

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 350**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/56** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2004 E 04256814 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1530972**

54 Título: **Método de cribado de preparaciones de parásitos para la eficacia en la prevención y control de enfermedades**

30 Prioridad:

**17.11.2003 US 715659**

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

**14.10.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION  
INC. (100.0%)  
214 TECHNOLOGY INNOVATION CENTER  
IOWA CITY, IA 52242, US**

72 Inventor/es:

**WEINSTOCK, JOEL y  
ELLIOTT, DAVID**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 425 350 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**

Método de cribado de preparaciones de parásitos para la eficacia en la prevención y control de enfermedades

**CAMPO DE LA INVENCION**

Esta descripción se refiere a métodos que utilizan preparaciones de parásitos helmínticos.

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los parásitos son entidades vivas que residen sobre o en el interior de otras criaturas durante alguna parte de sus ciclos vitales, extrayendo nutrientes del hospedador. Los parásitos que habitan en los intestinos tienen una interacción compleja con el sistema inmunitario mucosal. Los mismos tienen que establecer una relación tranquila con las defensas mucosales del hospedador para sobrevivir.

10 La disregulación del sistema inmunitario que conduce a una respuesta anormal Th1 o Th2 puede ser la causa de varias enfermedades humanas. Algunas enfermedades debidas a respuestas dominantes Th1 incluyen IBD, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerosis múltiple, y diabetes mellitus dependiente de insulina. Enfermedades relacionadas con Th2 incluyen enfermedades alérgicas y cáncer.

15 Recientemente, se ha demostrado que la descripción a parásitos reduce la gravedad de la encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) (Sewell et al., 2003, International Immunology, 15:59-69). La encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal para esclerosis múltiple (MS) caracterizado por desmielinación inflamatoria crónica del sistema nervioso central (CNS). Sewell informó que, en ratones con inmunización con ovas de *Schistosoma mansoni*, la gravedad de la EAE se reduce tal como se mide por registros clínicos disminuidos e infiltrados celulares del CNS. Existe un nivel reducido de IFN-gamma y niveles aumentados de IL-4, factor beta del crecimiento transformante e IL-10 en la periferia, y la frecuencia de células T específicas del neuroantígeno productor de IL-4 en el cerebro aumenta.

25 La enfermedad de Crohn es resultado de la inflamación mucosal disregulada del tipo T adyuvantes (Th)1. La enfermedad de Crohn es rara en los países tropicales, pero prevaeciente en los países desarrollados con climas templados, en los cuales su incidencia se ha elevado desde 1940. En contraste, la descripción a parásitos helmínticos es común en los países tropicales pero es rara en los países desarrollados. Elliott et al. (2003 Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 284: G385-G391) demostró que los helmintos pueden atenuar la inflamación excesiva de tipo Th1. Para comprobar esta hipótesis, se expusieron ratones a huevos del helminto *Schistosoma mansoni* y se enfrentaron luego por vía rectal con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para inducir colitis. La descripción a los huevos de esquistosoma atenuaba la colitis por TNBS y protegía los ratones contra la inflamación letal. La descripción a huevos de esquistosoma disminuía IFN-gamma y aumentaba la producción de IL-4 por las células de los nódulos linfáticos del bazo y mesentéricos estimulados con anti-CD3 de los ratones tratados con TNBS. La descripción a huevos de esquistosoma reducía el IFN-gamma en el colon pero aumentaba la expresión de mRNA de IL-10 en los ratones tratados con TNBS. Se requería el transductor de señales y activador de la transcripción  $\beta$  intacto para atenuación de la colitis. Los autores demostraron que la descripción a helmintos puede reducir la inflamación del colon en los murinos.

40 De Jong et al. (2002, J. Immunol., 168: 1704-1709) demostró que un extracto de proteínas derivado del helminto *Schistosoma mansoni* inducía el desarrollo de DC2s que promueven el desarrollo de células Th2 por la vía de la expresión incrementada del ligando OX40. Análogamente, la toxina procedente de la bacteria extracelular *Vibrio cholerae* inducía también el desarrollo de DC2s, aunque por la vía de un mecanismo independiente del ligando OX40, todavía desconocido. En contraste, la toxina procedente de la bacteria intracelular *Bordetella pertussis* inducía el desarrollo de DC1s con producción aumentada de IL-12, que promueve un desarrollo de células Th1. El poli(I:C) (dsRNA, mimético para el virus) inducía el desarrollo de DC1 inductor de Th1 extremadamente potente sin una producción incrementada de IL-12.

45 La Solicitud de Patente U.S. 2003/0103938 A1 da a conocer una composición farmacéutica constituida por IL-4 y SDF-1 $\alpha$ , o IL-2 y SDF-1 $\alpha$  para prevención o tratamiento de una enfermedad relacionada con las células Th1 o Th2 en un humano o un animal por modulación de la ratio Th1/Th2.

50 Doetze et al. (2000, International Immunology, 12:623-630) investigaron la hiposensibilidad proliferativa de las células T al antígeno Ov (OvAg) por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos con infecciones helmínticas crónicas, es decir, oncocerciasis generalizada (GEO), comparada con PBMC de individuos supuestamente inmunes (PI). En este estudio, se investigaron mecanismos mediadores de esta hiposensibilidad celular en GEO: la respuesta proliferativa baja en PBMC de individuos GEO estaba asociada con una falta de producción de IL-4 y producción significativamente reducida de IL-5 comparada con las de los individuos PI, lo que argumentaba contra un desplazamiento general hacia una respuesta T(h)2 como causa de la hiposensibilidad. En contraste, IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)-beta, dos citoquinas asociadas con una respuesta T(h)3, parecían mediar la hiposensibilidad: los PBMC de individuos con GEO producían significativamente más IL-10, y la hiposensibilidad proliferativa de las células T en este grupo podía invertirse por la adición de anticuerpos

anti-IL-10 y anti-TGF-beta. Los autores demostraron que la hiposensibilidad era específica para OvAg y no se observaba después de estimulación con antígenos de nematodos afines, lo que argumentaba a favor de una regulación decreciente específica de Ov mediada por las células T. Las células T específicas de Ov podían clonarse a partir de PBMC de GEO que tienen un perfil de citoquinas singular (ausencia de IL-2 pero producción elevada de IL-10 y/o TGF-beta), análogo a los subconjuntos de células T que se sabe suprimen la inflamación en curso (T(h)3 y T(r)1), indicando que este tipo de célula que no se ha encontrado hasta ahora en enfermedades infecciosas puede estar implicado en el mantenimiento de la hiposensibilidad específica de Ov.

Las células Th3 son un subconjunto de células T reguladoras y se generaron e identificaron originalmente en ratones tolerantes por vía oral a MPP y que suprimían la inducción de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) por un mecanismo dependiente de TGF-b (Chen et al., 1994, Science, 265:1237-1240). Estudios recientes sugieren que las células T reguladoras pueden ser inducidas contra antígenos bacterianos, virales y parásitos in vivo y podrían prevenir la enfermedad autoinmune, la inmunología inducida por infección o prolongar la persistencia de patógenos por supresión de respuestas Th1 protectoras (véase, por ejemplo, McGuirk and Mills, 2002, Trends in Immunology, 23:450-455; Tung et al., 2001, Immunological Reviews, 182:135-148; y Maloy and Powrie, 2001, Nature Immunology, 2:816-822).

Las células T reguladoras se describen generalmente como linfocitos que suprimen las respuestas inmunes, es decir, tanto las mediadas por anticuerpos como las mediadas por células (v.g., para revisiones, véase McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol 2002; 23(9):450-5; Field, A. C., L. Caccavelli, M. F. Bloch, and B. Bellon. 2003. *Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity*. Journal of Immunology. 170:2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):223-32; Francois Bach J. *Regulatory T cells under scrutiny*. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy*. Curr Opin Immunol. 2002 Dec; 14(6):771-8; McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol. 2002 Sep; 23(9):450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. *Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease*. Immunol Rev. 2001 Aug; 182:135-48; Read S, Powrie F. *CD4(+) regulatory T cells*. Curr Opin Immunol. 2001 Dec; 13(6):644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. *Regulatory T cells and allergic asthma*. Microbes Infect. 2001 Sep; 3(11):899-904). Estas células T reguladoras (células Tr) expresan una proteína transmembranal (llamada CD25) que es la cadena alfa del receptor para interleuquina-2 (IL-2). Al igual que otras células T, aquéllas expresan también el receptor  $\alpha$ - $\beta$  (alfa-beta) de las células T para el antígeno (TCR) y pueden activarse únicamente si el mismo se fija al péptido-molécula MHC clase II, o en el caso de las células reguladoras CD8 al MHC clase I, para el cual es específico. No obstante, si se activan, aquéllas comienzan a secretar grandes cantidades de interleuquina 10 (IL-10) y a menudo también algo del factor-beta del crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ). Estas dos linfocinas son inmunosupresores potentes que inhiben la contribución de Th1 a la inmunidad e inflamación mediada por las células, la contribución de Th2 a la producción de anticuerpos, y, posiblemente, la acción de los linfocitos T citolíticos (CTL) CD8<sup>+</sup>. Algunas otras células T reguladoras difieren de las células Tr. Por ejemplo, las células Tr1 se asemejan a las células Tr en varios aspectos, aunque las mismas no expresan grandes cantidades de CD25 en su superficie. Aquéllas requieren IL-10 para su formación y, una vez maduras, secretan grandes cantidades de la misma. La linfocina principal para las células Th3 es TGF- $\beta$ .

*Transplantation* 61,2 (1996) describe el uso de preparaciones que contienen el organismo *Nippostrongylus brasiliensis*, o un extracto del mismo en el tratamiento de la supervivencia de aloinjertos.

WO 00/25810 describe el uso de una proteína obtenida del nematodo *Heligmosomoides polygyrus* para tratamiento inmunosupresor y como anti-alérgico.

*Journal of Immunology* 167, 9 (2001) da a conocer que un helminto inhibe la colitis en un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria por inducción de células T reguladoras.

*Digestive disease week abstracts and itinerary planner* May (2003), describe que *Heligmosomoides polygyrus* inhibe la colitis en un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria por inducción de células T reguladoras.

WO 02/094228 describe composiciones helmínticas en la prevención y el tratamiento de las alergias y el asma.

*Science* 1996, 5567 (2002) revisa la hipótesis de la higiene en relación con parásitos y alergias.

WO 03/006058 describe métodos y composiciones para la identificación de nuevas dianas para diagnosis, prognosis, intervención terapéutica y prevención de trastornos autoinmunes, rechazo de trasplantes y cáncer.

*Science* 299, 5609 (2003) describe el control del desarrollo de células T reguladoras por el factor de transcripción *Foxp3*.

*Developmental Biology* 246 1 (2002) describe la definición de elementos de redes reguladoras para desarrollo de células T por análisis de perturbaciones con PU.1 y GATA-3.

*Journal of Immunology* 171, 3 (2003) describe que la expresión diferencial de transcritos *Smad7* identifica las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>high</sup> que median la tolerancia inducida por colágeno Tipo V a aloinjertos de pulmón.

*Expert Opinion on Therapeutic Targets* 6, 6 (1002) describe T-bet como una posible diana terapéutica en enfermedad autoinmune.

- 5 WO 01/13960 describe métodos de terapia génica *in vivo* para el tratamiento de enfermedades de las articulaciones, tales como osteoartritis.

Sigue siendo desconocido si las células T reguladoras juegan algún papel en la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con Th1 o Th2 utilizando una preparación de parásitos helmínticos.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

- 10 Los aspectos y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones.

La presente descripción está basada en el descubrimiento de que preparaciones de parásitos pueden alterar la actividad de las células T reguladoras en el tratamiento de enfermedades relacionadas con Th1 o Th2.

La presente descripción proporciona un método de cribado de una preparación de parásitos helmínticos que altera una actividad de las células T reguladoras, comprendiendo el método los pasos de:

- 15 (a) obtener una preparación de parásitos helmínticos; (b) poner en contacto la preparación de parásitos helmínticos con una diana; y (c) determinar el nivel de un marcador interno para la actividad de las células T reguladoras en la diana después del contacto, donde un cambio en el nivel del marcador interno después del contacto es indicativo de que la preparación de parásitos helmínticos altera una actividad de las células T reguladoras.

- 20 La presente descripción proporciona también un método de cribado de una preparación de parásitos helmínticos que altera una actividad de las células T reguladoras, comprendiendo el método los pasos de: (a) obtener una preparación de parásitos helmínticos; (b) poner en contacto la preparación de parásitos helmínticos con una diana; y (c) determinar el nivel de un marcador de la superficie celular para la célula T reguladora en la diana después de contacto, donde un cambio en el nivel del marcador de la superficie celular después del contacto es indicativo de que la preparación de parásitos helmínticos altera una actividad de las células T reguladoras.

- 25 La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de un animal con una enfermedad relacionada con Th1 o Th2 por administración de una preparación de parásitos helmínticos que altera una actividad de las células T reguladoras en el animal.

- 30 La presente descripción proporciona también un método para monitorizar la eficacia del tratamiento de una preparación de parásitos helmínticos para una enfermedad autoinmune o alérgica en un animal que comprende: (a) administrar una composición que comprende una preparación de parásitos helmínticos o una fracción de la misma al animal; y (b) determinar el nivel de una actividad de las células T reguladoras en el animal después de la administración, donde un aumento en el nivel de la actividad de las células T reguladoras después de la administración es indicativo de la eficacia del tratamiento con la preparación de parásitos helmínticos.

- 35 La enfermedad a tratar puede seleccionarse del grupo constituido por: enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus juvenil dependiente de insulina (tipo I), sarcoidosis, esclerosis múltiple, asma y rinitis alérgica.

El marcador de las células T reguladoras puede ser un marcador interno, un marcador de la superficie celular, o un marcador secretado.

Preferiblemente, el marcador interno es Scurfina, *Smad7*, *Gata 3*, *Tbet* (*Tbx21*).

- 40 Preferiblemente también, el marcador de la superficie celular se selecciona del grupo constituido por CD44, CD45RB<sup>lo</sup>, CD45Rc, antígeno 4 asociado a los linfocitos T citolíticos (CTLA-4), CD25, CD103, CD62L, integrina  $\alpha\epsilon\beta$ , péptido asociado a la latencia (LAP) o la proteína relacionada con la familia de receptores de TNF inducidos por glucocorticoides (GITR), encefalitis alérgica experimental (EAE), receptor de quimioquinas CCR5, TI-ST2.

Asimismo, preferiblemente, el marcador secretado es IL-5, IL-10 o TGF $\beta$ .

- 45 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- Figura 1: La figura describe las concentraciones de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-5 medidas en sobrenadantes de células de bazo de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos organismos de acuerdo con una realización de la descripción. Se cultivaron esplenocitos ( $4 \times 10^5$ /pocillo) *in vitro* durante 48 horas a 37°C en 200  $\mu$ l de medio en presencia o ausencia de concentraciones óptimas de PPD o SEA. La secreción de las citoquinas se cuantificó por ELISA.
- 50

- Figura 2: La figura describe las concentraciones de IFN $\gamma$  e IL-4 en sobrenadantes de células de granuloma de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos organismos de acuerdo con una realización de la descripción. Se cultivaron células de granuloma ( $4 \times 10^5$ /pocillo) en 200  $\mu$ l de medio *in vitro* a 37°C durante 48 h en presencia o ausencia de la concentración óptima de PPD o SEA. Las citoquinas se cuantificaron por ELISA.
- 5 Figura 3: La figura describe los niveles de IgG1, IgE e IgG2a en suero medidos en ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos (simultáneos) de acuerdo con una realización de la descripción. La concentración de inmunoglobulinas se determinó por ELISA.
- Figura 4: La figura muestra que el tratamiento con IL-4 puede curar los ratones de una infección crónica de *H. polygyrus* de acuerdo con una realización de la descripción. Los ratones recibieron 3 inyecciones de un complejo de IL-4 comenzando 12 días antes de la muerte. Los datos son valores medios +/- SE de determinaciones múltiples.
- 10 Figura 5: Los datos representan el registro medio de inflamación +/- SD de 3 experimentos separados de análisis de > 4 ratones WT (tipo salvaje)/grupo.
- Figura 6: Ratones WT sin IBD se colonizaron con *H. polygyrus*. Los controles recibieron sonda esofágica falsa. Se aislaron LPMC del TI y se cultivaron durante 48 horas *in vitro* con o sin estimulación por anti-CD3/anti-CD28. Se midió IFN $\gamma$  en los sobrenadantes con ELISA. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de 2 experimentos independientes.
- 15 Figura 7: Se trataron ratones WT como en Fig. 2. LPMC aislados se cultivaron 48 h *in vitro* con CpG oligo para promover la producción de IL12. La IL12 se midió con ELISA. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de dos experimentos independientes.
- 20 Figura 8: Ratones WT sin IBD se colonizaron con *H. polygyrus*. Los controles recibieron sonda esofágica falsa. Se aislaron LPMC y se cultivaron dos semanas más tarde como en la Figura 2. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de 2 experimentos independientes.
- Figura 9: Ratones WT se colonizaron con *H. polygyrus*. Se aislaron LPMC y se cultivaron durante 48 h *in vitro* con mAb anti-CD3/anti-CD28  $\pm$   $\alpha$ IL10R. Se midió IFN $\gamma$  en los sobrenadantes con ELISA. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 3 determinaciones independientes.
- 25 Figura 10: Ratones WT sin IBD se colonizaron con *H. polygyrus*. Los controles recibieron sonda esofágica falsa. Se aislaron LPMC y se cultivaron dos semanas más tarde como en la Figura 2. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de dos experimentos independientes.
- Figura 11: Ratones WT sin IBD se colonizaron con *H. polygyrus*. Los controles recibieron sonda esofágica falsa. Se aislaron LPMC y se cultivaron dos semanas más tarde como en la Figura 2. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de dos experimentos independientes.
- 30 Figura 12: Ratones WT sin IBD se colonizaron con *H. polygyrus*. Los controles recibieron sonda esofágica falsa. Se aislaron LPMC y se cultivaron dos semanas más tarde como en la Figura 2. Se aislaron LPMC del TI y se cultivaron durante 48 h *in vitro* con o sin estimulación por LPS. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 9 determinaciones de 3 experimentos independientes.
- 35 Figura 13: Se aislaron células T de LPMC intestinales dispersados utilizando perlas magnéticas. Las fracciones enriquecidas en células T (células T) y empobrecidos en células T (no T) se cultivaron 48 h *in vitro* con o sin estimulación por anti-CD3/anti-CD28 antes de ensayar IFN $\gamma$  en los sobrenadantes. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de dos experimentos independientes.
- 40 Figura 14: Ratones WT no infectados recibieron  $2 \times 10^7$  células MLN de ratones colonizados con *H. polygyrus*. Una semana más tarde se aislaron LPMC de estos receptores y se cultivaron 48 h con o sin estimulación por anti-CD3/anti-CD28 antes de ensayar IFN $\gamma$  en los sobrenadantes. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de 6 determinaciones de dos experimentos independientes.
- Figura 15: Ratones GFP WT se colonizaron con *H. polygyrus*. Dos semanas más tarde, células MLN de estos ratones GFP afectados con helmintos se transfirieron a ratones C57BL/6 normales por inyección I.P. Siete días después, se dispersó la lámina propia y se examinó respecto a células T GFP+ bajo microscopía de fluorescencia. A) células T GFP+LP. B) el mismo campo bajo microscopía óptica.
- 45 Figura 16: Animales IL10 $^{-/-}$  recibieron alimento que contenía piroxicam comenzando la semana 5 de edad. Después de dos semanas de tratamiento, se interrumpió el piroxicam y se evaluó la colitis dos semanas más tarde. Controles IL10 $^{-/-}$  de edad coincidente no recibieron cantidad alguna de piroxicam (control). La colitis se registró en secciones histológicas por lectores a ciegas utilizando una escala de puntuación 0-4. A) colon de un ratón IL10 $^{-/-}$  de control. B) colon de un ratón IL10 $^{-/-}$  de edad coincidente después de tratamiento con piroxicam. C) infiltración de la lámina
- 50

propia del colon con células T CD4<sup>+</sup> después de piroxicam (H&E 10X, IHC 20X). Los datos del gráfico son valores medios de 5 experimentos separados, cada uno con 5-6 ratones/grupo.

