWQSIKFDGSVDISSSVTSSTTSTASSASS TSSKTPSTST  
     péptido VKS  
 301 LATSTKATPTPSGTSSGSNSSSSAEPTTGTGSGSSNTGSGSGSGSGSSSSTGSS TSA G  
 361 ASATPELSQGAAGSIKGSVTACALVFGAVAAVLAF

Figura 2B

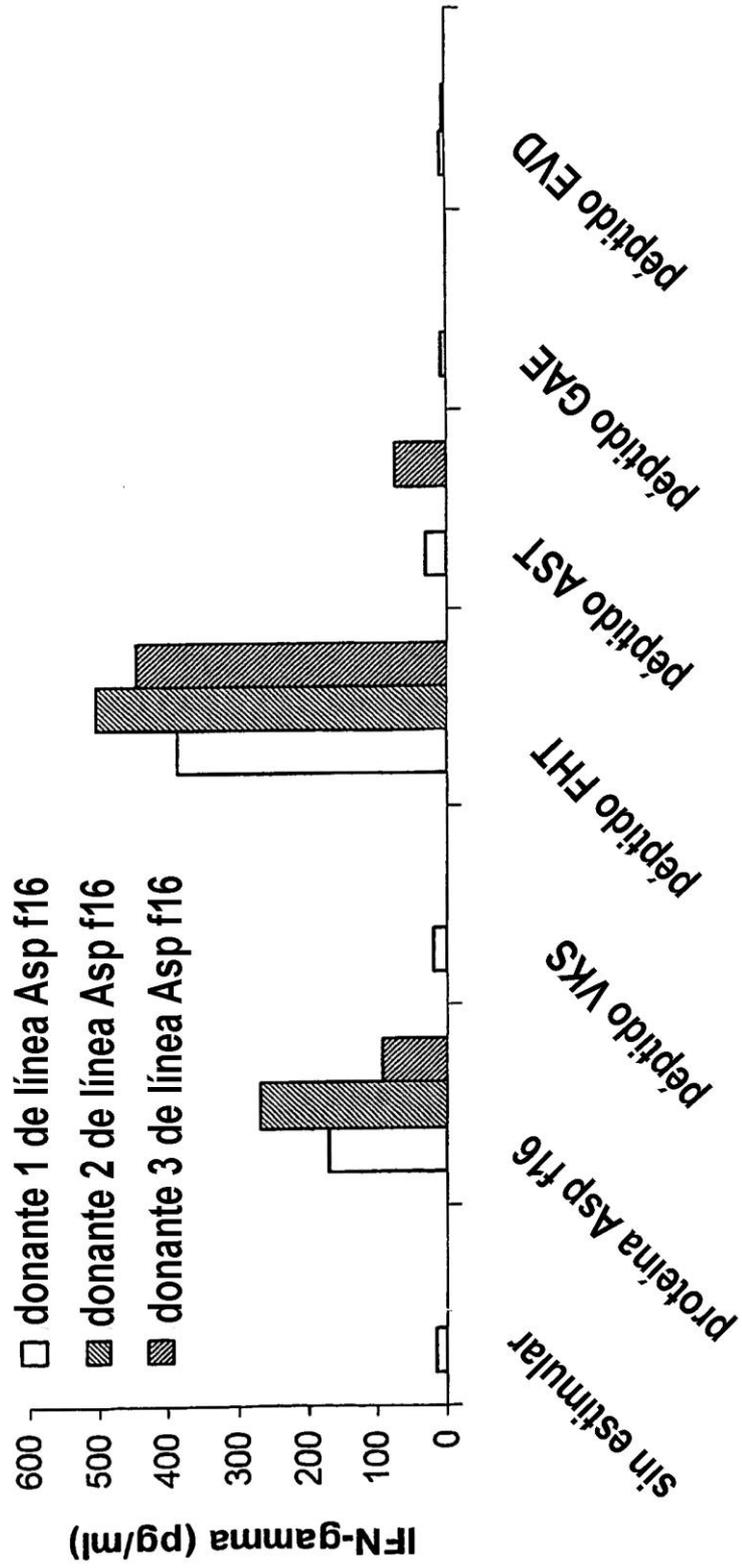


Figura 2C

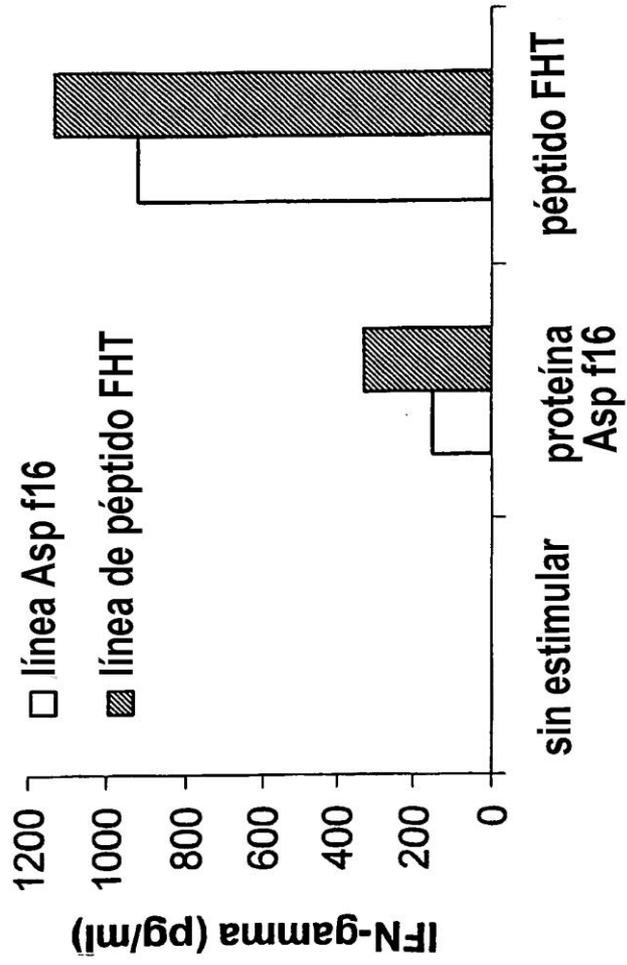


Figura 3 (Página 1/2)

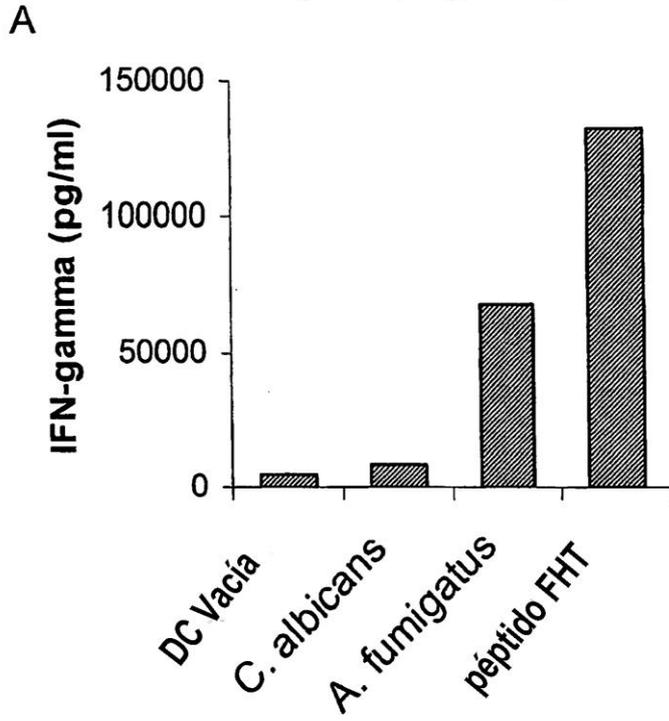


Figura 3 (Página 2/2)