Figura 17: Los paneles A, B y C muestran la inflamación del colon típica en ratones tratados con piroxicam que no recibieron *H. polygyrus*. D, E y F muestran la mejora en la colitis dos semanas después de recibir *H. polygyrus* (todos H&E, 4X). La colitis se registra en una escala de puntuación 0-4. Los datos son valores medios ± SE de 11 animales estudiados en dos experimentos separados.

Figura 18: Ratones IL10<sup>-/-</sup> colíticos recibieron *H. polygyrus* o sonda esofágica falsa como se describe para Fig. 12. Dos semanas más tarde, se aislaron LPMC y se cultivaron 48 h *in vitro* con o sin estimulación por anti-CD3/anti-CD28 (IFN $\gamma$ ) con CpG oligo (IL12). Los datos son valores medios ± SE de 8-9 determinaciones de 3 experimentos independientes.

Figura 19: Ratones IL10<sup>-/-</sup> colíticos se trataron como en Fig. 13. Los datos son valores medios ± SE de 9 determinaciones de 3 experimentos independientes.

Figura 20: A) células MLN aisladas de ratones IL10<sup>-/-</sup> dos semanas después de recibir *H. polygyrus* o sonda esofágica falsa (control) se transfirieron (20 x 10<sup>6</sup>) por inyección i.p. a ratones tratados con piroxicam. Dos semanas después de la transferencia, se evaluó la colitis como en Fig. 12. B) células T MLN aisladas de ratones de control o colonizados se transfirieron (5 x 10<sup>6</sup>) a ratones colíticos. Los datos son valores medios ± SE de 9 ratones/grupo en dos experimentos separados.

Figura 21: Se extrajo mRNA de células MLN aisladas de ratones IL10<sup>-/-</sup> dos semanas después de sonda esofágica falsa o con *H. polygyrus* después de dos semanas de tratamiento falso o tratamiento con piroxicam. Se normalizó la PCR en tiempo real para *Foxp3* a mRNA de HPRT (Métodos). Nota: la mayor expresión requiere menos ciclos PCR para alcanzar el umbral. Los datos son valores medios ± SE de 3 experimentos independientes cada uno de los cuales utilizaba 4 ratones/grupo.

Figura 22: se extrajo mRNA de células MLN de ratones IL10<sup>-/-</sup> dos semanas después de sonda esofágica falsa o con *H. polygyrus*. La expresión menor requiere más ciclos PCR para alcanzar el umbral. Los datos son valores medios ± SE de 3 experimentos independientes cada uno de los cuales utilizaba 4 ratones/grupo.

Figura 23: Un diagrama esquemático para un procedimiento de preparación de antígeno.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La invención abarca un método *in vitro* de cribado para una preparación de parásitos helmínticos que altera una actividad de las células T reguladoras humanas, como se expone en las reivindicaciones.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "preparación de parásitos helmínticos" incluye, pero sin carácter limitante, uno cualquiera de parásito entero, extracto de parásito, ova de parásito, extracto de ova de parásito, huevo de parásito, extracto de huevo de parásito, larvas de parásito, extracto de larvas de parásito, cercarias de parásito y extracto de cercarias de parásito. Una "preparación de parásitos" puede ser también una proteína, polinucleótido, carbohidrato o lípido aislado(a) derivado del parásito y su extracto.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "exento de patógeno específico" se aplica a los animales generados para uso en la presente invención cuando se sabe que los animales están exentos de un microorganismo patógeno específico que puede causar enfermedad en un animal o humano diana. Métodos para generación de animales exentos de patógenos se conocen en la técnica, v.g., véanse las referencia recopiladas por Brown et al., [http://www.ctsa.org/upload/publication/CTSA\\_116631681202959092495.pdf](http://www.ctsa.org/upload/publication/CTSA_116631681202959092495.pdf), disponible en [http://www.ctsa.org/upload/publication/CTSA\\_116631681202959092495.pdf](http://www.ctsa.org/upload/publication/CTSA_116631681202959092495.pdf). Brown et al. proporciona referencias para generación de diferentes animales de granja y de laboratorio en ambiente SPF, así como procedimientos y requerimientos sobre diseño de construcción y gestión. Véase también M. Michael Swindle (J. Invest. Surg., 9: 267-271, 1996, para el procedimiento SPF y listas de varios patógenos potenciales virales y bacterianos humanos pertinentes.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "células T reguladoras" se refiere a una población de células linfocíticas que secreta al menos un aumento de al menos dos veces (v.g., tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, ocho veces, diez veces o más) de IL-10 y/o TGF $\beta$ , en comparación con las células T naif. La determinación de la secreción de IL-10 o TGF $\beta$  es conocida en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse por cultivo de las células *in vitro* durante 24 ó 48 horas con o sin un estimulante de las células T como anti-CD3 seguido por ensayo del sobrenadante de cultivo para estas citoquinas utilizando ELISAs específicos de citoquinas. Adicionalmente, las células T reguladoras se caracterizan también por un nivel elevado de transcrito FoxP3 en comparación con otros tipos de células T (v.g. células T naif). Por "nivel alto de transcrito FoxP3" se hace referencia a un aumento de al menos 4 veces en el nivel comparado con otros tipos de células T. FoxP3 puede detectarse por utilización de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (v.g., utilizando los cebadores PCR CCCAGGAAAGACAGCAACCTT, TTCTACAACCAGGCCACTTG (SEQ ID NO.1) y la sonda marcada 6FAM-

ATCCTACCCACTGCTGGCAAATGGAGTC-TAMRA (SEQ ID NO. 2) como se describe en Hori, S., T. Nomura, y S. Sakaguchi. 2003. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science. 299:1057-1061). Los valores se normalizan para expresión de HPRT, que es un gen interno. Alternativamente, el producto de la proteína FoxP3, Scurfina, puede detectarse por análisis de transferencia Western como es conocido en la técnica, v.g., utilizando Anticuerpo Policlonal Anti-FoxP 3 de Cabra (FoxP3) (Número de Catálogo ab2481, Novus Biologicals, Littleton, CO). Opcionalmente, las células T reguladoras pueden producir también mucho menos IFN $\gamma$  comparadas con otras células T (v.g., las células T naif), es decir, al menos dos veces, preferiblemente tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, diez veces o menos. También opcionalmente, las células T reguladoras pueden detectarse asimismo por utilización de análisis de flujo intracitoplásmico para detectar células T que expresan IL10 y/o TGF $\beta$  pero poco o nada de IFN $\gamma$ . Marcadores opcionales adicionales como se describen más adelante en esta memoria pueden utilizarse también para detección de las células T reguladoras o la actividad de las células T reguladoras,

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "células T naif" se refiere a células T originarias de la producción por el sistema inmunitario de células nuevas en la médula ósea. Las células T naif responden a los patógenos recién encontrados que contienen antígenos que el sistema inmunitario no ha procesado antes. Las células T naif pueden identificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (para revisiones véase, v.g. Tough et al., 1999, Immunol Rev. 170:39-47; Itano et al., 2003, Nat Immunol. 4(8):733-9; Berard et al., 2002, Immunology. 106(2):127-38).

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "preparación de parásitos que altera una actividad de las células T reguladoras" se refiere a una preparación de parásitos que cambia la actividad de las células T reguladoras en una diana al menos en un 40%, v.g., 50%, 80%, 100%, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o más después del contacto con la diana, comparada con la actividad de las células T reguladoras en la diana sin contacto con la preparación de parásitos. La actividad de las células T reguladoras puede medirse por monitorización del nivel de un marcador interno de las células T reguladoras (v.g., un factor de transcripción tal como mRNA de FoxP3 o su producto proteínico Scurfina, Smad7, Gata3, o Tbet (Tbx21)), o un marcador de la superficie de las células T reguladoras (v.g., CD4, CD45RB<sup>lo</sup>, CD45Rc, antígeno 4 asociado a los linfocitos T citolíticos (CTLA-4), Ox40, 4-1BB, CD25, CD103, CD62L, integrina  $\alpha\epsilon\beta$ , péptido asociado con la latencia (LAP), o proteína relacionada con la familia de receptores de TNF inducida por glucocorticoides (GITR), encefalitis alérgica experimental (EAE), receptor de quimioquinas CCR5, TI-ST2) o un marcador secretado (v.g. IL4, IL13, IL-5, IL-10, TGF $\beta$ ). Una actividad incrementada de las células T reguladoras puede estar representada por un aumento (v.g., FoxP3, Ox40, 4-1BB, CD4, CTLA-4, CD25, CD103, CD62L, integrina  $\alpha\epsilon\beta$ , LAP, GITR, EAE, CCR5, TI-ST2, IL-10, TGF $\beta$ ) o una disminución (v.g., D45Rc), en el nivel de un marcador de las células T reguladoras, de al menos 40%, v.g., 50%, 80%, 100%, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o más, medida de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se describe en esta memoria.

Una preparación de parásitos que altera una actividad de las células T reguladoras puede cambiar el nivel de dos o más marcadores descritos anteriormente en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "el nivel de un marcador de las células T reguladoras" se refiere a la cantidad de un marcador específico de las células T reguladoras en una diana, v.g., medida en microgramos o cantidades molares. Típicamente, el marcador de las células T reguladoras es una proteína, para la cual la cantidad puede medirse por cualesquiera métodos conocidos en la técnica para cuantificación de proteínas, por ejemplo, por ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, o análisis FACS (v.g., en Innis et al., (1990) Academic Press, Inc.; Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2nd Edition, Sambrook, et al. (1989); and Current Protocols in Molecular Biology (1997, Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.)). El nivel de un marcador proteínico puede medirse también por su nivel de mRNA de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, v.g., por transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, análisis de microrredes (v.g., en Innis et al., (1990) Academic Press, Inc.; Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2d Edition, Sambrook, et al. (1989); y Current Protocols in Molecular Biology (1997, Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.)).

Como se utiliza en esta memoria, el término "diana" se refiere a un sistema in vitro (v.g., tejido o células cultivados, extracto de transcripción/traducción).

La descripción describe también un método de prevención o tratamiento de una enfermedad causado por una respuesta inmune alterada en un animal que comprende administrar una preparación de parásitos helmínticos en una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad en el animal.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "enfermedad causada por una respuesta inmune alterada" se refiere a una enfermedad que desarrolla un animal (v.g., un humano) debida a una diferencia en su respuesta inmunitaria comparada con un animal que no presenta la enfermedad. Por ejemplo, el animal que presenta la enfermedad puede tener una respuesta inmunitaria anormal (v.g., excesiva o insuficiente) frente a un antígeno (v.g., un antígeno propio o extraño) comparada con una respuesta al mismo antígeno en un animal normal no enfermo. Una "enfermedad causada por una respuesta inmune alterada", de acuerdo con la presente descripción incluye, pero sin

carácter limitante, una enfermedad relacionada con Th1 o una enfermedad relacionada con Th2 como se describe en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "enfermedad relacionada con Th1" se refiere a una enfermedad en la cual las células Th1 soportan, causan o median el proceso de la enfermedad o en la cual las células Th1 están implicadas en la curación o el alivio de los síntomas de la enfermedad, lo que puede estar representado por una actividad Th1 incrementada o reducida. Por "incrementado", se entiende que un animal enfermo presenta un aumento (v.g., al menos dos veces, y posiblemente 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o más) en su actividad Th1, comparado con otro animal que no presenta la enfermedad. Una actividad Th1 incrementada puede medirse por un aumento en el nivel de citoquinas secretadas (v.g., IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IgG2a, IL-12, IL-18, IL-23), o una disminución en el nivel de citoquinas secretadas (v.g., IL-4, IL-13), de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por "reducido", se entiende que un animal enfermo presenta una disminución (v.g., al menos 50% inferior, o dos veces, y posiblemente 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o menos) en su actividad Th1, comparado con otro animal que no presenta la enfermedad. Una actividad Th1 reducida puede medirse por una disminución en el nivel de citoquinas secretadas (v.g., IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IgG2a), o un aumento en el nivel de citoquinas secretadas (v.g., IL-4, IL-13), de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y como se describe en esta memoria y en la solicitud de patente de los Estados Unidos US 2003/039666.

Como se utiliza en esta memoria, el término "reducido" se utiliza intercambiamente por el término "disminuido", y el término "aumentado" se utiliza intercambiamente con el término "incrementado".

Como se utiliza en esta memoria, el término "enfermedad relacionada con Th2" se refiere a una enfermedad, en la cual las células Th2 soportan, causan o median el proceso de la enfermedad o en la cual las células Th2 están implicadas en la curación o el alivio de los síntomas de la enfermedad, que puede representarse por una actividad Th2 incrementada o reducida. Por "aumentado", se entiende que un animal enfermo presenta un aumento (v.g., al menos dos veces, y posiblemente 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o más) en su actividad Th2, comparado con otro animal que no presenta la enfermedad. Una actividad Th2 incrementada puede medirse por un aumento en el nivel de citoquinas y anticuerpos secretados (v.g., IL-4, IL-5, IgE e IgG1) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por "reducido", se entiende que un animal enfermo presenta una disminución (v.g., al menos 50%, dos veces, y posiblemente 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, o menos) en su respuesta Th2, comparado con otro animal que no presenta la enfermedad. Una actividad Th2 reducida puede medirse por una disminución en el nivel de citoquinas y anticuerpos secretados (v.g., IL-4, IL-5, IgE e IgG1) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y como se describe en esta memoria y en la solicitud U.S. US 2003/039666.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "eficacia del tratamiento" se refiere a la efectividad de un tratamiento de una enfermedad utilizando una preparación de parásitos. La "eficacia del tratamiento" se mide usualmente por la respuesta clínica a una enfermedad específica para la cual se ha tratado o está siendo tratado el animal con una preparación de parásitos.

### **PARÁSITOS HELMÍNTICOS**

Los parásitos helmínticos útiles incluyen, pero sin carácter limitante, dos grupos. El primer grupo está constituido por parásitos helmínticos que colonizan naturalmente en los humanos, y el segundo grupo está constituido por parásitos helmínticos que colonizan animales, pero pueden proporcionar protección a los humanos.

En el primer grupo, los parásitos helmínticos son gusanos multicelulares complejos con ciclos vitales y desarrollo complicados. Los nematodos (gusanos redondos no segmentados), y los platelmintos (gusanos planos) son dos grupos de helmintos que colonizan los intestinos humanos. De acuerdo con la presente invención, uno cualquiera de cierto número de parásitos helmínticos que colonizan naturalmente humanos o animales proporcionará los resultados propuestos.

Los nematodos que habitan frecuentemente en el intestino humano son *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (gusano oxiuro), *Trichuris trichiura* (gusano látigo), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (anquilostomas), y *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* infesta brevemente el intestino delgado.

Los platelmintos incluyen los trematodos y cestodos. Los trematodos adultos más comunes que residen en los intestinos humanos son especies de *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y *Heterophyes*. Los que viven en el sistema biliar incluyen *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* y *felineus*, y *Fasciola hepatica*. Los esquistosomas residen en el sistema venoso, pero varias especies afectan crónicamente al intestino por el paso de huevos a través de la pared intestinal. Los cestodos adultos que infectan comúnmente humanos son especies de *Diphyllobothrium* (tenia de los peces), *Taenia saginata* (tenia de la carne de vacuno), *Taenia solium* (tenia del cerdo) e *Hymenolepsis nana* (tenia enana).

Otros helmintos de interés incluyen los parásitos filariales y las duelas del pulmón. Éstos no poseen una fase intestinal, pero estimulan respuestas fuertes de tipo Th2.

El segundo grupo general de parásitos helmínticos que pueden ser utilizados en la presente invención incluye



- helmintos que colonizan animales, pero pueden proporcionar protección a los humanos contra enfermedades mediadas por el sistema inmunitario. Éstos incluyen *Trichuris muris* (gusano látigo del ratón), *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Helimonsomoides polygyrus* e *Hymenolepis nana*, todos los cuales son helmintos intestinales que infectan ratones. Adicionalmente, *Angiostrongylus* es un helminto de la rata. *Trichuris suis* y *Ascaris suum* son helmintos del cerdo que pueden infectar humanos. *Trichuris vulpis*, especies de *Toxocara*, *Gnathostoma* y *Ancylostoma* son helmintos del perro o el gato que pueden infectar también humanos. *Anisakis* y *Pseudoterranova* son nematodos de mamíferos marinos que pueden transmitirse a humanos. Los esquistosomas de las aves pueden infectar transitoriamente humanos. Tales esquistosomas incluyen *S. douthitti*, *Trichobilharzia ocellata*, *T. stagnico/ae*, *T. physellae*, y *Gigantobilharzia huronensis*.
- 5 La preparación helmíntica puede seleccionarse del grupo constituido por helmintos que colonizan naturalmente humanos y helmintos que colonizan animales pero pueden proteger humanos o animales de una enfermedad causada por una respuesta inmunitaria alterada.
- En algunas realizaciones de la invención, el parásito helmíntico es un nematodo, y puede seleccionarse del grupo tal como *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* y *Trichinella spiralis*.
- 15 En otras realizaciones de la invención, el parásito helmíntico es un platelminto, y puede seleccionarse del grupo constituido por trematodos y cestodos, tales como *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y especies de *Heterophyes*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus*, *Fasciola hepatica*, especies de esquistosoma, especies de *Diphyllobothrium*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* e *Hymenolepis nana*.
- 20 En otras realizaciones, el parásito helmíntico se selecciona del grupo constituido por parásitos filariales y duelas del pulmón.
- En realizaciones preferidas, los parásitos helmínticos se seleccionan del grupo constituido por *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Helimonsomoides polygyrus*, *Hymenolepis nana*, especies de *Angiostrongylus*, *Trichuris suis*, *Ascaris suum*, *Trichuris vulpis*, especies de *Toxocara*, especies de *Gnathostoma*, especies de *Ancylostoma*, especies de *Anisakis* y especies de *Pseudoterranova*.
- 25 Se prefiere que los animales preparatorios para producción y preparación de los parásitos se generen en ambiente exento de patógenos específicos (SPF) (v.g. exento de patógenos humanos específicos).

#### ENFERMEDADES QUE PUEDEN TRATARSE

- 30 Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la descripción incluyen, pero sin carácter limitante, enfermedades relacionadas con Th1 y relacionadas con Th2, con inclusión de cánceres relacionados con Th1 o Th2.

##### Enfermedades Relacionadas con Th1

Las enfermedades relacionadas con Th1 comprenden los grupos de enfermedades siguientes: enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, enfermedades de hipersensibilidad de tipo retardado y cáncer.

El grupo de enfermedades infecciosas incluye enfermedades causadas por parásitos y virus, tales como HIV.

- 35 El grupo de enfermedades autoinmunes incluye enfermedades encefalomielopáticas, desmielinantes y otras enfermedades autoinmunes.

- 40 Ejemplos de enfermedades encefalomielopáticas incluyen, pero sin carácter limitante, esclerosis múltiple (MS), esclerosis diseminada; esclerosis focal; esclerosis insular; tabes dorsalis (esclerosis posterior); encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (o autoinmune) aguda y crónica, que es un modelo animal de MS; síndrome de Guillain-Barr; neuritis alérgica experimental (un modelo animal del síndrome de Guillain-Barr); encefalomiелitis aguda diseminada; encefalomiелitis miálgica (benigna y epidémica); encefalomiелitis viral; encefalomiелitis granulomatosa; etc. Se incluyen también enfermedades animales, tales como, pero sin carácter limitante, el moquillo de los caninos; el moquillo de los felinos; la encefalomiелitis de los equinos (oriental, de Venezuela, y occidental); encefalomiелitis aviaria; encefalomiелitis porcina; ENCEFALOMIELITIS bovina; encefalomiелitis del ratón; etc.

- 45 Ejemplos de enfermedades desmielinantes incluyen, pero sin carácter limitante, esclerosis múltiple (MS), esclerosis diseminada (DS), encefalomiелitis aguda diseminada; leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), y panencefalitis esclerótica subaguda (SSPE).

- 50 Ejemplos de otras enfermedades autoinmunes incluyen esclerosis múltiple (MS), poliartritis nodosa, asma, neumonía por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar intersticial, sarcoidosis, fibrosis idiopática pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa o enfermedad de Whipple, enfermedad pulmonar intersticial asociada con granulomatosis de Wegener o vasculitis por hipersensibilidad,

síndromes de vasculitis, púrpura de Hennoch-Schonleins, síndrome de Goodpastures, granulomatosis de Wegener,

5 enfermedades renales tales como glomerulopatía mediada por anticuerpos como en la glomerulonefritis aguda, nefritis asociada con lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis asociada con otras enfermedades sistémicas tales como granulomatosis de Wegener y síndrome de Goodpastures y enfermedad mixta del tejido conectivo, nefritis intersticial crónica, glomerulonefritis crónica,

enfermedades gastrointestinales (v.g. IBD), tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, colitis colagenosa, colitis eosinofílica, colitis linfocítica,

10 enfermedades hepato biliares tales como hepatitis auto-inmune, hepatitis inducida por alcohol, fibrosis periportal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante,

enfermedades de la piel tales como psoriasis, dermatitis atópica, eccema, enfermedad alérgica de la piel, esclerosis sistémica progresiva (escleroderma), dermatitis exfoliante, pénfigo vulgar,

enfermedades de las articulaciones tales como artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante, artritis asociada con psoriasis o enfermedad intestinal inflamatoria,

15 enfermedades musculoesqueléticas tales como miastenia grave (MG), polimiositis,

enfermedades endocrinas tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis auto-inmune (Hashimoto), tirotoxicosis, hipertiroidismo (enfermedad de Graves),

enfermedades del sistema hematopoyético tales como anemia auto-inmune, trombocitopenia auto-inmune, anemia aplásica auto-inmune,

20 enfermedades cardiovasculares tales como cardiomiopatía, vasculitis, enfermedad cardiovascular asociada con enfermedades sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, poliartritis nodosa, artritis reumatoide, escleroderma, y sarcoidosis.

25 Una característica notable de las enfermedades autoinmunes es su agrupación familiar y asociación con la expresión de genes particulares, en particular genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II. Por ejemplo, una gran proporción de pacientes de MS tienen el haplotipo HLA-DR2 (Beall SS, Concannon P, Charnley P, et al., J. Neuroimmunol., v 21, p 59-66, 1989). Dado que no todos los individuos con un genotipo susceptible desarrollan la enfermedad autoinmune, parece ser que factores ambientales juegan también un papel importante. Por ejemplo, la MS parece ser más común en individuos que viven en regiones de clima templado. (Kurtzke JF, en: *Multiple sclerosis*, Hallpike JF, Adams CWM, Tourtelotte WW, editores, Williams and Wilkins, Baltimore MD., 1983, p 49-95). Se ha especulado durante mucho tiempo que el factor ambiental de las enfermedades autoinmunes puede ser un agente infeccioso tal como un virus. La etiología de varias enfermedades humanas y animales puede atribuirse a infección viral. Por ejemplo, la encefalomiелitis murina de Theiler es una enfermedad desmielinante con signos clínicos y patológicos similares a la EAE. Aunque están implicados anticuerpos en algunas respuestas efectoras de enfermedades autoinmunes, el suceso desencadenante en la mayoría de los casos comienza con la activación de células T CD4 que se requieren para la maduración y la expansión clonal de las células B.

35 El grupo de hipersensibilidad de tipo retardado incluye hipersensibilidad de contacto a sustancias de peso molecular bajo.

#### **A. Enfermedades inflamatorias intestinales (CD y UC):**

40 Datos epidemiológicos sugieren una susceptibilidad genética al desarrollo de la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC). La incidencia de CD en las sociedades industrializadas ha aumentado desde los años 1950 hasta mediados de 1980, y actualmente es de 1 a 8 por cada 100.000 personas al año. Esto sugiere que cambios desconocidos en nuestro ambiente han afectado a la frecuencia de la CD.

45 Si bien la causa de la IBD sigue siendo indeterminada, se supone que es resultado de la disregulación del sistema inmunitario de la mucosa intestinal. Las células inflamatorias en la mucosa nos protegen normalmente de los contenidos lumenales. Esta inflamación crónica altamente eficaz está fuertemente controlada para limitar la lesión tisular. La IBD puede ser resultado de respuestas inmunitarias inadecuadamente energéticas a los factores lumenales. La CD parece ser una inflamación de tipo Th1 excesivamente energética que produce IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ . La naturaleza de la UC está poco definida.

50 La colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) son trastornos de derivación compleja causados por la interacción de exposiciones ambientales insuficientemente definidas y al menos en algunos casos, la herencia de genes de susceptibilidad. A menudo se cita como evidencia de la predisposición genética para IBD la frecuencia

mayor que lo esperado de IBD en miembros familiares de pacientes con esta afección y la alta prevalencia de la enfermedad en las poblaciones judías de los países occidentales (Roth MP, Petersen GM, McElree C et al. *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology* 1989; 97(4):900-4). Sin embargo, la IBD es mucho menos prevalente en la población judía de Israel (Fireman Z, Grossman A, Lilos P et al. *Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970-1980*. *Am. J. Gastro* 1989; 84(3):255-8) con origen étnico similar (Grossman A, Fireman Z, Lilos P et al. *Epidemiology of ulcerative colitis in the Jewish population of central Israel 1970-1980*. *Hepato-Gastroenterology* 1989; 36(4):193-7). Estudios duplicados proporcionan evidencia de la predisposición genética al menos para CD (Halfvarson J, Bodin L, Tysk C et al. *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology* 2003; 124(7):1767-73.). Un defecto genético en CARD15/NOD2, una proteína intracelular que detecta el producto bacteriano muramyl-dipéptido (Inohara M, Ogura Y, Fontalba A et al. *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease*. *J Biol Chem* 2003; Girardin SE, Boneca IG, Viala Jet al. *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem* 2003), hace que ciertas gentes sean más propensas a CD. Diversas otras alteraciones genéticas se han propuesto como factores de riesgo para IBD. Sin embargo, las predisposiciones genéticas no explican la incidencia rápidamente creciente de la enfermedad.

Existen varios modelos animales de inflamación intestinal crónica, por ejemplo, como ha sido consignado por Elliott et al. (Elliott et al., 1998, *Inflammatory Bowel Disease and Celiac Disease*. En: *The Autoimmune Diseases*, 3ª ed., N.R. Rose and I.R. MacKay, eds. Academic Press, San Diego, CA). Un avance importante es el descubrimiento reciente de que algunos ratones con deleciones génicas producidas por ingeniería genética pueden desarrollar inflamación intestinal crónica similar a IBD, véase Elson et al., 1995, *Gastroenterology* 109: 1344. Éstos incluyen ratones mutantes que llevan deleciones direccionadas para los genes de IL-2, IL-10, MHC clase II o TCR entre otros. Utilizando algunos de los modelos, Berg et al., 1996, *J. Of Clin. Investigation* 98: 1010, Ludviksson et al., 1997, *J. of Immunol.* 158: 104, y Mombaerts et al., 1993, *Cell* 75: 274 han demostrado que un sistema inmune disregulado puede mediar por sí mismos lesión intestinal. La inflamación mucosal de varios de estos modelos genera grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sugiriendo que la producción en exceso de citoquinas de tipo Th1 es un mecanismo común que subyace en la patogénesis de la enfermedad. Asimismo, el bloqueo de la circuitería Th1 previene la inflamación. CD es una respuesta Th1. Así pues, estos modelos pueden tener implicaciones directas en lo que respecta a la inmunopatología de este proceso de enfermedades humanas.

### **B. Artritis Reumatoide (RA):**

La RA es una enfermedad crónica que se caracteriza por sinovitis inflamatoria persistente, implicando usualmente las articulaciones periféricas en una distribución simétrica. Esta inflamación puede conducir a erosiones óseas, deterioro de los cartílagos y destrucción de las articulaciones. Es una aflicción de aproximadamente el 1% de la población. La prevalencia aumenta con la edad, y las mujeres se ven afectadas más frecuentemente que los varones. La propagación de RA es un suceso mediado inmunológicamente, impulsado por las células Th1 CD4+.

### **C. Diabetes Mellitus (DM) Juvenil Dependiente de Insulina (tipo 1):**

La DM tipo 1 es una enfermedad que comienza usualmente durante la primera edad adulta y que es resultado de la incapacidad de producir insulina en respuesta al azúcar en sangre creciente. Este alto contenido persistente de azúcar en sangre y la incapacidad para metabolizar adecuadamente la glucosa causa alteraciones metabólicas que finalmente lesionan los ojos, los riñones, el corazón y otros órganos. La toma de insulina por vía parenteral puede controlar parcialmente estos problemas metabólicos. La DM tipo 1 es resultado de un ataque autoinmune sobre las células beta del páncreas, que son la fuente de insulina. Los macrófagos activados y las células T citotóxicas envuelven y destruyen las células beta pancreáticas. La susceptibilidad genética y eventos ambientales escasamente definidos desencadenan el proceso de la enfermedad.

### **D. Lupus eritematoso (LE):**

LE es una enfermedad autoinmune sistémica que es más frecuente en mujeres de edad adulta temprana a media. El deterioro tisular está causado por autoanticuerpos y células T reguladoras hiper-reativas. La respuesta inmune anormal permite una producción sostenida de autoanticuerpos patógenos y complejos inmunes. Esto conduce al deterioro de los sistemas musculoesqueléticos, cutáneos, hematológicos, renales y otros. La respuesta inmune anormal depende probablemente de la interacción de factores hereditarios y ambientales múltiples.

### **E. Sarcoidosis:**

La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa crónica de los pulmones y otros órganos de causa desconocida. La mayoría de los pacientes se presenta entre las edades de 20 a 40 años. El síntoma más frecuente es la dificultad respiratoria. La enfermedad es resultado de una respuesta inmune celular de tipo Th1 exagerada, probablemente a un número limitado de antígenos. La sarcoidosis se desarrolla en todo el mundo, y aflige a todas las razas. No obstante, existe una diversidad notable de la prevalencia de la sarcoidosis entre ciertos grupos étnicos y raciales. Por ejemplo, la enfermedad es rara en Polonia, el sudeste de Asia y la India.

**F. Esclerosis múltiple (MS):**

La MS es un trastorno inflamatorio multifocal crónico recurrente, del sistema nervioso central que conduce a desmielinación focal y formación de cicatrices en el cerebro. Es una enfermedad frecuente que afecta a aproximadamente 350.000 americanos y que comienza durante la edad adulta temprana a media. La MS es una enfermedad autoinmune mediada al menos en parte por las células Th1. Las lesiones de MS se asemejan a las inducidas por respuestas de hipersensibilidad retardada que contienen células T activadas y macrófagos. Se trata de una enfermedad de los climas templados, que aumenta en prevalencia con la distancia del ecuador.

Enfermedades relacionadas con Th2

Las enfermedades relacionadas con Th2 comprenden los grupos de enfermedades siguientes: enfermedades alérgicas y cáncer.

Es bien sabido que individuos predispuestos genéticamente llegan a quedar sensibilizados (alérgicos) a antígenos originarios de una diversidad de fuentes ambientales, a las cuales se ven expuestos los individuos. La reacción alérgica ocurre cuando un individuo previamente sensibilizado se expone de nuevo al mismo alérgeno o a un alérgeno homólogo. Las respuestas alérgicas abarcan desde fiebre del heno, rinoconjuntivitis, rinitis y asma a anafilaxis sistémica y muerte en respuesta a, v.g., picadura de abejas o moscardones o mordedura de insectos. La reacción es inmediata y puede estar causada por una diversidad de alérgenos atópicos tales como compuestos originarios de hierbas, árboles, malezas, insectos, ácaros (del polvo doméstico), alimentos, fármacos, productos químicos y perfumes.

El grupo de enfermedades alérgicas incluye fiebre del heno, rinoconjuntivitis, rinitis y asma.

Los alérgenos más comunes, a los cuales se presentan reacciones alérgicas, incluyen alérgenos de inhalación originarios v.g., de árboles, céspedes, hierbas, hongos, ácaros de polvo doméstico, ácaros de almacenes, cucarachas y pelo animal, plumas, y caspa. Alérgenos importantes del polen de árboles, céspedes y hierbas son sustancias de este tipo originarias de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales y Pinales que incluyen, a saber, abedul (Betula), aliso (Alnus), avellano (Corylus), carpe (Carpinus) y oliva (Olea), el orden de las Poales que incluye, entre otros, céspedes de los géneros Lolium, Phleum, Poa, Cynodon, Dactylis y Secale, los órdenes de Asterales y Urticales que incluyen entre otras, hierbas de los géneros Ambrosia y Artemisia. Alérgenos de inhalación importantes de hongos son, entre otros, los originarios de los géneros Alternaria y Cladosporium. Otros alérgenos de inhalación importantes son los de los ácaros del polvo doméstico de los géneros Dermatophagoides, ácaros de almacenes del género Lepidoglyphys destructor, los de cucarachas y los de mamíferos tales como gato, perro, caballo, vaca, y aves. Asimismo, se observan comúnmente reacciones alérgicas frente a insectos picadores o mordedores tales como los del orden taxonómico de los Himenópteros que incluyen abejas, avispas y hormigas. Componentes de alérgenos específicos son conocidos por las personas expertas en la técnica e incluyen v.g. Bet v 1 (B. verrucosa, abedul), Aln g1 (Alnus glutinosa, aliso), Cor a 1 (Corylus avelana, avellano) y Car b 1 (Carpinus betulus, carpe) del orden Fagales. Otros son Cry j 1 (Pinales), Amb a 1 y 2, Art v 1 (Asterales), Par j 1 (Urticales), Ole e 1 (Oleales), Ave e 1, Cyn d 1, Dac g 1, Fes p 1, Hol l 1, Lol p 1 y 5, Pas n 1, Phi p 1 y 5, Poa p 1, 2 y 5, Sec c 1 y 5, y Sor h 1 (pólenes de diversos céspedes), Alt a 1 y Cha h 1 (hongos), Der f 1 y 2, Der p 1 y 2 (ácaros del polvo doméstico, D. farinae y D. pteronyssinus, respectivamente), Lep d 1, Bla g 1 y 2, Per a 1 (cucarachas, Blattella germanica y Periplaneta americana, respectivamente), Fel d 1 (gato), Can f 1 (perro), Equ e 1, 2 y 3 (caballo), Apis m 1 y 2 (abeja), Ves g 1, 2 y 5, Pol a 1, 2 y 5 (todos ellos de avispas) y Sol i 1, 2, 3 y 4 (hormiga roja), para mencionar los más comunes.

**A. Asma**

En muchas gentes, el asma parece ser una reacción alérgica a sustancias aspiradas comúnmente del aire, tales como caspa de animales, polen, o productos residuales de ácaros del polvo y cucarachas. El nombre general para estas sustancias, alérgenos, hace referencia a cualquier cosa que provoca una reacción alérgica. Algunas personas tienen una predisposición genética a reaccionar a ciertos alérgenos. En 1998, un número estimado de 17 millones de americanos, es decir el 6,4% de la población, padecía asma. Los niños dan cuenta de 4,8 millones de americanos con asma. La información disponible experimental y clínica de ambos modelos animales así como información clínica acerca de la patología del asma humano, señala las células Th2 en la patología de esta enfermedad.

Cánceres relacionados con Th1 y Th2.

En general, las células del cáncer pueden generar una respuesta inmune a los antígenos expresados específicamente por la célula del cáncer. Dado que ambas respuestas inmunes de Th1 y Th2 pueden impulsar respuestas inflamatorias fuertes que conducen a la erradicación citotóxica del tejido, la modulación de las respuestas inmunes Th1 o Th2 puede utilizarse en el tratamiento del cáncer.

Los cánceres que pueden tratarse con la composición de acuerdo con la descripción pueden clasificarse histogenéticamente como tumores epiteliales malignos, con inclusión de carcinomas y adenocarcinomas, y como

tumores no epiteliales malignos, que incluyen liposarcomas, fibrosarcomas, condrosarcomas, osteosarcomas, leiomiomas, rhabdomiomas, gliomas, neuroblastomas, meduloblastomas, melanoma maligno, meningioma maligno, diversas leucemias, diversos trastornos mieloproliferativos, diversos linfomas (linfoma de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin), hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, teratoma maligno, disgerminoma, seminoma, y coriocarcinoma. Los carcinomas y adenocarcinomas son los más abundantes (dando cuenta de aproximadamente el 90% de las muertes por cáncer) y son por consiguiente enfermedades diana interesantes para tratamiento/prevenición de acuerdo con la descripción. Los carcinomas y adenocarcinomas más importantes son los de las vías aéreas (especialmente de origen bronquial), de la mama, del tracto colorrectal y del estómago. Sin embargo, también carcinomas y adenocarcinomas de próstata, ovario, tejido linfoide y médula ósea, del útero, del páncreas, del esófago, de la vejiga urinaria, y del riñón causan un número importante de muertes y son por tanto interesantes.

El grupo de enfermedades cancerosas incluye adicionalmente el síndrome de Sezary, el linfoma de las células T cutáneas, el carcinoma hepático y el cáncer de pulmón.