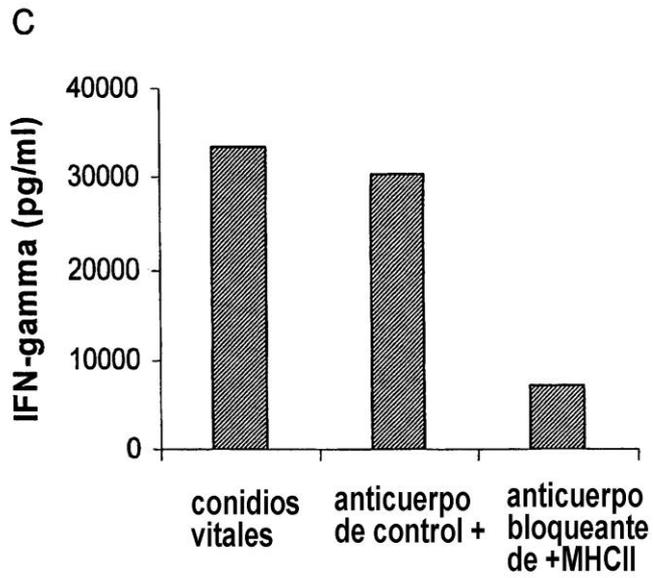
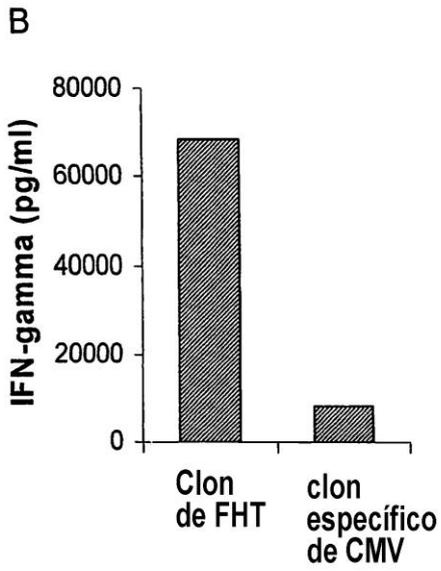


Figura 4

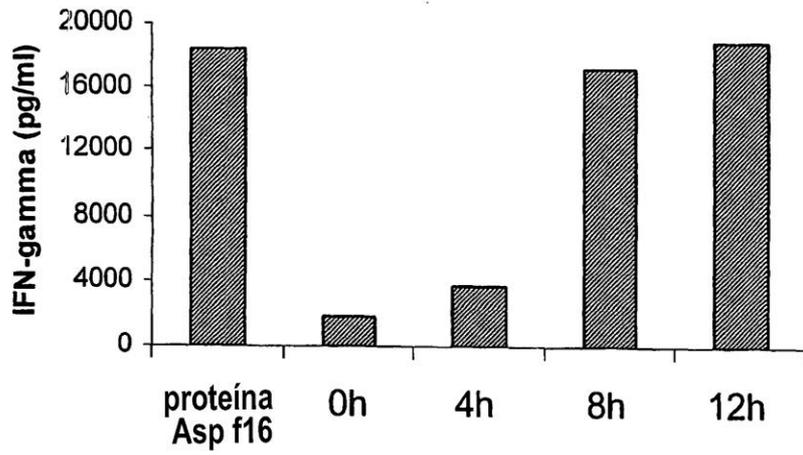
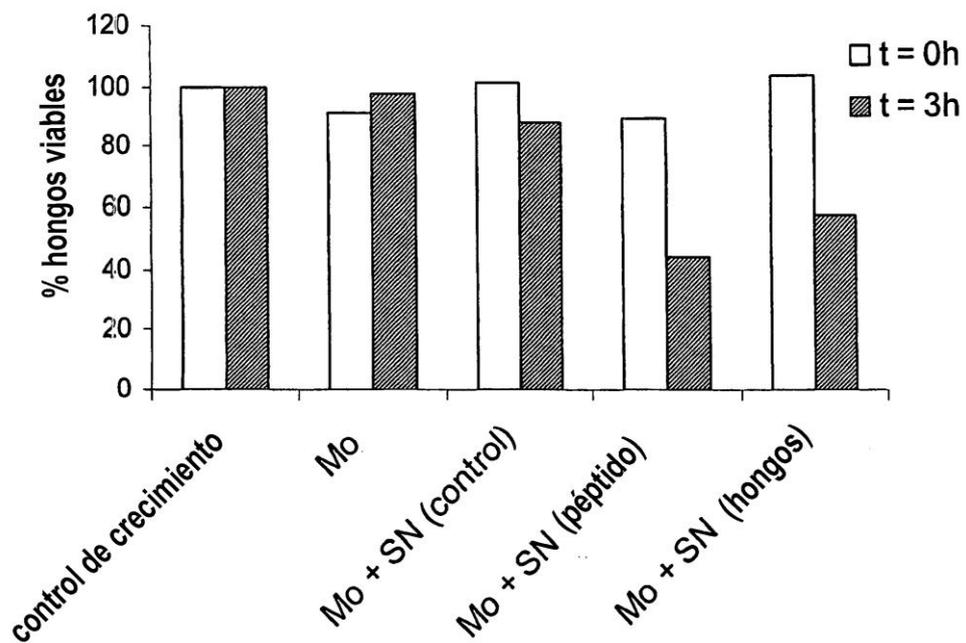