### CÉLULAS T REGULADORAS EN ENFERMEDADES RELACIONADAS CON TH1 O TH2

Las células T reguladoras pueden inducir tolerancia periférica y limitar la reactividad mucosal (McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol 2002; 23(9):450-5). En diversos modelos animales, se han consignado varios fenotipos de células T reguladoras. Las células T reguladoras expresan diversos marcadores y se ha indicado que están implicadas en diferentes enfermedades (Véase, v.g., Field, A. C., L. Caccavelli, M. F. Bloch, y B. Bellon. 2003. *Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity*. Journal of Immunology. 170:2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):223-32; Francois Bach J. *Regulatory T cells under scrutiny*. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy*. Curr Opin Immunol. 2002 Dec; 14(6):771-8; McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol. 2002 Sep; 23(9):450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. *Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease*. Immunol Rev. 2001 Aug; 182:135-48; Read S, Powrie F. *CD4(+) regulatory T cells*. Curr Opin Immunol. 2001 Dec; 13(6):644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. *Regulatory T cells and allergic asthma*. Microbes Infect. 2001 Sep; 3(11):899-904). En algunos sistemas, aquéllas se distinguen por expresión diferencial de moléculas superficiales como CD25 (Shevach, E. M. 2002. *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nature Reviews. Immunology. 2:389-400), CD45RB (Annacker, O. y F. Powrie. 2002. *Homeostasis of intestinal immune regulation*. Microbes & Infection. 4:567-574), y CTLA-4 (Read, S., V. Malmstrom, y F. Powrie. 2000. *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J.Exp.Med 192:295-302). Este patrón de expresión de proteínas de la superficie celular sugiere que las mismas pueden encontrarse en un estado efector o de memoria cebado. Estas células reguladoras pueden mediar algunos de sus efectos por la producción de IL10 y TGFβ. Se ha descrito una célula T reguladora anérgica (Tr1) que produce niveles altos de IL10 y TGFβ. Otra célula denominada Th3 suprime la inducción de la encefalomielitis autoinmune experimental fundamentalmente por la producción de TGFβ. Sin embargo, otras no son dependientes de IL10 o TGFβ solubles, sino que en lugar de ello expresan en su superficie el péptido asociado a la latencia, que es el dominio amino-terminal del péptido precursor de TGFβ (Oida T, Zhang X, Goto M et al. *CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism*. J Immunol 2003; 170(5):2516-22). Se han publicado también marcadores celulares internos para las células T reguladoras (Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF, *Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation*. J Biol Chem. 2001 Oct 5; 276(40):37672-9).

Ratones Rag reconstituidos con células T CD4+, CD45<sup>high</sup> pueden desarrollar colitis severa, que puede prevenirse por co-transferencia de células T CD4+, CD45<sup>low</sup> (Annacker O, Powrie F. *Homeostasis of intestinal immune regulation*. Microbes & Infection 2002; 4 (5): 567-74). Se requieren TGFβ e IL10 para protección, lo cual sugiere un papel para estas citoquinas en el proceso regulador.

### PREPARACIONES DE PARÁSITOS HELMÍNTICOS

Los helmintos son animales parásitos (gusanos), que, dependiendo de la especie, viven en lugares como el lumen intestinal, el torrente sanguíneo o los músculos del hospedador. Estos organismos colonizan más de 1/3 de la población mundial. La colonización con helmintos es muy común en los niños que viven en climas cálidos y se encuentran en condiciones sanitarias deficientes. Las formas infecciosas de estos organismos se propagan por contacto con suelo, alimentos o agua contaminados. Antes de los años 1940, muchos niños y adultos en los Estados Unidos eran portadores de helmintos. El ser portador de gusanos era particularmente común en las áreas rurales del Sur y en poblaciones pobres de las principales ciudades (Elliott DE, Urban JF, Jr., Argo CK et al. *Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?* FASEB J 2000; 14(12):1848-55). En los Estados Unidos y en Europa, la colonización con helmintos ha descendido constantemente. Los mismos se encuentran en inmigrantes recientes de países menos desarrollados (Salas SD, Heifetz R, Barrett-Connor E. *Intestinal parasites*

in Central American immigrants in the United States. Arch Intern Med 1990; 150(7):1514-6) y en poblaciones económicamente desfavorecidas que viven en regiones insuficientemente atendidas de los Estados Unidos, como algunas reservas indias (Healy GR, Gleason NN, Bokart R et al. *Prevalence of ascariasis and amebiasis in Cherokee Indian school children*. Public Health Rep 1969; 84(10); 907-14). La prevalencia de helmintos es máxima en climas cálidos y poblaciones expuestas a aglomeración, sanidad deficiente y suministro de alimentos contaminados. La enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), la artritis reumatoide y las enfermedades autoinmunes son raras en estas mismas regiones.

Nematodos que habitan frecuentemente en el intestino humano son *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (oxiuro), *Trichuris trichiura* (gusano látigo), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (anquilostomas), y *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* infesta fugazmente el intestino delgado.

Los platelmintos incluyen trematodos y cestodos. Los trematodos adultos más comunes que residen en los intestinos humanos son especies *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y *Heterophyes*. Los que habitan en el sistema biliar incluyen *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* and *felineus*, y *Fasciola hepatica*. Los esquistosomas residen en el sistema venoso, pero varias especies afectan crónicamente el intestino por el paso de huevos a través de la pared intestinal. Cestodos adultos que infectan comúnmente humanos son especies de *Diphyllobothrium* (tenia de los peces), *Taenia saginata* (tenia de la carne de vacuno), *Taenia solium* (tenia del cerdo) e *Hymenolepis nana* (tenia enana).

El hospedador adquiere diversas especies de helmintos por contacto con el suelo, los alimentos o el agua contaminados con la forma infecciosa del parásito. Los niños albergan muy frecuentemente infecciones helmínticas debido a su contacto íntimo con el suelo y prácticas higiénicas subóptimas. Los helmintos provocan una respuesta intestinal Th2, que puede causar expulsión de los gusanos o limitar la magnitud de la infección. La mayoría de los niños que viven en países no industrializados adquieren estos parásitos. Muchas especies de helmintos sobreviven durante años en el intestino, el árbol biliar o las venas mesentéricas, produciendo miles de huevos diariamente. Así, comenzando en la infancia, estos gusanos y/o sus ova liberan moléculas que bañan la superficie mucosa intestinal durante años, provocando inflamación de tipo Th2.

#### A. Vacunas de Organismos Viables:

Los organismos parásitos helmínticos viables pueden proporcionar la afección mucosal más profunda debido a su longevidad relativa comparada con las vacunas de componentes. Los organismos viables pueden administrarse en sus formas de huevo, larva, cercaria, o larva enquistada, dependiendo del helminto. Pueden utilizarse helmintos que pueden colonizar humanos y un animal preparatorio. El animal preparatorio puede precisar manipulación para permitir alta permeabilidad por los helmintos. Dicha manipulación puede incluir tratamiento con agentes que son inmunosupresores como glucocorticoides o azatioprina; agentes que impiden los efectos de Th2 como anti-histaminas, anti-citoquinas, o citoquinas recombinantes; y agentes que influyen en la motilidad intestinal como anti-colinérgicos u opiáceos. La dieta del animal se alterará para reducir el contenido de fibra de grano grueso. El animal puede ser una rata, cerdo, hámster, ave u otro animal preparatorio.

Los animales preparatorios se generan en ambientes específicos exentos de patógenos (SPF) (v.g. exentos de patógenos humanos específicos) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los mismos se testan para asegurar la ausencia de patógenos bacterianos, microbacterianos, y virales humanos. Métodos para generación de animales en ambiente SPF y la ventaja de los mismos se describen en la técnica, v.g., por M. Michael Swindle (J. Invest. Surg. 9: 267-271, 1996). Swindle enumera también varios patógenos potenciales humanos virales y bacterianos de importancia. De acuerdo con ello, las preparaciones de parásitos derivados de animales generados en un entorno humano específico exento de patógenos no contendrían estos patógenos humanos, y como tales son distintos desde el punto de vista de la patentabilidad de las preparaciones de parásitos preparadas a partir de animales generados en cualquier ambiente SPF.

**Huevos:** Algunos helmintos intestinales se adquieren por ingestión de huevos viables. Los helmintos se mantienen en los animales preparatorios SPF, por ejemplo, cerdos SPF. Para cosechar los huevos, los animales reciben una dieta especial baja en fibra de grano grueso. Los animales reciben un purgante por vía oral para inducir la defecación. Se recogen las heces y se digieren enzimáticamente para poner en libertad los huevos. Se aíslan los huevos de las heces licuadas por flotación en gradientes de densidad, filtración por tamiz, filtración Visser, o elutriación centrífuga. La preservación de los huevos varía con el helminto utilizado. Los huevos de helmintos que son resistentes a la desecación se secan, se mezclan con material inerte, se incorporan en una cápsula entérica, y se refrigeran. Los huevos de helmintos que son sensibles a la desecación se preservan por refrigeración en medio líquido o por adición de un crioprotector y congelación en nitrógeno líquido. Los huevos viables se lavan, y se mezclan con pudín enfriado exento de lactosa u otro vehículo en el lugar de suministro. Los huevos almacenados en crioprotector basado en glicerol pueden no requerir lavado. Los huevos de cada lote se testan respecto a tasa de eclosión a fin de determinar la dosificación eficaz. Los huevos de cada lote se testan respecto a ausencia de patógenos bacterianos y virales.

**Larvas:** Algunos helmintos (a saber los anquilostomas) requieren una fase de maduración en suelo antes que puedan colonizar humanos. Los huevos de estos agentes se incubarán en condiciones óptimas para madurar el embrión, o eclosionar el huevo y proporcionar formas larvianas. Los pacientes pueden inocularse por inyección subcutánea o ingestión oral de larvas viables.

5 **Cercarias:** Algunos helmintos tienen ciclos de vida complejos que utilizan un hospedador intermedio. El hospedador intermedio difunde la forma capaz de colonizar humanos. Las cercarias tienen la forma de helmintos trematodos (es decir, duelas) difundidas por hospedadores intermedios como caracoles. Las cercarias se aíslan de los caracoles colonizados dejados crecer en condiciones SPF. Las cercarias se lavan. Éstas pueden preservarse por adición de crioprotector y congelación en nitrógeno líquido. Las cercarias descongeladas o frescas se lavan y se inyectan subcutáneamente para inocular los pacientes. Se testan muestras de cada lote respecto a la ausencia de patógenos y para determinar la dosis eficaz.

15 **Larvas enquistadas:** Algunos helmintos (v.g. las tenias) forman larvas enquistadas o cisticercos en hospedadores intermedios. Es la forma larvaria enquistada la que inicia la colonización humana. Las larvas enquistadas se retiran de los hospedadores intermedios, por ejemplo, ganado o peces o plantas cultivadas en condiciones SPF. Los quistes se lavan para dejarlos exentos de tejido remanente del hospedador. Los quistes pueden preservarse por adición de crioprotector y congelación en nitrógeno líquido. Los quistes se descongelan o se utilizan frescos, se lavan, se mezclan con pudín enfriado exento de lactosa u otro vehículo en el lugar de suministro y se dan como alimento a los individuos. Las muestras de cada lote se testan en cuanto a ausencia de patógenos y para determinar la dosis eficaz.

20 **B. Vacunas de componentes no viables:**

Los componentes no viables de parásitos helmínticos proporcionan suficiente afección Th2 de la respuesta inmune para prevenir la patología mediada por TH1. Los componentes no viables se derivan de huevos, larvas o gusanos adultos.

25 Los huevos de esquistosomas intactos no viables producen una respuesta Th2 fuerte. Los huevos se aíslan de los hígados de los animales preparatorios (es decir hámsters) dejados crecer en condiciones SPF. Los huevos se aíslan por un método modificado a partir del descrito originalmente por Coker y Lichtenberg, 1956, *Proceedings of the Soc. for Exp. Biol. & Med.* 92:780. Las modificaciones consisten en la utilización de solución salina tamponada con fosfato con glucosa en lugar de solución salina al 1,7% para los pasos de incubación y lavado junto con disminución del tiempo de digestión autolítica. Estos cambios promueven el aislamiento de huevos viables. El método es como sigue.

30 Se infectan hámsters dorados con 1000 a 1500 cercarias. Se deja madurar la infección (6 a 7 semanas). Se extirpan los hígados de los animales y se ponen en solución salina tamponada con fosfato estéril de 600 mOsm que contiene 5% de glucosa, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin. Los hígados se dejan en autodigestión durante 24 horas a la temperatura ambiente. Se homogeneizan por pulsos los hígados a velocidad baja durante 13 minutos en un mezclador Waring frío. Se incuban el homogeneizado con colagenasa (2 mg/ml) y tripsina (2 mg/ml) a 32°C durante 1 hora. Se filtra el homogeneizado a través de tamices de mallas 50 y 80-100 para eliminar grumos de tejido y residuos. Se recuperan los huevos del filtrado por paso a través de un tamiz de malla 325. Los huevos no pasarán a través del tamiz. Se separan los huevos del tamiz por lavado abundante y se pasan a un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 ml. Se lavan los huevos por centrifugación repetida a velocidad baja (400 x g) en solución salina tamponada con fosfato estéril con 5% de glucosa. Los huevos tienen que estar exentos de cualesquiera residuos de colágeno. Se somete a recuento una parte alícuota de huevos en una cámara Sedwick de 1 ml para determinar el número total de huevos.

35 Los huevos aislados se suspenden en solución salina y se congelan súbitamente en nitrógeno líquido sin crioprotector. Esto destruye los huevos. Los huevos descongelados se inyectan por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa, o en sitios de inflamación Th1 para provocar respuestas Th2 fuertes. Puede utilizarse también huevos de otros helmintos.

40 Pueden utilizarse también vacunas de componentes que emplean proteínas, lípidos, o carbohidratos aislados de huevos parásitos. Un ejemplo es el de los antígenos solubles de huevos de esquistosoma (SEA). El método para preparación del antígeno de huevos de esquistosoma ha sido descrito previamente por Boros y Warren, 1970, J. of Experimental Med. 132:488 y se expone brevemente a continuación.

45 Los huevos lavados se resuspenden a razón de 50.000 huevos/ml de solución salina tamponada con fosfato. Esta se transfiere a un homogeneizador de tejidos de vidrio. Los huevos se homogeneizan en hielo. Para asegurar que todas las cáscaras se rompen y los miracidios se disgregan, se retira una parte alícuota (5 ml) para inspección microscópica. El homogeneizado se transfiere a tubos de ultracentrífuga. Se centrifuga a 100.000 x g durante 2 horas a 4°C. Se recupera la fracción acuosa (SEA) y se determina el contenido de proteínas. Se guarda la SEA en pequeñas partes alícuotas a -70°C. Este método puede requerir modificación para aislar los productos de huevos parásitos que promueven más fuertemente la afección Th2, es decir, para conseguir una concentración efectiva

óptima, (100 µg de SEA o 10.000 ova/animal). Los huevos o componentes de huevos solubles se utilizan para iniciar respuestas Th2 o para reforzar las respuestas Th2 iniciadas previamente por colonización con helmintos viables. Los huevos o componentes de huevo se testan para confirmar la ausencia de patógenos y endotoxina.

5 Pueden desarrollarse también vacunas de componentes a partir de larvas y gusanos adultos de parásitos helmínticos. Las larvas o gusanos se aíslan de los animales preoperatorios dejados crecer en condiciones SPF. Las vacunas que emplean organismos intactos no viables o proteínas, lípidos o carbohidratos aislados del helminto se preparan y se utilizan de una manera similar a la descrita previamente para los huevos de helminto.

10 Se abarcan también en la presente descripción vacunas que contienen fracciones o subfracciones de los parásitos helmínticos así como vacunas que contienen proteínas, polinucleótidos, carbohidratos, lípidos, etc. aislados derivados de parásitos helmínticos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, v.g., como se describe en Williams et al., 1994, *Leukocytes of patients with Schistosoma mansoni respond with a Th2 pattern of a cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens*. J. Infect. Dis. 170:946; Xu-Amano et al., 1993, *Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues* J. Exp. Med. 178:1309; Ausiello et al., 2000, *Cell mediated immunity and antibody responses to Bordetella pertussis antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine*. J. infect. Dis., 181:1989.

20 Por ejemplo, pueden prepararse fracciones o subfracciones de acuerdo con un método descrito en Thaumaturgo et al. (2001, *Preliminary Analysis of Sm14 in Distinct Fractions of Schistosoma mansoni Adult Worm Extract*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.96 Suppl. Vol.96, Suppl.: 79-83. En este método, se obtuvieron parásitos de *S. mansoni* por perfusión retrógrada con solución salina heparinizada (solución de NaCl al 0,85%), 45 días después de la infección (Pellegrino & Siqueira 1956, *Técnica de perfusão para colheita de Schistosoma mansoni em cobaias experimentalmente infectadas*. Rev Bras Mal D Trop 8: 589-597), y se utilizaron para preparación de los diferentes extractos.

25 - Preparación de extracto derivado de gusanos adultos (SE) - Los parásitos se lavaron en PBS. Los gusanos vivos se dejaron luego en reposo a la temperatura ambiente (28°C a 30°C) en PBS (solución salina tamponada con fosfato) fresco durante 2-3 horas, y se congelaron a -20°C. Después de la descongelación, se filtraron suspensiones en PBS de los gusanos (1 g de gusanos/10 ml de PBS) se filtraron a través de un tamiz de tela metálica, y se centrifugaron a 10.000 g durante 1 hora a 4°C (Tendler & Scapin 1981, *Schistosoma mansoni antigenic extracts obtained by different extraction procedures*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 76: 103-109; Tendler et al. 1982, *Immunogene and protective activity of an extract of Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 77: 275-283). El contenido de proteínas de SE se evaluó por el método de Lowry (Lowry et al. 1951), y lotes de stock que contenían 1 mg/ml se guardaron a -20°C. Se prepararon extractos de machos y hembras de acuerdo con la misma metodología, separándose los parásitos inmediatamente después de la perfusión.

35 Preparación de una "fracción" liberada rápidamente de extracto derivado de gusano adulto (SEi) - La preparación SEi correspondía al paso inicial de SE: después de perfusión como se describe para SE, los gusanos vivos se incubaron durante 2-3 h a la temperatura ambiente (28°C a 30°C), en PBS. Seguidamente, los gusanos adultos se filtraron a partir de la solución de incubación (SEi) en un tamiz de tela metálica.

40 - Preparación de SE2 - Los gusanos adultos que quedaban de la preparación inicial de SE, se guardaron nuevamente congelados (-20°C) en PBS durante una semana (1 g gusanos/10 ml de PBS). Después de descongelación, las suspensiones de PBS se filtraron a través de una tela metálica, y se centrifugaron a 10.000 g durante 1 hora a 4°C.

45 Los antígenos parasitarios pueden extraerse también como se describe en la Figura 1 de Thaumaturgo et al. (supra) (reproducido como Figura 23). Alternativamente, los antígenos parasitarios pueden prepararse como se describe en Deelder et al. (1980. *Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for Schistosomiasis mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:401-410). Por ejemplo, los antígenos se pueden preparar a partir de SWAP preparado como fluidos solubles sobrenadantes de homogeneizados en solución salina tamponada de la etapa respectiva del ciclo vital (Goes et al. 1989, *Production and characterization of human monoclonal antibodies against Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol 11: 695-711). Se fraccionó SWAP por cromatografía de intercambio de aniones en FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas), como se ha descrito previamente. 50 (Hirsch & Goes 1996, *Characterization of fractionated Schistosoma mansoni soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro*. Parasitology 112: 529-535). Resumidamente, las proteínas se eluyeron con Tris-HCl 20 mM, pH 9,6, en un gradiente creciente de pasos múltiples hasta NaCl 1 M, que se interrumpió por intervalos de gradiente de retención a 0, 100, 280, 450, 600 y 750 mM. Las fracciones de paso directo se concentraron por liofilización. El material concentrado se dializó contra solución salina tamponada con fosfato 0,15 M (PBS), pH 7,4, se esterilizó por filtración y se guardó a -70°C. El contenido de proteínas se midió 55 de acuerdo con el microensayo de Bradford (Bradford 1976, *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analyt. Biochem 72:248-254. El análisis de las 6 fracciones, separadas por SDS-PAGE al 10% (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) en condiciones reductoras (Laemmli 1970, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the*



*head of bacteriophage T4*. Nature 227:680-685, detectó bandas de proteínas múltiples, fracción III que contenía proteínas de peso molecular alto (97 y 160 KDa), intermedio (52 y 56 KDa) y bajo (28 y 36 KDa) proteínas. Esta fracción se designó PIII y se utilizó en diversos ensayos inmunológicos.

- 5 Los lípidos pueden prepararse también como se describe en la técnica, por ejemplo, en van der Kleij et al. (1999, Recognition of Schistosome Glycolipids by Immunoglobulin E: Possible Role in Immunity Infection and Immunity, 67: 5946-5950).

En una realización, se extrajeron lípidos de gusanos *S. mansoni* adultos (12 g [peso húmedo]) y huevos (1,6 g [peso húmedo]) por el método descrito por Bligh y Dyer (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917). La fase orgánica se secó por evaporación rotativa, se disolvió en 10 ml de cloroformo, y se aplicó a una columna de 20 ml del cambiador de aniones TEAE-celulosa (Serva, Heidelberg, Alemania) que se convirtió a la forma hidroxilo. Los lípidos se eluyeron como ha sido descrito por Rouser et al. (1969. *Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids, and pigments*. Methods Enzymol. 14:272-317). De acuerdo con este protocolo, las fracciones contienen los lípidos siguientes: fracción 1, colesterol, glicéridos, y otros lípidos neutros; fracción 2, cerebrósidos, diglicéridos de glicerol, fosfatidilcolina, y esfingomielina; fracción 3, ceramida-polihexósidos; fracción 4, sustancias inorgánicas; fracción 5, fosfatidiletanolamina y ácidos grasos libres; fracción 6, fosfatidilserina; fracción 7, ninguno (paso de lavado); y fracción 8, ácido fosfatídico, cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, y otros lípidos ácidos. La presencia de glicolípidos en las fracciones 2 y 3 se confirmó por tinción con orcinol de las fracciones lipídicas en placas HPTLC (1956 Quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue. J. Neurochem. 1: 42-53).

### 20 **C. Mantenimiento de los organismos helmínticos:**

Los helmintos se ciclan a través de animales intermedios y preparatorios dejados crecer en condiciones SPF. Se testan muestras de las poblaciones de helmintos para asegurar la estabilidad fenotípica tal como las tasas de colonización, fecundidad, y susceptibilidad a los anti-helmínticos.

### **DOSIFICACIÓN, ADMINISTRACIÓN Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS**

- 25 Los individuos que se encuentran en necesidad de tratamiento reciben la forma infectada del parásito (huevo, cercarias o larvas) por vía oral o parenteral dependiendo del ciclo de vida natural del parásito seleccionado. Alternativamente, pueden administrarse extractos solubles de gusanos o huevos por vías oral o parenteral para inducir respuestas Th2.

30 Con relación a los helmintos y esquistosomas intestinales y hepáticos, los mismos comienzan a producir ovas que aparecen en las heces aproximadamente 30-60 días después de la inoculación. La cuantificación de los huevos en las heces es satisfactoria para evaluar la adecuación e intensidad de la infección. Partes alícuotas de heces se procesan por flotación en sacarosa a fin de determinar el número total de huevos en cada espécimen. La flotación en solución de sacarosa es un método utilizado frecuentemente para aislar huevos de heces a fin de realizar un recuento exacto como ha sido consignado por Koontz y Weinstock, 1996, Gastroenterology Clinics of N. America, 25: 435.

35 Los compuestos parásitos helmínticos de la descripción pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente, y la descripción incluye por tanto composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto parásito helmíntico de acuerdo con la descripción adaptado para uso en humanos. Tales composiciones se pueden presentar para uso de manera convencional con ayuda de cualesquiera portadores o excipientes farmacéuticos necesarios.

40 El compuesto parásito helmíntico de acuerdo con la descripción puede formularse para inyección, y por consiguiente, uso en vacunas, y se puede presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, o envases multidosis, en caso necesario, con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar también formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones de vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores, y/o dispersantes. Alternativamente, el parásito helmíntico puede encontrarse en forma de polvo o reconstituirse con un vehículo adecuado, v.g. agua estéril exenta de pirógenos, antes de su utilización.

En caso deseado, dicha formulación de polvo puede contener una base no tóxica apropiada a fin de asegurar que el polvo se reconstituye con agua, siendo el pH de la formulación acuosa resultante fisiológicamente aceptable.

50 Los compuestos parásitos helmínticos pueden formularse también como supositorios, v.g. que contienen bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

55 Los compuestos parásitos helmínticos se pueden formular también para dosificación oral con cargas, portadores y excipientes convencionales. La cantidad de parásitos administrada al individuo que se encuentra en necesidad de ello es una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad autoinmune. Esta cantidad puede variar dependiendo de la enfermedad a tratar o prevenir y del parásito helmíntico, tanto si el mismo se administra intacto, como si se administra en forma de huevo, larvas, extracto o cercarias.

Típicamente, cuando los parásitos se administran para todas las enfermedades autoinmunes expuestas en esta memoria, la cantidad varía desde aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000. Más particularmente, esta cantidad puede variar desde aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000. Cuando se utilizan huevos, pueden utilizarse aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 para tratar las enfermedades autoinmunes descritas en esta memoria. Cuando se administran extractos, se utilizan aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10.000 µg para tratar las enfermedades autoinmunes. Cuando se administran larvas y cercarias, las dosis pueden estar comprendidas entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000 en cada caso.

Para uso como prevención o vacuna, las cantidades de los parásitos pueden ser 500-5.000.

La dosificación de una preparación de parásitos puede monitorizarse para medir las respuestas de células Th1, Th2 o reguladoras. Alternativamente, la dosificación puede monitorizarse por evaluación de la patología o los síntomas de una enfermedad particular como se conoce en la técnica o como se describe en esta memoria.

#### A. Determinación de las respuestas Th1 y Th2

Con objeto de demostrar la eficacia de la presente invención, pueden distinguirse la respuesta Th1 y Th2. Metawali et al., 1996, *J. of Immunol.* 157:4546 ha demostrado que, en los ratones, es posible distinguir una respuesta Th1 de una respuesta Th2 por análisis histológico, y por análisis de los perfiles de citoquinas e inmunoglobulinas. Adicionalmente, Sandor et al., 1990, *J. of Exp. Med.* 171:2171 ha demostrado que la expresión en la superficie celular de Fcγ3 y moléculas MHC clase II permite discriminación. En este procedimiento, se examinan histológicamente el intestino delgado y el colon para determinar el grado de inflamación mucosal, eosinofilia y mastocitosis. Los últimos tipos de células son indicativos de una respuesta Th2. Los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y los bazo pueden disociarse en suspensiones de células simples para cultivo *in vitro* en placas micropocillo. Células (1-2 x 10<sup>6</sup>/pocillo) en medio RPMI completo se cultivan durante hasta 72 h en presencia o ausencia de antígeno de gusano o anti-CD3 y después de ello se ensayan los sobrenadantes respecto a citoquinas e inmunoglobulinas. IFN-γ, TNFα y IgG2a caracterizan una respuesta Th1, mientras que IL-4, IL-5, IgE e IgG1 tipifican una reacción Th2. Asimismo, puede ensayarse suero respecto a concentraciones de citoquinas e inmunoglobulinas. Adicionalmente, se examinan leucocitos inflamatorios dispersados por citometría de flujo para expresión de Fcγ3 en macrófagos (Th1) y expresión de MHC clase II en células B (Th2). Los controles incluyen suero, MLN y bazo de ratones apropiados de edad coincidente, hermanos de camada que no hospedan parásito alguno.

Un análisis similar puede diferenciar una respuesta Th1 de una respuesta Th2 humana. Se examina tejido inflamado, leucocitos aislados de regiones de inflamación y células de sangre periférica. Los leucocitos se cultivan *in vitro* solos o en presencia de antígeno o mitógenos del parásito para estimular la liberación de citoquinas. Se emplea IgG2 en sustitución de IgG2a.

#### B. Determinación de la actividad de las células T reguladoras

En la presente invención se determina la actividad de las células T reguladoras por determinación del nivel de Scurfina.

Métodos de aislamiento de las células T reguladoras a partir de cultivo *in vitro* o animales se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases.* Trends Immunol 2002; 23(9):450-S; Field, A. C., L. Caccavelli, M. F. Bloch, and B. Bellon. 2003. *Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity.* Journal of Immunology. 170:2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity.* Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):223-32; Francois Bach J. *Regulatory T cells under scrutiny.* Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3):189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy.* Curr Opin Immunol. 2002 Dec; 14(6):771-8; McGuirk P, Mills KH. *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases.* Trends Immunol. 2002 Sep; 23(9):450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. *Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease.* Immunol Rev. 2001 Aug; 182:135-48; Read S, Powrie F. *CD4(+) regulatory T cells.* Curr Opin Immunol. 2001 Dec; 13(6):644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. *Regulatory T cells and allergic asthma.* Microbes Infect. 2001 Sep; 3(11):899-904; Shevach, E. M. 2002. *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.* Nature Reviews. Immunology. 2:389-400; Annacker, O. and F. Powrie. 2002. *Homeostasis of intestinal immune regulation.* Microbes & Infection. 4:567-574; Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.* J.Exp.Med. 192:295-302.

La respuesta o actividad de las células T reguladoras puede medirse por un marcador interno, un marcador de la superficie celular, o un marcador secretado como se describe en esta memoria.

Marcadores internos útiles para las células T reguladoras incluyen, pero sin carácter limitante, factores de transcripción tales como Scurfina, Smad7, Gata3, Tbet (Tbx21).

Marcadores de superficie útiles para células T reguladoras incluyen, pero sin carácter limitante, CD4, CD45RB<sup>lo</sup>, CD45Rc, antígeno 4 asociado a linfocitos T citolíticos (CTLA-4), CD25, CD103, Ox40, 4-1BB, CD62L, integrina  $\alpha\epsilon\beta$ , péptido asociado a la latencia (LAP) o proteína relacionada con la familia de receptores de TNF inducidos por glucocorticoides (GITR), receptor de quimioquinas CCR5, TI-ST2.

- 5 Marcadores secretados útiles para células T reguladoras incluyen, pero sin carácter limitante, IL-5, IL-10 y TGF $\beta$ .

### C. Ejemplos de Métodos para Medición In Vitro de la Cantidad de Marcadores

**Detección de Citoquinas por Citometría de Flujo:** esplenocitos, células MLN o células inflamatorias intestinales en medio RPMI completo se ponen en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a razón de  $2 \times 10^6$  células/pocillo. Las células se incuban durante 4-6 horas en presencia o ausencia de anti-CD3 o antígeno apropiado con brefeldina A a 10  $\mu\text{g/ml}$ . La brefeldina previene la exocitosis de proteínas y promueve la acumulación de la citoquina en el interior de la célula. Para la detección de citoquinas citoplásmicas, las células se fijan en paraformaldehído al 2% a la temperatura ambiente durante 5 min después de tinción superficial para distinguir los subtipos de células. Las células se lavan y se suspenden de nuevo en 50  $\mu\text{l}$  de PBS con 0,2% de saponina y 1 mg de anticuerpo anti-citoquinas, y se incuban a la temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, las células se lavan dos veces en saponina y se resuspenden en PBS/FCS. La especificidad de la tinción con anticuerpos contra citoquinas se confirma por pre-bloqueo de las células con un exceso de anticuerpo no conjugado del mismo isotipo y especificidad de citoquina o por incubación de las células en presencia de citoquina recombinante. Se incluyen también controles de anticuerpos irrelevantes marcados con ficoeritrina (PE) para evaluar la tinción de fondo. Las células se analizan utilizando citometría de flujo.

**ELISAs:** Los ELISAs miden las concentraciones de citoquinas y anticuerpos en sobrenadantes de células a partir de células cultivadas en placas de microtitulación y manipuladas como se describe arriba. Muchos de estos ensayos son ya operativos en el laboratorio de los autores de la invención. Las citoquinas se ensayan utilizando dos anticuerpos monoclonales (mAbs) en un ELISA sándwich de dos sitios. Los mAbs anti-citoquinas se purifican por precipitación con amonio de los sobrenadantes de clones de hibridoma que secretan anticuerpos. Se recubren placas de microtitulación con 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo de recubrimiento con 1  $\mu\text{g/ml}$  en PBS que contiene Tween 20 (PBS-T), y se incuban a 4°C durante una noche. A continuación, se bloquean los pocillos por la adición de 150  $\mu\text{l}$  de FCS al 10% en PBS con incubación a 37°C durante 30 min. Los estándares comprenden citoquina recombinante o sobrenadantes que contienen citoquinas de mitógeno o células de bazo activadas por antígeno de ratones infectados de esquistosomiasis. Se realizan diluciones de la muestra y los estándares en RPMI que contiene 10% FCS (RPMI completo) en una placa de microtitulación con fondo plano de 96 pocillos separada, y se transfieren volúmenes de 50  $\mu\text{l}$  a las placas ELISA que se han lavado 3 veces con PBS-T. Las muestras se incuban en las placas de ensayo durante 1 hora a 37°C. El mAb apropiado se conjuga a biotina. Después de lavado 3 veces con PBS inerte, cada ... recibirá 50  $\mu\text{m}$  de conjugado anticuerpo-biotina a razón de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  en 1% BSA/PBS-T. Las placas se incuban a la temperatura ambiente durante una hora, seguido por lavado 3 veces en PBS-T. Se añade conjugado estreptavidina/peroxidasa de rábano picante (75  $\mu\text{l}$ ) a 1  $\mu\text{g/ml}$  en BSA/PBS-T al 1% y se incuban a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavan las placas 10 veces en PBS-T reciente, y se añaden 100  $\mu\text{l}$  de sustrato (ácido 2,2'-azino(3-etilbenzotiazolina-sulfónico) a 1 mg/ml en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  44 mM, ácido cítrico 28 mM, y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,003%. El producto coloreado se mide a una longitud de onda de 405 nm con una longitud de onda de referencia de 490 nm, utilizando un lector de placas Multiscan.

Las inmunoglobulinas se cuantifican utilizando ELISAs específicos anti-isotipo. Se utilizan como anticuerpos de captura anti-IgM, -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgA y -IgE de cabra purificados por afinidad y se absorben en cápsulas de microtitulación flexibles de polivinilo a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Después de la adición de sobrenadantes de cultivo, incubación y lavado, se utiliza anti-inmunoglobulina de cabra isotipo apropiada conjugada con fosfatasa alcalina para detectar la inmunoglobulina total de ratón fijada a las placas. Se generan curvas estándar utilizando inmunoglobulina purificada. Para medir el anticuerpo parásito específico del antígeno, se biotinila antígeno soluble y se utiliza para detectar la inmunoglobulina de ratón fijada. Se analizan las placas en un lector ELISA a 410 nm, y se determinan las concentraciones de inmunoglobulina total utilizando la curva estándar y software de análisis de ajuste óptimo. Las concentraciones de anticuerpos específicos del antígeno se comparan con relación a las lecturas de D.O., dado que el antígeno soluble del parásito no es un antígeno definido que permita cuantificación precisa.

**Ensayos ELISPOT:** Se establecen ensayos ELISPOT para contar los linfocitos que secretan anticuerpo policlonal o citoquinas. Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos con respaldo de nitrocelulosa durante una noche a 4°C con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos anti-inmunoglobulina o anti-citoquina en PBS-T. Las placas se bloquean luego con PBS que contiene 10% FCS y se lavan exhaustivamente con PBS-T.

Se incuban diluciones seriadas de una suspensión de células simples, comenzando con  $5 \times 10^4$  células/pocillo en la placa durante 5 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las placas se lavan con PBS-T y se recubren con anticuerpos anti-inmunoglobulina o -citoquina biotinilados durante una noche a 4°C. A continuación, se lavan las placas y se tratan con conjugado estreptavidina-glucosa oxidasa durante 2 horas y se lavan nuevamente.

5 El anticuerpo o la citoquina secretados por las células simples se visualiza con sustrato. La reacción colorimétrica se detiene después de 30 min por lavado y las manchas se enumeran bajo 30 aumentos. La dilución de las células que producen 10-50 manchas/pocillo se utiliza para calcular el número total de células secretoras por muestra. Los controles incluyen pocillos recubiertos con anticuerpo de cabra inadecuado o antígeno inadecuado, o se dejan sin recubrimiento.

10 Una modificación del ensayo que utiliza antígeno soluble para recubrir los pocillos permite la cuantificación de parásito específico del antígeno, así como células B secretoras de inmunoglobulina. Resumidamente, por ejemplo, se recubren las placas con antígeno de *T. muris* adulto a 0,25 µg/pocillo o antígeno de control irrelevante adecuado. Se añaden las células a los pocillos después del lavado. Después de incubación apropiada, se lavan las placas una vez más y se tratan como se ha descrito arriba.

#### D. Evaluación de la Patología de la Enfermedad

La evidencia de la presencia de una enfermedad autoinmune y su curación o mejora es necesaria para determinar la necesidad de tratamiento y para monitorizar el progreso del tratamiento. Se utilizan los procedimientos siguientes para medir los parámetros clínicos de las enfermedades indicadas.

##### 15 1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

**Evaluación de la Inflamación:** En los ratones, la evidencia clínica de la enfermedad incluye pérdida de peso, diarrea, prolapso rectal y evidencia histológica de inflamación intestinal. Así pues, la mejora en estos parámetros significaría mejora de la enfermedad.

20 Para graduar la inflamación intestinal en modelos animales, se extirpa el tejido, se envuelve a la manera de un brazo de gitano y se incrusta en parafina de acuerdo con métodos estándar. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina. El grado de inflamación del colon se clasifica semicuantitativamente de 0 a 4 a ciegas por un solo patólogo utilizando la técnica estandarizada usual de los autores de la invención: 0 = ausencia de inflamación; 1 = nivel de inflamación bajo; 2 = nivel de inflamación intermedio; 3 = nivel de inflamación alto con engrosamiento de la pared; y 4 = infiltración transmural, y pérdida de células caliciformes con engrosamiento de la pared.