Figura 5



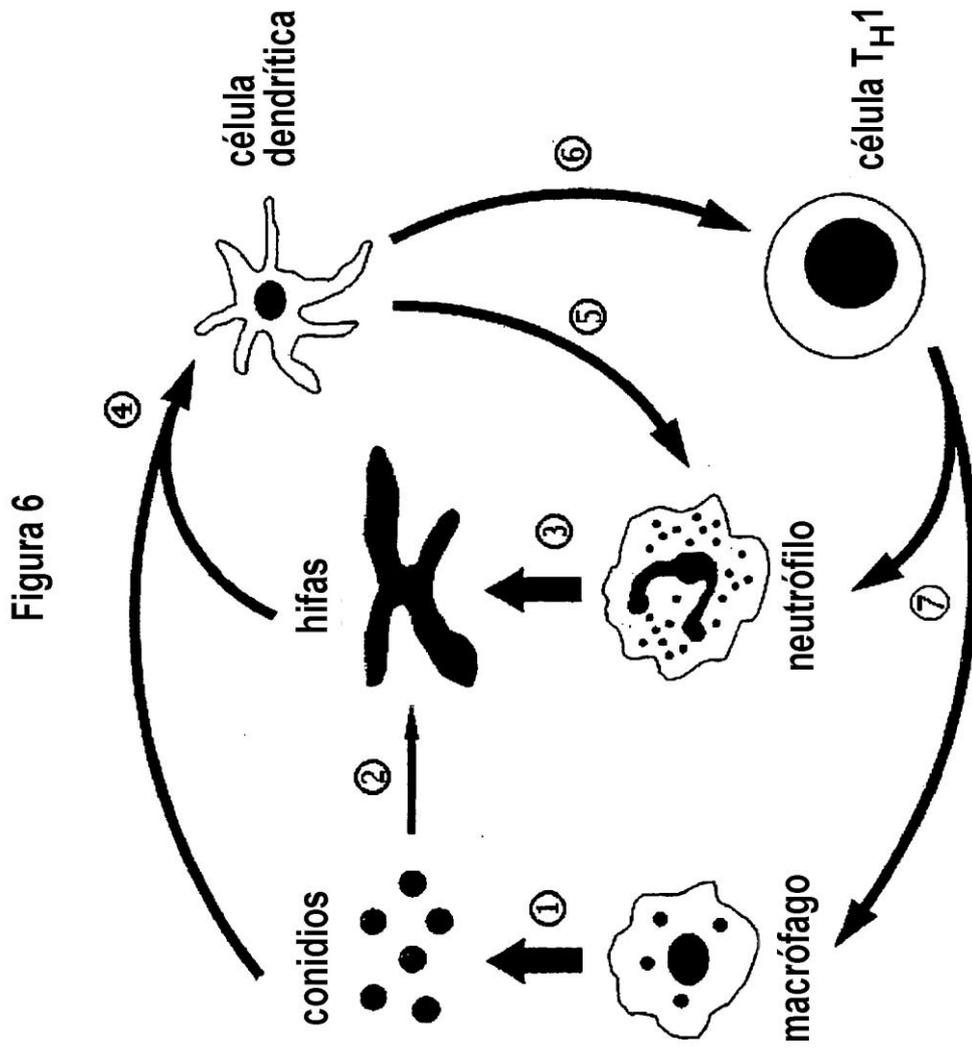
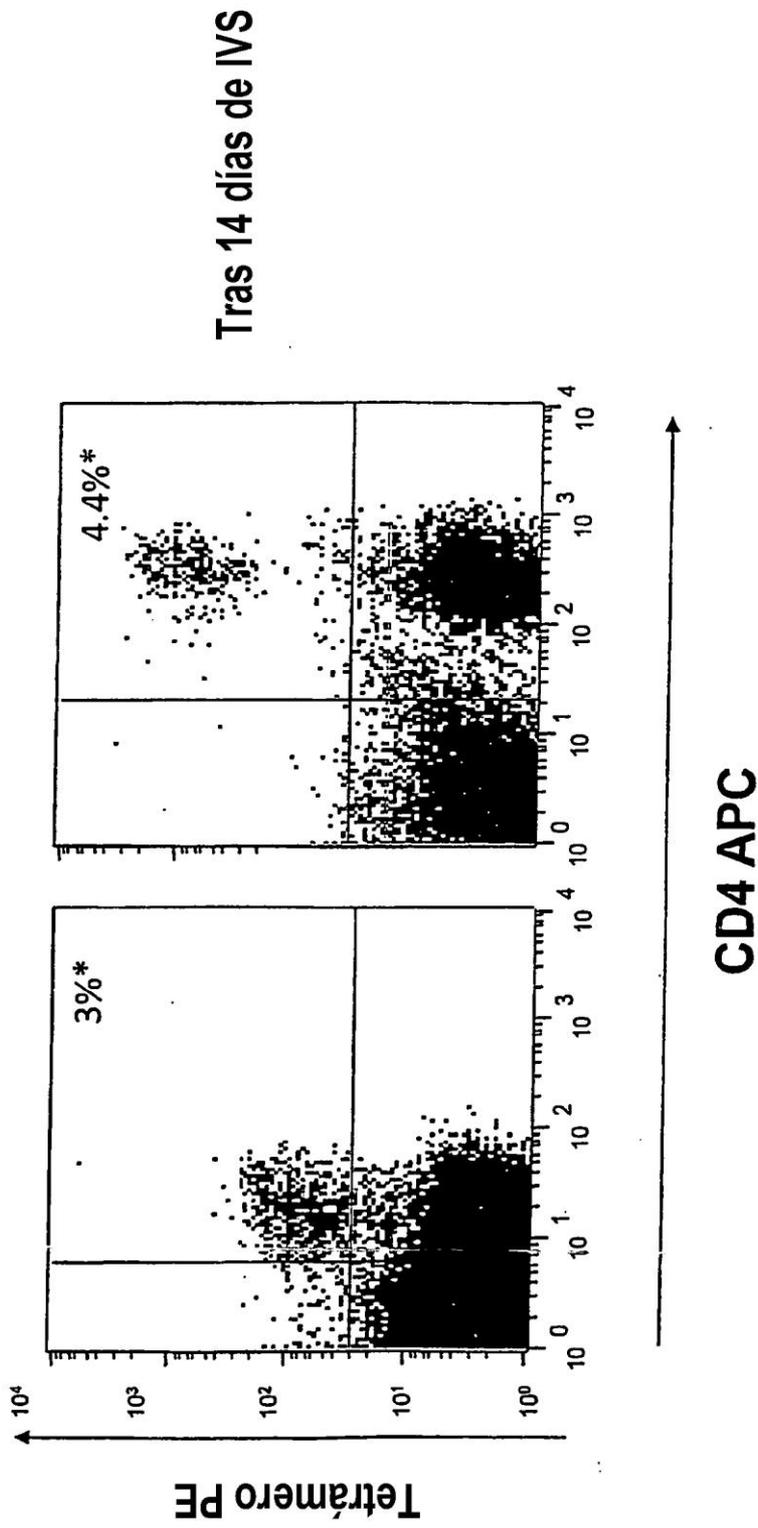