25 Para contar las células cebadas, se preparan muestras de tejido intestinal de ratones individuales por la técnica del brazo de gitano, se fijan en fijador Carnoy, se incrustan en parafina y se procesan para tinción con Azul Alcian y safranina. Se someten a barrido 50 campos adyacentes de una sección dada respecto a células cebadas mucosales en la lámina propia y las capas musculares. Las células cebadas se identifican por su tinción granular intracelular distintiva con Azul Alcian. Todas las muestras se evalúan a ciegas.

30 La actividad de la enfermedad en humanos se monitoriza utilizando diversos criterios clínicos, de laboratorio e histológicos. Existen varios índices de actividad de la enfermedad IBD bien establecidos que monitorizan parámetros clínicos como la frecuencia de diarrea y el dolor abdominal. Un índice particularmente útil para la evaluación de la enfermedad de Crohn es el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn, o CDAI (Best et al., 1976, *Gastroenterology* 70:439).

35 El CDAI incorpora 8 variables relacionadas con la actividad de la enfermedad y ha sido utilizado en la mayoría de los estudios recientes de agentes terapéuticos en la enfermedad de Crohn. Dicho índice incluye el número de heces líquidas o muy blandas, la severidad del dolor o retortijones abdominales, el bienestar general, la presencia de manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, presencia o ausencia de una masa abdominal, uso de fármacos antidiarreicos, hematócrito, y masa corporal. El registro compuesto oscila desde 0 a aproximadamente 600. Los registros inferiores a 150 indican remisión y los registros superiores a 450 indican dolencia grave.

45 Un cuestionario de calidad de vida testado, aceptado y específico de la enfermedad puede administrarse también antes y después del tratamiento para evaluar el progreso terapéutico. El Cuestionario de Enfermedad Inflamatoria Intestinal de Irvine es un cuestionario de 32 puntos (Irvine et al., 1996, *The Short Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a quality of life instrument for community physicians managing inflammatory bowel disease. CCRPT Investigators. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial. Am J Gastroenterol.* 1996 91(8):1571-8). El mismo evalúa la calidad de vida con respecto a la función intestinal (v.g., heces sueltas y dolor abdominal), síntomas sistémicos (fatiga y patrón de sueño alterado), función social (asistencia al trabajo y necesidad de cancelar eventos sociales) y estado emocional (airado, deprimido, o irritable). El registro oscila desde 32 a 224, indicando registros mayores una mejor calidad de vida. Los pacientes en remisión puntúan usualmente por encima de 170.

50 La evaluación endoscópica, por rayos X e histológica de la actividad de la enfermedad intestinal puede utilizarse también para evaluación. Los niveles de proteína C reactiva y la tasa de sedimentación de las células de la sangre pueden monitorizarse también como indicadores sistémicos de inflamación.

##### 2. Artritis reumatoide

**Evaluación de la Inflamación:**

Para ratones con artritis inducida por colágeno, se examinan los ratones en días alternos y se registran sus patas como sigue: 0, normal; 1, eritema e hinchamiento moderado confinado a la articulación del tobillo o los dedos del pie; 2, eritema e hinchamiento suave que se extiende desde el tobillo a mitad del pie; 3, eritema e hinchamiento severo que se extiende desde el tobillo a las juntas metatarsianas; y 4, deformación anquilosante con hinchamiento de la articulación. Estos cuatro parámetros pueden correlacionarse con los cambios histológicos en las articulaciones artríticas. El éxito del tratamiento da como resultado una disminución en el registro artrítico con mejora en la histología. Anthony DD. Haqqi TM., Collagen-induced arthritis in mice: an animal model to study the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Rheumatology*. 17(2):240-4,1999.

Para la artritis inducida por pristano, las articulaciones pueden medirse con un micrómetro a fin de detectar el hinchamiento. En los humanos, la RA se registra por medida del hinchamiento de las articulaciones, eritema, limitación del movimiento y dolor. Adicionalmente, puede analizarse el fluido sinovial respecto a concentraciones de citoquinas y proteínas inflamatorias, y respecto a composición y función de los leucocitos, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las biopsias sinoviales proporcionan tejido para análisis histológico de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Felson DT. Anderson JJ. Boers M. Bombardier C. Furst D. Goldsmith C. Katz LM. Lightfoot R Jr. Paulus H. Strand V. et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 38(6):727-35, 1995 Schiff M. A rationale for the use of summary measurements for the assessment of the effects of rheumatoid arthritis therapies. *Clinical Therapeutics*. 25(3):993-1001, 2003.

### 3. Lupus

#### Evaluación de la Inflamación:

El desarrollo normal y la función del sistema inmunitario dependen críticamente de la eliminación de células indeseables por un proceso denominado apoptosis. Las interacciones célula-célula a través de moléculas específicas de la superficie celular y sus receptores desencadenan frecuentemente el proceso. Un sistema de este tipo se conoce como FAS y ligando FAS. Los ratones deficientes en FAS (*LPR*<sup>-/-</sup>) o ligando FAS (*GLD*<sup>-/-</sup>) desarrollan una enfermedad autoinmune parecida al lupus. Reilly CM. Gilkeson GS. Use of genetic knockouts to modulate disease expression in a murine model of lupus, *MRL/lpr mice*. *Immunologic Research*. 25(2):143-53, 2002.

Colonias de ratones *LPR* o *GLD* se mantienen en unidades de alojamiento micro-aisladoras en condiciones específicas exentas de patógenos. Estos ratones pueden desarrollar espontáneamente autoinmunidad, pero más predicablemente después de inducción artificial. Para inducir la enfermedad, se inyectan ratones de 8 semanas con un agente como pristano. En el transcurso de dos meses, los ratones padecen enfermedad autoinmune. Muchos criterios clínicos, histológicos e inmunológicos útiles para juzgar la inducción de la enfermedad y la mejora tanto en ratones como en humanos se conocen en la técnica. Satoh M. Richards HB. Shaheen VM. Yoshida H. Shaw M. Naim JO. Wooley PH. Reeves WH. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by *pristane*. *Clinical & Experimental Immunology*. 121(2):399-405, 2000.

### 4. Diabetes Mellitus Juvenil Dependiente de Insulina (Tipo 1)

#### Evaluación de la Inflamación:

El ratón *NOD* desarrolla diabetes mellitus tipo 1 similar a la de los humanos debido a destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. Los exámenes clínico, bioquímico, inmunológico e histológico de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica permiten la evaluación de la inducción de la enfermedad y la mejora en los ratones. Véase, v.g. Adorini L. Gregori S. Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends in Molecular Medicine*. 8(1):31-8, 2002.

### 5. Sarcoidosis

#### Evaluación de la Inflamación:

En el modelo de embolización de perla de la inflamación pulmonar, los antígenos (es decir Th1 o Th2) se acoplan a perlas de Sepharose que se embolizan a los pulmones de ratones por inyección en sus venas de la cola. Los animales se presensibilizan usualmente al antígeno acoplado. El sistema inmunitario del hospedador monta una respuesta inmune vigorosa a la perla ofensiva. Estas respuestas inflamatorias focales, pueden durar varias semanas, se pueden examinar histológicamente en cuanto a tamaño. Asimismo, aquélla puede aislarse del tejido y estudiarse en cuanto a composición celular y producción de citoquinas. Además, los nódulos linfáticos hiliares y los bazo están fácilmente disponibles para experimentación. Véase, v.g., Kunkel SL. Lukacs NW. Strieter RM. Chensue SW. Animal models of granulomatous inflammation. *Seminars in Respiratory Infections*. 13(3):221-8, 1998.

La sarcoidosis, una enfermedad de los humanos, implica usualmente el pulmón. La determinación de la sarcoidosis y la extensión de la enfermedad pueden realizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los tests de función pulmonar pueden evaluar la elasticidad y función del pulmón.

Asimismo, el lavado bronquiolar obtiene células inflamatorias que se han infiltrado en el árbol bronquial durante el proceso inflamatorio. Estas células pueden estudiarse respecto a composición y función. Los infiltrados pulmonares y la linfadenopatía hiliar son características de la sarcoidosis. Así, los rayos X de tórax o barridos CT periódicos pueden ayudar a evaluar la actividad de la enfermedad. Pueden utilizarse tests serológicos, tales como la medida de la actividad de la enzima convertidora de las angiotensinas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para calibrar la extensión y actividad de la enfermedad. Véase, v.g., Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, Baughman R, Cordier JF, du Bois R, Eklund A, Kitaichi M, Lynch J, Rizzato G, Rose C, Selroos O, Semenzato G, Sharma OP. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasculitis & Diffuse Lung Diseases*. 16(2):149-73, 1999.

6. Esclerosis Multiple

**Evaluación de la Inflamación:**

Se induce encefalomiелitis autoinmune experimental en ratones susceptibles por inyección repetida de antígenos de mielina sensibilizadores apropiados. Los ratones se evalúan clínicamente de acuerdo con los criterios siguientes: 0, ausencia de enfermedad; 1, atonía de la cola; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, parálisis de las extremidades posteriores y parálisis o debilidad de las extremidades anteriores; 5, moribundos. Para análisis histológico, se extraen las médulas espinales y los cerebros y se fijan en formalina. Las secciones incrustadas en parafina se tiñen y se examinan bajo microscopía óptica. Los esplenocitos y células de otras regiones dispersadas pueden estudiarse *in vitro* como se ha reseñado anteriormente. Estos parámetros pueden ayudar a medir el mejoramiento o la mejora de la enfermedad, véase, v.g., Sewell, Diane, Zing Qing, Emily Reinke, David Elliott, Joel Weinstock, Matyas Sandor, and Zsuzsa Fabry. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunol*. 15:59-69, 2003.

En los humanos, la actividad de la enfermedad MS se calibra por monitorización de la progresión y remisión de signos y síntomas neurológicos. La medida de resultados utilizada más generalmente se conoce como la Escala de Estatus de Discapacidad Expandida. Puede utilizarse también la composición de proteínas del fluido cerebroespinal y el contenido de células analizado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para monitorizar la actividad de la enfermedad. Además, estudios MRI seriados muestran lesiones cerebrales nuevas mejoradas por gadolinio. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis *Ann Neurol* 50(1):121-7, 2001. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. "New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines for Research Protocols" *Ann Neurol* 1993;13:227-231 Statistical Methods: Algunos datos se analizan por el test t de una sola muestra para determinar si los valores medios difieren significativamente de cero. Se utiliza el test t apareado para analizar las diferencias entre los valores medios de los grupos. Se utiliza el análisis de la varianza y el test t de Dunnett para analizar datos de comparaciones múltiples.

MODELOS ANIMALES

La Tabla I siguiente ilustra ejemplos no limitantes de modelos animales útiles de acuerdo con la presente invención. Ejemplos adicionales no limitantes pueden encontrarse en la técnica, v.g., como se describe en Current Protocols in Immunology (2001, Eds. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David.H.Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, publicado por John Wiley & Sons).

TABLA 1

ENFERMEDADES TRATABLES	ALGUNOS MODELOS ANIMALES
1. Enfermedades Inflamatorias Intestinales	Colitis TNBS (Neurath et al., 1995, <i>J. of Exp. Med.</i> 182:1281)
	Ratones mutantes IL-2 (Ludviksson et al., 1997, <i>J. of immunol.</i> 158:104)
	Ratones mutantes IL-10 (Berg et al., 1996, <i>J. of Clin. Investigation</i> 98:1010)

ENFERMEDADES TRATABLES	ALGUNOS MODELOS ANIMALES
	Ratones transgénicos TCR (Mombaerts et al., 1993, <u>Cell</u> 75:274)
	Células T CD45+ transferidas en ratones <i>SCID</i> (Powrie et al., 1994, <u>Immunity</u> 1:553)
2. Artritis Reumatoide	Artritis de murinos inducida por pristano (Stasluk et al., 1997, <u>Immunol.</u> 90:81)
	Artritis de murinos inducida por colágeno (Horsfall et al., 1997, <u>J. of Immunol.</u> 159:5687)
3. Diabetes Dependiente de Insulina (tipo 1)	Ratón <i>NOD</i> (Cameron et al., 1997, <u>J. of Immunol.</u> 159:4686)
4. Lupus	<i>Modelos F1 (NZWX NZB)</i> (Santiago et al., 1997, <u>J of Exp. Med</u> 185:65)
	Ratón <i>GRD, LPR</i> (mutación FAS) (Bhandoola et al., 1994, <u>Int. Rev. of Immunol.</u> 11:231)
5. Sarcoidosis	<i>Murine Berylliosis</i> (Pfeifer et al., 1994, <u>Int. Archives of Allergy &amp; Immunol.</u> 104:332)  Ratón <i>M. avium</i> (Chen et al., 1994, <u>Science</u> 265:1237)
6. Esclerosis Múltiple Experimental	Encefalomiелitis alérgica experimental en los ratones.  Owens T, Sriram S. 1995, <u>Neurol. Clin.</u> 13(1):51-73. Revisión.  Degaonkar et al., 2002, <u>J Magn Reson Imaging.</u> 16(2): 153-9.  Duckers et al., 1996, <u>Neuroscience</u> 1(2): 507-21.

**EJEMPLOS**

La invención se ilustra por los ejemplos no limitantes siguientes en los cuales se emplean los materiales y métodos indicados a continuación.

**5 Ejemplo 1. Métodos Generales:**

Animales: Colonias de ratones mutantes 129/SV IL-10<sup>-/-</sup>, y animales de control apropiados se mantienen alojados en instalaciones mantenidas como un ambiente específico exento de patógenos de acuerdo con métodos estándar.

Mantenimiento de Parásitos, Infección de los Animales, Producción de Huevos de Esquistosoma: El mantenimiento de *T. muris* y el método utilizado para infección son como ha sido descrito por Else y Wakelin, 1990, Parasitology, vol. 100, parte 3: 479.

10

Se recogieron huevos de esquistosoma de los hígados de hámsters infectados con esquistosomas y se guardaron como ha sido descrito por Elliott, 1996, Methods: A. Companion to Methods in Enzymology, 9: 255. Cinco ratones infectados proporcionan aproximadamente  $2 \times 10^6$  huevos.

5 Preparación de Huevos de *T. suis*: Se utilizó el proceso siguiente en la preparación y recogida de huevos de *T. suis*. Se aislaron gusanos *T. suis* adultos del colon de cerdos 7-8 semanas después de la exposición a una inoculación experimental de huevos de *T. suis*. Se obtuvieron huevos embrionados por cultivo de gusanos adultos *in vitro*, y después, los huevos excretados, separados del medio de cultivo por centrifugación, se pusieron en solución de dicromato de potasio al 0,2% a 22°C durante 5-6 semanas con borboteo para obtener larvas infecciosas de la primera etapa. Los huevos se lavaron dos veces en agua estéril por centrifugación a 1200 x g durante 10 min, se  
10 contaron, y se resuspendieron en la cantidad deseada de solución salina basada en una dosis calculada de 2500. Estos huevos se guardaron para uso en los individuos. Las ovas son estables durante al menos un año en el frigorífico. Para asegurar la infectividad, se monitorizaron los pacientes respecto a la aparición de ovas en las heces después de colonización. El número de ovas en las heces es proporcional a la intensidad de la infestación. Asimismo, de vez en cuando, se infectan cerdos con las ovas guardadas por los autores de la invención para  
15 asegurar la infectividad continuada.

Infección con *M. avium*: Se infectaron ratones por inyección de  $10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU) de *Mycobacterium avium* (ATCC 25291) intraperitonealmente. El día 60 de la infección, algunos ratones recibieron también 35 cercarias de *S. mansoni* para inducir infección dual.

20 Infección de Esquistosomas y Aislamiento de Ovas: Algunos experimentos utilizaron ratones (18-20 g) infectados durante 8-9 semanas con *S. mansoni*. Los ratones se infectaron por vía subcutánea con 40 cercarias de la cepa de Puerto Rico.

Aislamiento y Dispersión de Granulomas: Se forman granulomas en los ratones infectados con esquistosomas debido a la deposición natural de huevos, que comienza en la 6ª semana de la infección. *M. avium* induce también granulomas. Los autores de la invención estudian granulomas hepáticos aislados de ratones infectados como se ha descrito (Elliott, 1996, supra). Los granulomas se dispersaron para producir suspensiones de células simples. Los  
25 granulomas aislados se agitaron durante 35 min a 37°C en un baño de agua de sacudidas en medio RPMI que contenía 5 mg/ml de colagenasa. Los granulomas residuales se aspiraron y se expulsaron a través de una jeringuilla de 1 ml para inducir disociación ulterior. La suspensión de células resultante se filtró a través de una gasa y se lavó 3 veces. La viabilidad celular se determinó por exclusión con Eosina-Y. Este protocolo dio como resultado un alto  
30 rendimiento de células inflamatorias viables que exhiben una expresión preservada de moléculas superficiales.

Bazo y Dispersión de MLN: Se dispersaron esplenocitos y MLN por trituración y lavado del tejido a través de una malla de acero inoxidable. Los RBC contaminantes se lisaron con agua, y las células se lavaron 3 veces en RPMI antes de su utilización.

35 Inducción de Colitis por TNBS: Se indujo colitis por instilación rectal de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) como ha sido descrito por Neurath et al., 1995, J. Exp. Med., 182:1281. Resumidamente, ratones BALB/c de control o expuestos a los parásitos se mantuvieron en ayunas durante 30 horas y se anestesiaron luego con metoxiflurano. Se introdujo un catéter de 1,2 mm hasta 4 cm en el colon y se instiló 0,1 ml de solución de TNBS (5 mg/ml de TNBS (Sigma) en etanol al 50%). El animal se mantuvo sujeto por la cola durante 3 minutos para asegurar un contacto uniforme con la mucosa del colon.

40 Evaluación de la Inflamación Mucosal: Para clasificar la inflamación intestinal, se extrajo tejido en los momentos indicados, se envolvió al modo de un brazo de gitano y se incrustó en parafina de acuerdo con métodos estándar. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. El grado de inflamación del colon se clasificó semicuantitativamente desde 0 a 4 a ciegas por un solo patólogo utilizando la técnica estándar usual de los  
45 inventores (1-9). 0 = ausencia de inflamación, 1 = inflamación de nivel bajo, 2 = nivel intermedio, 3 = inflamación de nivel alto con engrosamiento de la pared, 4 = infiltración transmural, pérdida de células calciformes, engrosamiento de la pared.

Aislamiento de Células y Enriquecimiento en Células T:

Pueden aislarse células Th1, Th2, y células T reguladoras de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, v.g., como se describe en Current Protocols in Immunology (2001, Eds. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, publicado por John Wiley & Sons).  
50

En una realización, se prepararon suspensiones de células individuales de MLN por trituración suave en medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY). Las células se resuspendieron brevemente en agua destilada para lisar los RBC. Los MLN se lavaron luego 3 veces en un volumen grande de RPMI.