Figura 7 (Página 1/2)  
Donante 1 (DRB1\*0407) Donante 2 (DRB1\*0401)

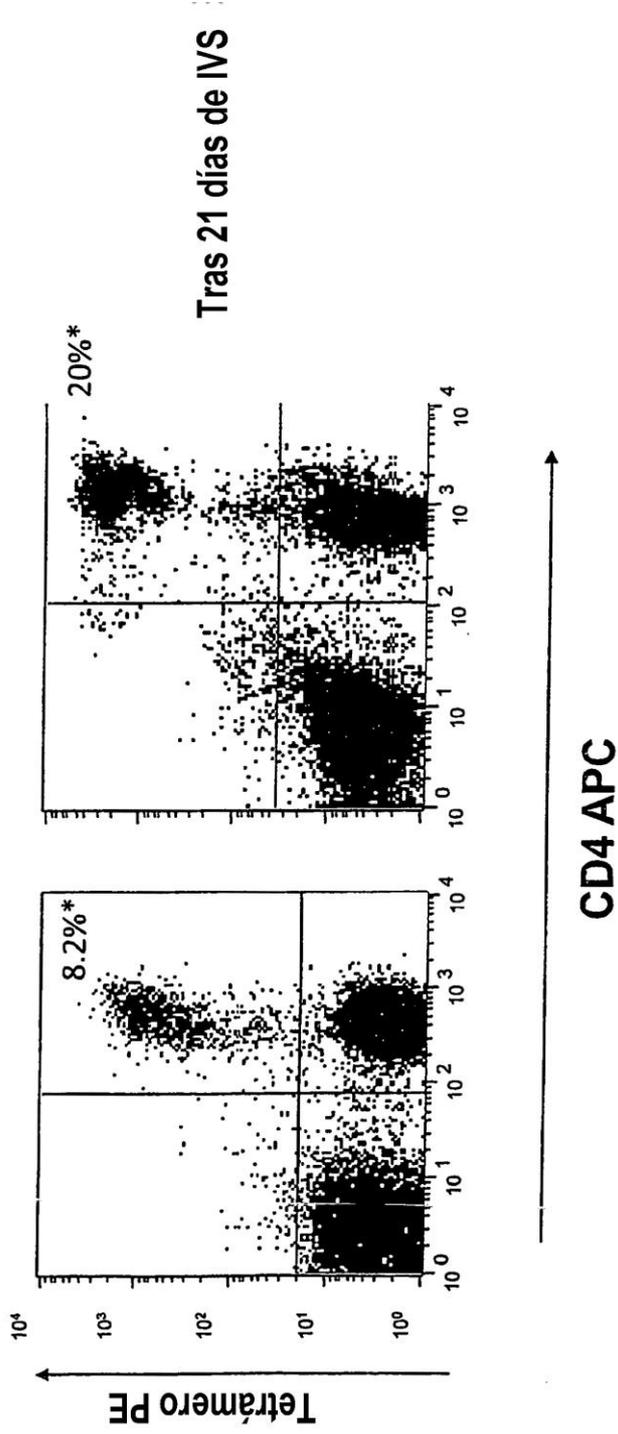


Tetramero PE \*\* se utiliza para tinción de FACS.

Figura 7 (Página 2/2)

Donante 3 (DRB1\*0401)

Donante 4 (DRB1\*0401)



\* porcentaje de células CD4

\*\* (Tetrámero de MHC II iTAG™, DRB1\*0401-FHTYTIDWTKDAVTW (PE), Beckman&Coulter)

Figura 8 (Página 1/2)

Ensayo de Activación con ELISA :

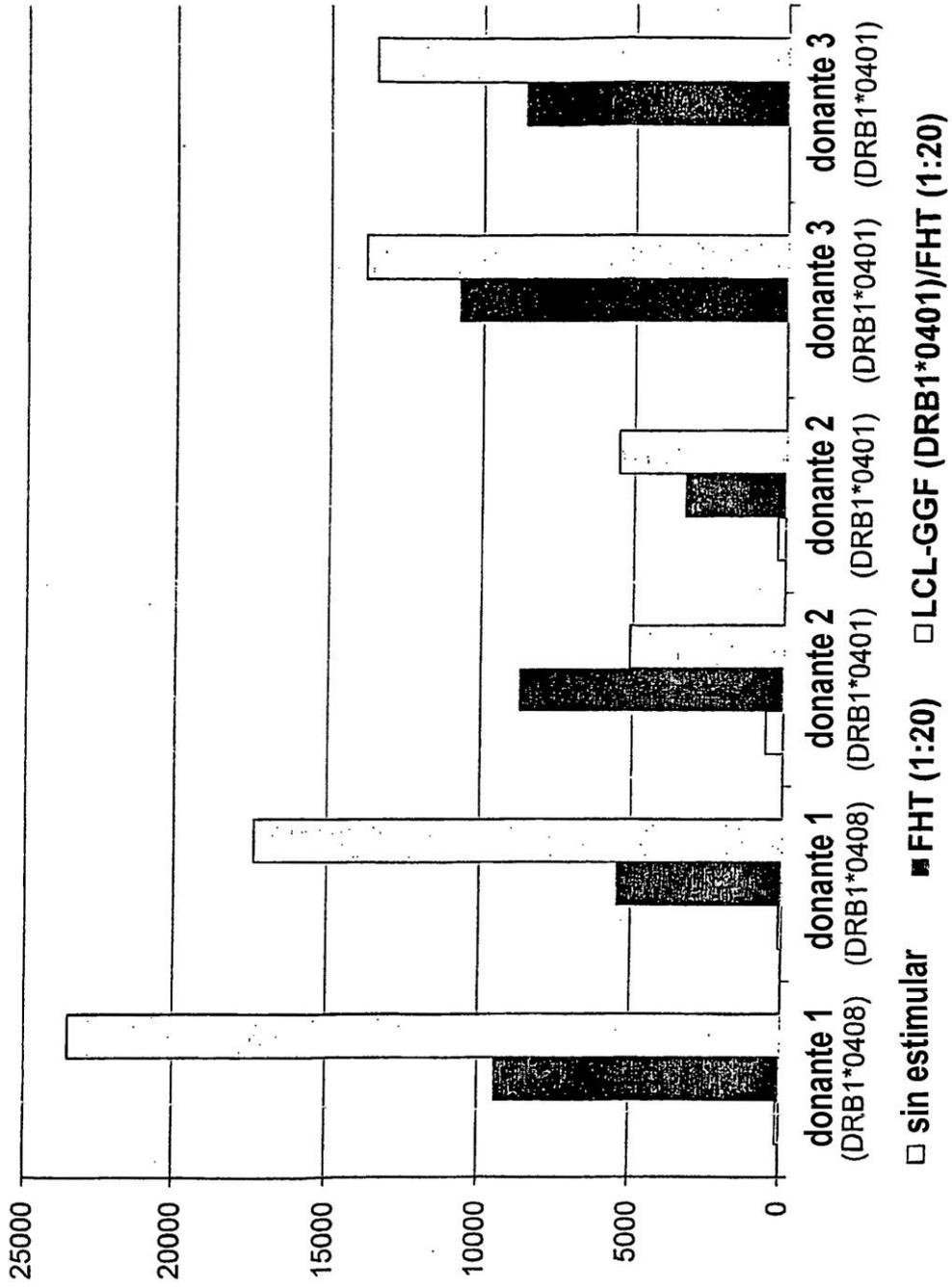


Figura 8 (Página 2/2)

pg/ml IFNg

	donante 1 (DRB1*0408) Clon 1H5	donante 1 (DRB1*0408) Clon 3F8	donante 2 (DRB1*0401) Clon 7C12	donante 2 (DRB1*0401) Clon 7A1	donante 3 (DRB1*0401) Clon 2D2	donante 3 (DRB1*0401) Clon 7E10
sin estimular	103	88	572	251	0	0
FHT (1:20)	9454	5474	8720	3343	10806	8626
LCL-GGF (DRB1*0401)/FHT (1:20)	23558	17420	5103	5498	13890	13540