55 Se aislaron LPMC intestinales como se describe a continuación. El tejido intestinal se lavó exhaustivamente con RPMI, y todas las placas de Peyer visibles se extrajeron con tijeras. Se abrió longitudinalmente el intestino, se cortó en piezas de 5 mm y se incubó luego en EDTA 0,5 mM en Hanks exento de calcio y magnesio durante 20 min a



37°C con sacudidas para liberar los linfocitos intraepiteliales y las células epiteliales. Esto se repitió después de lavado concienzudo. El tejido se incubó luego 20 min a 37°C en 20 ml de RPMI que contenía 10% FCS, tampón HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol  $5 \times 10^5$  M, piruvato de sodio 1 mM, 100 U/ml de penicilina, 5 mg/ml de gentamicina, y 100 mg/ml de estreptomycin (todos ellos de GIBCO) y 1 mg/ml de colagenasa (Sigma #CO130). Al final de la incubación, el tejido se sometió a destrucción mecánica ulterior utilizando una jeringuilla de 1 ml. Para eliminar los residuos, las preparaciones de LPMC se lavaron a través de una gasa pre-humedecida dispuesta sobre un embudo con RPMI. A continuación, se lavaron las LPMC una sola vez y se tamizaron a través de una columna de lana de nailon prehumedecida de 2 cm compactada suavemente en una jeringuilla de 10 ml. Después del lavado, las células (hasta  $2 \times 10^7$ ) se dispusieron en una columna de Percoll con un gradiente 30:70%. Las células se centrifugaron a 2200 x g a la temperatura ambiente durante 20 min. Los LPMC recogidos de la interfase 30:70 se lavaron y se mantuvieron en hielo hasta su utilización. La viabilidad celular era 90% como se determinó por exclusión con eosina Y.

Para los experimentos de transferencia de células, se aislaron células T MLN por selección negativa utilizando el procedimiento de enriquecimiento Spin Sep, empleando partículas densas recubiertas de anticuerpos como se describe por el fabricante (#17031, #17032, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Se utilizó citometría de flujo después de cada separación para asegurar la recuperación y pureza apropiadas (> 98%) de las células T Thy+.

#### Transferencia de Células:

Se aislaron células MLN de ratones IL10<sup>-/-</sup> colonizados dos semanas con *H. polygyrus* o de ratones IL10<sup>-/-</sup> sanos de la misma edad sin dicha colonización. Estas células MLN dispersadas y no fraccionadas ( $2 \times 10^7$  células/ratón) o células T MLN ( $5 \times 10^6$  células/ratón) se transfirieron luego a ratones IL10<sup>-/-</sup> colíticos dos días después de la interrupción del tratamiento con piroxicam por inyección ip. La colitis se evaluó 14 días después.

#### Métodos adicionales para preparación de las células T reguladoras

En algunas realizaciones de la presente descripción, pueden prepararse células T reguladoras a partir de células cultivadas de un animal para análisis ulterior de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, v.g., como se describe en las Solicitudes de Patente US con los Núms. de Serie 2003/0170648, 2003/0157057, 2003/0133936, 2003/0064067, 2003/0049696, 2002/0182730, 2002/0090724, 2002/009035.

Fuentes in vivo de poblaciones de células útiles como fuente de células incluyen, pero sin carácter limitante, sangre periférica, producto de sangre de leucoféresis, producto de sangre de aféresis, nódulos linfáticos periféricos, tejido linfoide asociado al intestino, bazo, timo, sangre del cordón umbilical, nódulos linfáticos mesentéricos, hígado, sitios de lesiones inmunológicas, v.g. fluido sinovial, páncreas, fluido cerebroespinal, muestras de tumores, y análogos. El donante es preferiblemente humano, y puede ser fetal, neonatal, muchacho, adulto, y puede ser normal, enfermo, o propenso a una enfermedad de interés.

Por ejemplo, las células T reguladoras pueden enriquecerse sobre la base de la expresión de marcadores de la superficie celular. En una realización, las células se seleccionan positivamente respecto a la expresión de CD4 y CD25, y pueden seleccionarse negativamente respecto a la ausencia de CD45RA. Opcionalmente, pueden utilizarse otros marcadores para separar ulteriormente subpoblaciones de las células Treg, con inclusión de CD69, CCR6, CD30, CTLA-4, CD62L, CD45RB, y CD45RO. Los métodos pueden incluir procedimientos o pasos ulteriores de enriquecimiento o purificación para aislamiento de células por selección positiva para otros marcadores celulares específicos.

En otra realización, las células T reguladoras se separan de una mixtura compleja de células por técnicas que enriquecen en células que tienen las características de ser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, y opcionalmente CD45RA<sup>-</sup>. Para aislamiento de las células del tejido, puede utilizarse una solución apropiada para dispersión o suspensión. Una solución de este tipo será generalmente una solución salina equilibrada, v.g. solución salina normal, PBS, solución salina equilibrada de Hanks, etc., complementada convenientemente con suero de ternero fetal, BSA, suero normal de cabra, u otros factores existentes naturalmente, en asociación con un tampón aceptable a baja concentración, generalmente de 5 a 25 mM. Tampones convenientes incluyen HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, etc.

En otra realización, la separación de la población de células T reguladoras utiliza luego separación por afinidad para proporcionar una población sustancialmente pura. Las técnicas para separación por afinidad pueden incluir separación magnética, utilizando cuentas magnéticas recubiertas de anticuerpos, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o utilizados en asociación con un anticuerpo monoclonal, v.g., complemento y citotoxinas, y "lavado en batea" con anticuerpo fijado a una matriz sólida, v.g., placa, u otra técnica conveniente. Técnicas que proporcionan separación exacta incluyen clasificadores de células activados por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, tales como tales como canales de colores múltiples, canales de detección de la dispersión de la luz en ángulo bajo y obtusos, canales de impedancia, etc. Las células pueden seleccionarse contra células muertas por empleo de tintes asociados con células muertas (yoduro de propidio, LDS). Puede emplearse cualquier técnica que no sea indebidamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

Los reactivos de afinidad pueden ser receptores específicos o ligandos para las moléculas de la superficie celular arriba indicadas. Además de reactivos de anticuerpos, pueden utilizarse péptido-antígeno MHC y pares de receptores de células T; ligandos peptídicos y receptor; moléculas efectoras y receptoras, y análogos. Los anticuerpos y receptores de células T pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser producidos por animales transgénicos, animales inmunizados, células B humanas o animales inmortalizadas, células transfectadas con vectores de DNA que codifican el anticuerpo o receptor de las células T, etc. Los detalles de la preparación de anticuerpos y su idoneidad para uso como miembros de fijación específicos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

De particular interés es el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. Convenientemente, estos anticuerpos se conjugan con un marcador para uso en separación. Los marcadores incluyen cuentas magnéticas, que permiten separación directa, biotina, que puede separarse con avidina o estreptavidina fijadas a un soporte, fluorocromos, que pueden utilizarse con un clasificador de células activado por fluorescencia, o análogos, para favorecer la facilidad de separación del tipo de células particular. Fluorocromos que encuentran aplicación incluyen ficobiliproteínas, v.g. ficoeritrina y alofocianinas, fluoresceína y rojo Texas. Frecuentemente, cada anticuerpo se marca con un fluorocromo diferente, para permitir la clasificación independiente para cada marcador.

En una realización, los anticuerpos se añaden a una suspensión de células, y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para fijar los antígenos de la superficie celular disponibles. La incubación durará por lo general al menos aproximadamente 5 minutos y usualmente menos de aprox. 30 minutos. Es deseable tener una concentración suficiente de anticuerpos en la mixtura de reacción, a fin de que la eficiencia de la separación no se vea limitada por falta de anticuerpos, es decir, utilizando una cantidad saturante de anticuerpo. La concentración apropiada puede determinarse también por titulación. El medio en el que las células se separan será cualquier medio que mantenga la viabilidad de las células. Un medio preferido es solución salina tamponada con fosfato que contiene desde 0,1 a 0,5% de BSA. Diversos medios están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con la naturaleza de las células, con inclusión de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (dMEM), Solución Salina Básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS), RPMI, medio de Iscove, PBS con EDTA 5 mM, etc., complementados frecuentemente con suero de ternero fetal, BSA, HSA, etc.

La intensidad de tinción de las células puede monitorizarse por citometría de flujo, donde láseres detectan los niveles cuantitativos de fluorocromo (que es proporcional a la cantidad de antígeno de la superficie celular fijada por los anticuerpos). La citometría de flujo, o FACS, puede utilizarse también para separar poblaciones de células basándose en la intensidad de tinción de anticuerpos, así como otros parámetros tales como tamaño celular y dispersión de la luz. Aunque el nivel absoluto de tinción puede diferir con un fluorocromo y preparación de anticuerpos particular, los datos pueden normalizarse a un control.

Las células marcadas se separan luego en cuanto a la expresión de CD4 y CD25. Las células separadas pueden recogerse en cualquier medio apropiado que mantenga la viabilidad de las células, teniendo usualmente un cojín de suero en el fondo del tubo de recogida. Diversos medios están disponibles comercialmente y se pueden utilizar de acuerdo con la naturaleza de las células, con inclusión de dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, medio de Iscoves, etc., complementado frecuentemente con suero de ternero fetal.

De esta manera pueden conseguirse composiciones altamente enriquecidas en actividad de Treg humanas. La población en cuestión será, o estará próxima a 70% o más de la composición celular, y usualmente 90% o aproximadamente 90% o más de la composición de células, y puede ser tan alta como aproximadamente 95% o más de la población de células. La población de células enriquecidas puede utilizarse inmediatamente. Las células pueden congelarse también, aunque es preferible congelar las células antes del procedimiento de separación, o pueden congelarse a las temperaturas del nitrógeno líquido y guardarse durante largos periodos de tiempo, descongelándose y siendo de nuevo aptas para utilización. Las células se guardarán usualmente en DMSO y/o FCS, en combinación con medio, glucosa, etc. Una vez descongeladas, las células pueden expandirse por el uso de factores de crecimiento, antígeno, estimulación, células dendríticas, etc. para proliferación y diferenciación.

#### Cultivo de células:

Para análisis de citoquinas, se cultivaron células durante 48 h en placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Cambridge, MA) con 200 µl de medio ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) a 37°C. El medio de cultivo era RPMI que contenía 10% FCS, tampón HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, piruvato de sodio 1 mM, 100 U/ml de penicilina, 5 mg/ml de gentamicina, y 100 mg/ml de estreptomina (todos ellos de Gibco). Para la mayoría de los experimentos, las células se cultivaron solas o con mAb anti-CD3 (2C11, ATCC) y anti-CD28 (Pharmingen, San Diego, CA) (cada uno de ellos a 1 µg/ml). Las células T aisladas se cultivaron previamente en pocillos recubiertos durante una noche con mAb anti-CD3 y -CD28. Para el análisis de IL12, las células se cultivaron con el oligonucleótido de la cadena principal de fosforotioato sintética ODN 1826 (TCCATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID NO. 3) que contiene dos motivos CpG inmunoestimuladores (subrayados) (13; 14), proporcionado por el Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA), y se utilizaron a 0,6 µg/ml para estimular la producción.

ELISAs para Citoquinas Murinas: Los ELISAs se realizaron como se describe anteriormente en la sección VI.

**Ejemplo 2. La respuesta Th2 a *S. mansoni* modula en sentido decreciente una respuesta Th1 en curso a un antígeno bacteriano inductor de Th1 no afín:**

Está bien establecido que las respuestas inmunes de las células T pueden polarizarse en patrones Th1 o Th2. Esta polarización ocurre debido a que el IFN $\gamma$  de las células Th1 inhibe la proliferación de las células Th2, mientras que IL-4 e IL-10 de las células Th2 inhibe el desarrollo de las células Th1. Los experimentos siguientes demostraron que la esquistosomiasis altera la respuesta de Th1 murina a una infección micobacteriana establecida.

Se co-infectaron ratones con *M. avium* y *S. mansoni* para evaluar la respuesta del hospedador a estos estímulos inflamatorios Th1 y Th2 claramente diferentes. Los ratones BALB/cAnN desarrollan infección crónica de *M. avium* cuando se inyectan con este organismo ( $10^6$  CFU). Sesenta días después del establecimiento de la infección micobacteriana, los ratones se infectaron con *S. mansoni* (40 cercarias). Los ratones se sacrificaron 60 días después. Los grupos de control incluían ratones que recibieron *M. avium* solamente durante 120 días o solamente *S. mansoni* durante 60 días. Esplenocitos dispersados o células de granuloma aisladas de estos animales se cultivaron *in vitro* ( $4 \times 10^5$  células/pocillo) durante 48 horas en presencia o ausencia de antígeno de huevos de esquistosoma (SEA, un antígeno Th2 potente) o derivado de proteína purificado de antígeno micobacteriano (PPD, un antígeno inductor de Th1 potente) utilizado a concentración óptima. Después de la incubación, se ensayaron los sobrenadantes respecto a producción de citoquinas o inmunoglobulinas utilizando ELISAS. Los datos en las Figuras 1-3 son valores medios  $\pm$  SD de 3 experimentos separados.

Los esplenocitos de los ratones infectados sólo con *M. avium* secretaban grandes cantidades de IFN $\gamma$  después de estimulación con PPD (antígeno Th1). Las células del bazo de los ratones de control infectados no producían cantidad alguna. Y lo que es más importante, no se detectaba en absoluto IFN $\gamma$  en los cultivos de células del bazo de los ratones infectados simultáneamente (*M. avium* solo frente a infección concurrente,  $P < 0,001$ , Figura 1). El antígeno soluble de huevos de esquistosoma (SEA, antígeno Th2) estimulaba sólo la liberación de IL-4 e IL-5 de los esplenocitos de los animales infectados con *S. mansoni*. Los ratones infectados exclusivamente con *M. avium* no producían en absoluto IL-4 o IL-5 en respuesta a PPD o SEA. En cambio, los esplenocitos de los animales co-infectados secretaban algo de IL-4 después de estimulación con PPD (Figura 1).

Se aislaron granulomas de los hígados de ratones infectados con *M. avium* o *S. mansoni*, o de animales que padecían infección concurrente. Los animales infectados concurrentemente desarrollan granulomas hepáticos que contienen a la vez huevos de esquistosoma y micobacterias fácilmente evidentes por examen histológico. Las células de granuloma dispersadas de estos animales se cultivaron *in vitro* durante 48 h en presencia o ausencia de SEA o PPD utilizados a concentración óptima. Las células de granuloma de los ratones infectados sólo con *M. avium* secretaban grandes cantidades de IFN $\gamma$  después de estimulación con PPD. No se detectó cantidad alguna de IFN $\gamma$  en los cultivos de células de granuloma de los ratones infectados simultáneamente (*M. avium* solo frente al otro,  $P < 0,001$ ) (Figura 2). SEA estimulaba la liberación de IL-4 de las células de granuloma de los animales infectados con *S. mansoni*. SEA no promovía la secreción de IFN $\gamma$  en ninguna circunstancia. Los ratones infectados exclusivamente con *M. avium* no producían cantidad alguna de IL4 en respuesta a PPD. En cambio, las células de granuloma de los animales co-infectados secretaban algo de IL-4 después de estimulación con PPD (Figura 2).

Las respuestas de Th1 promueven la producción de IgG2a, en tanto que las reacciones de Th2 aumentan IgG1 e IgE. La Figura 2 muestra que los ratones infectados con *M. avium* tienen niveles altos de IgG2a en suero. En cambio, los animales co-infectados tienen concentraciones normales de IgG2a en suero, pero aumentaban los niveles de IgG1 e IgE. Estos datos, tomados en su conjunto, demuestran que una respuesta de Th2 a una infección helmíntica puede modular en sentido decreciente la respuesta en curso del hospedador a un organismo inductor de Th1 potente como *M. avium*.

**Ejemplo 3. La colonización con helmintos intestinales o la exposición a sus ovas atenúa la inflamación intestinal de tipo Th1 en la colitis murina inducida por TNBS:**

La instilación rectal de TNBS en etanol al 50% induce una colitis en los ratones que comparte características con la enfermedad de Crohn. La inflamación de colon se caracteriza por células T CD4+ infiltrantes con expresión elevada de mRNA de IFN $\gamma$ . Las células T de la lámina propia de ratones tratados con TNBS secretan 50 veces más IFN $\gamma$  y 5 veces menos IL4 que las células T de los controles (Neurath et al., 1995, supra). Las células mononucleares de la lámina propia secretan 30 veces más TNF $\alpha$  que las células de los ratones de control (Neurath et al., 1997, Eur. J. Immunol., 27:1743). Y lo que es más importante, la colitis TNBS puede prevenirse o mejorarse por tratamiento con anti-IL-12 (Neurath et al., 1995, supra), anti-TNF $\alpha$  (Neurath et al., 1997, supra), o IL-10 (Duchmann et al., 1996, Eur. J. Immunol., 26:934). La colitis inducida por TNBS puede prevenirse también por exposición oral previa al hapteno (Elson et al., 1996, J. Immunol., 157: 2174) probablemente por aumento de las respuestas mucosales de IL-4, IL-10 y TGF $\beta$  (Neurath et al., 1996, J. Exp. Med., 183: 2605).

El modelo de colitis por TNBS utilizando ratones BALB/c está establecido. La administración rectal de TNBS (0,1 ml de stock de 5 mg/ml) en etanol al 50% producía colitis de manera reproducible en estos animales. Para cada uno de los experimentos con TNBS expuestos más adelante, se administró a animales expuestos a los parásitos y animales

de control la misma preparación de TNBS el mismo día y por el mismo operador, que se mantenía a ciegas respecto al grupo de tratamiento.

A. La esquistosomiasis inhibe la liberación de IFN $\gamma$  por MLN y células del bazo de ratones tratados con TNBS.

5 Se investigó si la infección de esquistosomas altera la respuesta Th1 en ratones del modelo de colitis animal tratados con TNBS. Se infectaron los ratones con 35 cercarias de *S. mansoni* por inyección subcutánea. Los gusanos maduran y comienzan a poner huevos aproximadamente 6 semanas después de la iniciación de la infección. Dos semanas más tarde (a las 8 semanas de la infección), se trataron los ratones con TNBS. La capacidad de MLN y las células del bazo para producir IFN $\gamma$  en respuesta a la estimulación de las células T (anti-CD3) se examinó varios días después. Como se muestra en la Tabla 2, la infección natural con esquistosomas inhibe fuertemente la liberación de IFN $\gamma$  por el nódulo linfático mesentérico (MLN) y las células del bazo de los ratones tratados con TNBS.

Tabla 2.

La Esquistosomiasis Inhibe la Producción de IFN $\gamma$  por las Células MLN y las Células T Esplénicas de los Ratones Tratados con TNBS

15

Grupo	IFN $\gamma$ estimulado con $\alpha$ -CD3 (ng/ml)	
	Células MLN	Células de bazo
Ratones no infectados tratados con TNBS	3,2 $\pm$ 0,7	44,1 $\pm$ 2,3
Ratones infectados con esquistosomas tratados con TNBS	1,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>

IFN $\gamma$  medio (ng/ml)  $\pm$ SE de determinaciones triplicadas medidas por ELISA. a) p<0,1 b) p<0,05 Los cultivos contenían 10<sup>6</sup> células MLN o células de bazo/pocillo dispersadas incubadas en 200  $\mu$ l de medio durante 48 horas a 37°C en presencia de anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) (2C11). Los resultados son representativos de dos experimentos.

B. La exposición a las ovas de esquistosoma inhibe la liberación de IFN $\gamma$  por las células MLN y las células del bazo de los ratones tratados con TNBS.

20 En la esquistosomiasis, es la exposición a las ovas de los parásitos en lugar de los gusanos adultos lo que induce una respuesta Th2. La infección de esquistosomas no induce respuestas Th2 fuertes hasta que los gusanos maduran y comienzan a poner huevos (Grzych et al., 1991, *J. Immunol.*, 146: 1322). Los ratones expuestos a huevos de esquistosoma intactos en ausencia de infección natural desarrollan una fuerte respuesta Th2 (Oswald et al., 1994, *J. Immunol.*, 153:1707). Estas observaciones sugieren que la exposición a huevos de esquistosoma en ausencia de infección natural puede inducir las respuestas Th2 y suprimir las respuestas Th1.

25 Para examinar si la pre-exposición a huevos de esquistosoma podría inhibir la respuestas Th1 sin requerir infección por gusanos adultos, se inocularon ratones dos veces con 10<sup>4</sup> huevos de esquistosoma por inyección intraperitoneal (ip) 14 y 4 días antes de la exposición rectal con TNBS. Estos tiempos se seleccionaron para modelizar la deposición continua de huevos que ocurre en la infección natural. Ratones no expuestos a huevos de parásitos pero tratados con TNBS sirvieron como controles. Los huevos se congelaron previamente y no eran viables en el momento de la inyección. Una vez más, se examinó la capacidad de las células MLN y células del bazo para producir IFN $\gamma$  en respuesta a la estimulación de las células T (anti-CD3) varios días después de la instilación de TNBS. Al igual que la infección natural con esquistosomas (Tabla 1), la exposición ip. a huevos inhibía la producción de IFN $\gamma$  por las células MLN y las células esplénicas T de los ratones tratados con TNBS como se muestra en la Tabla 3.

35

Tabla 3.

La exposición a Huevos de Esquistosomas Inhibe la Producción de IFN $\gamma$  por las Células MLN y las Células T Esplénicas de los Ratones Tratados con TNBS

Tratamiento	IFN $\gamma$ estimulado con $\alpha$ -CD3 (ng/ml)
-------------	---

	Células MLN	Células de bazo
TNBS solo	4,65 ± 0,02	47,1 ± 3,0
Huevos ip. y TNBS	2,19 ± 0,11 <sup>a</sup>	21,8 ± 3,4 <sup>b</sup>

IFN $\gamma$  medio (ng/ml)  $\pm$  SE de determinaciones triplicadas medidas por ELISA. a) p<0,5 b) p<0,05 Los cultivos contenían 10<sup>6</sup> células MLN o células de bazo/pocillo dispersadas incubadas en 200  $\mu$ l de medio durante 48 horas a 37°C en presencia de anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) (2C11). Los resultados son representativos de tres experimentos separados.

#### C. La exposición a ovas de esquistosoma protege los ratones contra la colitis inducida por TNBS.

La inhibición del desarrollo de la respuesta Th1 mucosal puede atenuar la colitis inducida por TNBS. La exposición previa a huevos de esquistosoma inhibe la secreción de citoquina Th1 por las células MLN y las células T esplénicas. Para examinar si la inyección ip de huevos de esquistosoma podría inhibir la colitis inducida por TNBS, se inyectaron huevos como anteriormente, seguido por tratamiento con TNBS. El tratamiento con huevos reducía espectacularmente la mortalidad acumulativa en tres experimentos separados, desde 60% (16/27) en el grupo de control a 22% (6/27) en los ratones expuestos a huevos. La inflamación intestinal se registró en una escala de 4 puntos como se ha detallado anteriormente en Métodos Generales. En los ratones que sobrevivieron, el tratamiento con huevos atenuaba la inflamación intestinal desde 3,1  $\pm$  0,5 (valor medio  $\pm$  SD) en el grupo de control a 1,3  $\pm$  0,3 en los ratones expuestos a huevos (p < 0,05, Figura 4). Experimentos subsiguientes demostraron que la diferencia máxima entre los grupos era evidente al cabo de 3 días después del tratamiento con TNBS. Otros experimentos realizados hasta 14 días después de la instilación de TNBS demostraron que la exposición a los huevos confería protección prolongada. Estos datos indican que los huevos de esquistosoma protegen los ratones contra el desarrollo de colitis fatal por inhibición de las respuestas mucosales Th1.

#### D. Los helmintos intestinales inducen respuestas Th2 del hospedador.

Se examina si parásitos helmínticos distintos de *S. mansoni* pueden modular respuestas Th1 del hospedador. La expresión de inmunidad protectora a los nematodos intestinales es dependiente de las células T CD4. Los ratones expelen gusanos o limitan la infección por montar una respuesta Th2. La expulsión de gusanos no parece depender exclusivamente de eosinofilia intestinal ni de mastocitosis mucosal. IL-4 puede tener un papel crítico en la expulsión de gusanos, dado que el tratamiento con mAb bloqueador anti-IL-4 o anti-receptor de IL-4 promueve la retención de los gusanos (Else et al., 1994, *J. Exp. Med.*, 179: 347). Inversamente, el tratamiento con IL-4 promueve el aclaramiento de los gusanos (Figura 4).

*T. muris* vive en el colon del hospedador murino. El mismo está relacionado con *Trichuris trichiura*, un parásito transportado por aproximadamente mil millones de personas durante sus vidas (Grencis et al., 1996, *Gastroenterology Clinics of North America*, 25: 579). La ingestión de huevos inicia la infección. Los huevos liberan larvas que penetran en el epitelio cecal. Las mismas maduran luego en gusanos adultos. El parásito no se replica dentro del hospedador, lo que permite controlar la intensidad de la infección (Bancroft et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24: 3113).

Se utilizó *T. muris* para modular en sentido decreciente la sensibilidad intestinal a Th1. La infección de *T. muris* se establece por sonda esofágica oral con 250 huevos embrionados que contienen larvas viables. Los ratones BALB/c pueden albergar *T. muris* y expulsan naturalmente los gusanos dentro de 4 semanas desde el momento de la infección. Se trataron ratones infectados con *T. muris* o falsamente infectados con instilación rectal de TNBS 4 semanas después de la iniciación de la infección. La colonización previa con *T. muris* redujo la mortalidad acumulada en dos experimentos separados desde 58% (7/12) en el grupo falsamente infectado a 21% (3/14) en el grupo expuesto al parásito. Adicionalmente, los ratones colonizados previamente con *T. muris* desarrollan colitis por TNBS atenuada (0,92  $\pm$  0,5, valor medio  $\pm$  SD) en comparación con los ratones infectados falsamente (3,13  $\pm$  0,63, p < 0,05). Estos datos indican que la exposición previa a parásitos intestinales (*T. muris*) protege los ratones del desarrollo de la colitis severa mediada por Th1.

#### Ejemplo 4. La destrucción del gen IL-10 no altera significativamente la interacción hospedador/parásito.

IL-10 es una citoquina inmunorreguladora importante que modula en sentido decreciente la activación de los macrófagos y la función de células accesorias (Moore et al., 1993, *Ann. Rev. Immunol.*, 11: 165). Los ratones que se han hecho deficientes en IL-10 por destrucción direccionada del gen (IL-10<sup>-/-</sup>) desarrollan una enterocolitis crónica que está influenciada por la flora del colon (Kuhn et al., 1993, *Cell*, 75: 263). La inflamación intestinal se atenúa por tratamiento con anticuerpo anti-IFN $\gamma$ , demostrando que la colitis es resultado de respuestas Th1 excesivamente enérgicas a los contenidos del colon (Berg, et al., 1996, *J. Clin. Invest.*, 98: 1010). Estos ratones sirven como

modelos excelentes para la colitis espontánea similar a la de la enfermedad de Crohn. En este ejemplo, se utilizaron ratones IL-10<sup>-/-</sup> sobre los sustratos 129 y C57B1/6.

A. Los ratones IL-10<sup>-/-</sup> pueden montar respuestas de Th2 a los parásitos.

5 Los ratones infectados con el nematodo intestinal *N. brasiliensis* desarrollan inflamación de tipo Th2 al parásito con producción de IL-4, IL-5 e IL-10. *N. brasiliensis* puede colonizar ratones IL-10<sup>-/-</sup> y estimular una respuesta intestinal Th2 apropiada (Kuhn et al., 1993, supra). Se infectaron ratones IL-10<sup>-/-</sup> con *S. mansoni* para examinar si los mismos montan una respuesta Th2.

10 La Tabla 4 muestra que los esplenocitos de los ratones con el gen IL-10 destruido, colonizados durante 8 semanas con *S. mansoni* secretan grandes cantidades de IL-4 después de estimulación con antígeno de huevos de esquistosoma (SEA) o anti-CD3. Los granulomas que rodean los huevos de esquistosoma en estos ratones contienen el porcentaje elevado usual (45-50%) de eosinófilos, y producen IL-4 e IL-5. Así pues, los mismos muestran una respuesta Th2 eficaz. Estos datos indican que la exposición a parásitos helmínticos como *S. mansoni* inducirá una respuesta Th2 fuerte incluso en ausencia de IL-10.

Tabla 4

15 La Esquistosomiasis Induce una Respuesta Th2 en los Ratones Deficientes en IL10

Citoquina	Células del Bazo de Ratones Infectados con Esquistosomas		
	No estimulados	Estimulados con SEA	Estimulados con α-CD3
IL-4 (ng/ml)			
Tipo Salvaje	0,07±0,08	0,21± 0,02	3,94 ± 0,12
IL-10 <sup>-/-</sup>	0,41 ± 0,10	2,56±0,23	5,06±0,:33

IL-4 medio (ng/ml) ± SE de determinaciones triplicadas medidas por ELISA. a) p<0,5 b) p<0,05 Los cultivos contenían 10<sup>6</sup> células/pocillo dispersadas incubadas durante 48 horas a 37°C en 200 µl de medio en ausencia o presencia de antígeno de huevos de esquistosoma (SEA 5 µg/ml) o anti-CD3 (1 µg/ml) (2C11). Los resultados son representativos de dos experimentos separados utilizando un mínimo de cuatro ratones WT y ratones KO en cada experimento.

B. La afección de Th2 helmíntica inhibe el desarrollo natural de la inflamación mucosal en los ratones IL-10<sup>-/-</sup>.

20 Los ratones deficientes en IL-10 podrían albergar parásitos helmínticos y montar una respuesta Th2 potente. Dado que los ratones IL-10<sup>-/-</sup> pueden desarrollar respuestas Th2 y albergar parásitos intestinales, los mismos sirven como modelos excelentes para estudiar el efecto de la exposición a los parásitos sobre la colitis espontánea o en curso. IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria importante. Es posible que la destrucción de este circuito inmunorregulador esencial prevenga la afección de Th2 mucosal por parásitos. La evidencia presente indica que la infección con *T. muris* impide la colitis espontánea que se desarrolla en los ratones IL-10<sup>-/-</sup>. Los animales (de 6 semanas) recibieron *T. muris* o infección falsa y se sacrificaron 6 semanas después. La inflamación del colon de los ratones IL-10<sup>-/-</sup> infectados con *T. muris* o falsamente infectados se registró en una escala de cuatro puntos como se ha detallado anteriormente en Métodos Generales. La infección previa con *T. muris* atenuaba la inflamación intestinal desde 3,0 ± 0,3 (valor medios ± SD) en el grupo falsamente infectados a 2,2 ± 0,1 (p < 0,05) en los ratones IL-10<sup>-/-</sup> expuestos a los parásitos. Estos datos demuestran que la exposición previa a parásitos helmínticos atenúa la colitis espontánea en los ratones deficientes en IL-10.

**Ejemplo 6. La colonización intestinal con *Trichuris suis* modula en sentido decreciente la actividad de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Crohn:**

35 Pacientes con enfermedad de Crohn se colonizan con *Trichuris suis* y se evalúa la mejora en la actividad intestinal de la enfermedad. *T. suis*, el gusano látigo del porcino, está estrechamente relacionado con *T. trichiura*, un helminto intestinal humano común en los países subdesarrollados. El gusano látigo es un agente potencial para la terapia. El

5 parásito humano natural *Trichuris trichiura* es un organismo muy pequeño que reside en el colon por fijación a la mucosa. Usualmente, la colonización ordinaria no produce síntoma alguno ni causa problemas de salud para el hospedador. Este es el caso en millones de personas colonizadas en todo el mundo, pero en una minoría, la infestación fuerte produce diarrea, hemorragias y anemia ferropénica. Es interesante que el ciclo vital del parásito es tal que el hospedador no se autoinfecta. Los huevos requerirían una fase en suelo para maduración a fin de volverse infecciosos, teniendo que reingerirse después para aumentar la carga de parásito para un individuo. Así pues, la infestación con *T. trichiura* no aumentará dentro del hospedador a no ser que se ingieran los huevos existentes en el suelo. El agente se trata fácil y eficazmente con 3 días de mebendazol. El gusano látigo humano podría utilizarse para colonizar el hospedador y considerarse como un agente experimental a fin de modificar el proceso inmunitario en la enfermedad de Crohn.

10 Sin embargo, *Trichuris trichiura* plantea un problema sanitario potencial para el hospedador. Dado que el humano es el único hospedador natural, los huevos para uso experimental tendrían que cosecharse de otros humanos, creando el potencial para transmisión de otras enfermedades infecciosas humanas para el individuo experimental. Por ello, se utilizó un parásito animal estrechamente relacionado. El gusano látigo del porcino (*Trichuris suis*) tiene el potencial de colonizar temporalmente un hospedador humano sin causar síntomas, enfermedad, una enfermedad co-infecciosa o un riesgo para la salud pública.

15 El gusano látigo del porcino está estrechamente relacionado con la especie que infecta a los humanos. Los dos organismos son la misma familia y son morfológicamente similares, pero pertenecen a una especie diferente y pueden distinguirse morfológicamente, durante el desarrollo y clínicamente. El ovum del gusano látigo del porcino es ligeramente mayor, tiene una espina de forma diferente, y la tasa de desarrollo desde un huevo a un adulto es más lenta que la de *Trichuris trichiura* (Beer, 1976, Res. Vet. Sci., 20: 47). Y lo que es más importante, es posible obtener ovas infecciosas del parásito a partir de animales SPF.

20 Se produjo una fuente de suministro de huevos infecciosos de *T. suis* como se ha descrito arriba. Los huevos se testaron para confirmar la ausencia de contaminación con patógenos entéricos (v.g., *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, y *E. coli* enterotóxico) y virus (v.g., CMV, HSV, VZV, adenovirus y enterovirus).

25 Dos pacientes con enfermedad de Crohn avanzada resistente a la medicación se colonizaron con *T. suis*. Los mismos toleraban el parásito con pocos o ningún síntoma atribuibles a este organismo. La Tabla 5 muestra que después de conseguir una colonización evidente, ambos participantes experimentaron una disminución en los valores CDAI, la diarrea, y los índices inflamatorios. Este resultado indica que los helmintos son útiles para modulación de respuestas inmunes anormales, con inclusión, pero sin carácter limitante, de la enfermedad de Crohn.

Tabla 5

Los Pacientes con enfermedad de Crohn pueden beneficiarse de la colonización con <i>T. suis</i> .				
Paciente	Parámetro	Línea Base	Semana 2	Semana 4
		a	b	b
1	CDAI <sup>c</sup>	250,2	269,9	147,4
	Heces/semana	67	101	49
	ESR <sup>d</sup>	17	11	4
	Proteína C-reactiva	<0,5	<0,5	<0,5
2	CDAI	341,3	169,6	136,7
	Heces/semana	77	27	25
	ESR	19	7	ND

a) Valores estables al comienzo del estudio. b) Valores a las 2 y 4 semanas después del comienzo de la colonización with *T. suis*. c) índice de actividad de la enfermedad de Crohn's. d) Tasa de sedimentación de los eritrocitos. ND: no determinado

**Ejemplo 7. *H. polygyrus* en la prevención y terapia de la enfermedad intestinal inflamatoria**

Para investigar el papel de las células T reguladoras en la protección inducida por parásitos contra la enfermedad inflamatoria, se realizaron más experimentos.

5 Los experimentos utilizaron el helminto intestinal murino *H. polygyrus*. *H. polygyrus* habita en el duodeno del hospedador sin causar inflamación o lesión en el íleo terminal o el colon. TNBS en alcohol induce colitis cuando se instila por vía intra-rectal en los ratones. Fig. 5 muestra que este organismo protege los ratones contra la colitis inducida por TNBS. La colonización se estableció por administración de sonda esofágica oral de 200 larvas viables. Los ratones expelen los gusanos aproximadamente 2 semanas después de la iniciación de la colonización. Se trataron ratones infectados con *H. polygyrus* o falsamente infectados con instilación rectal de 0,1 ml de TNBS (5 mg/ml en EtOH al 50%) 4 semanas después de la iniciación de la colonización con gusanos. La inflamación se evaluó en secciones histológicas teñidas 3 días después de la inducción de la colitis.

Se realizaron experimentos para testar si la colonización helmíntica protege los ratones contra la IBD inducida por TNBS por limitación de la producción intestinal de citoquinas Th1 como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL12. Figs. 6 y 7 muestran que la exposición de ratones WT sanos exentos de IBD a *H. polygyrus* hace que la mucosa intestinal distal sea menos capaz de producción de IFN $\gamma$  e IL12.

15 Las citoquinas reguladoras como IL10, TGF $\beta$  y PgE2 son capaces de restringir la función de las células "Th1". Se determinó si *H. polygyrus* promueve la producción de estas citoquinas reguladoras dentro de la mucosa intestinal. Fig. 8 muestra que este gusano induce la producción mucosal de IL10. IL10 regula en sentido decreciente una red de mediadores proinflamatorios como TNF $\alpha$ , IL6 e IL12. Por tanto, es razonable suponer que la IL10 producida en la mucosa intestinal restringe la función de las células "Th1". Fig. 9 muestra que las LPMC de ratones con *H. polygyrus* producen sustancialmente más IFN $\gamma$  cuando se cultivan con mAb inhibidor anti-IL10R, respaldando este postulado.

Citoquinas inmunorreguladoras potencialmente importantes que pueden proteger contra la enfermedad incluyen la prostaglandina E2 (PgE2), IL4, IL5, IL13 y TGF $\beta$ . Las Figuras 10-12 muestran que los helmintos inducen la producción de citoquinas protectoras E2 (PgE2), IL4, IL5, IL13 y TGF $\beta$  en la mucosa intestinal.

25 Las células T son la fuente principal de IFN $\gamma$  en la mucosa intestinal (Fig. 13). IFN $\gamma$  es importante para la inducción de la colitis por TNBS.

Los helmintos intestinales inducen células T reguladoras en los MLN que migran al intestino para controlar localmente la reactividad inmune mucosal. Los experimentos revelaron (Fig. 14) que LPMC de ratones WT naif no infectados exhiben una capacidad disminuida de producir IFN $\gamma$  después de transferencia de células T MLN procedentes de ratones infectados con gusanos.

30 Algunos experimentos utilizaron ratones transgénicos con proteína verde fluorescente (GFP) para experimentos de transferencia adoptiva a fin de determinar si los subconjuntos de células T reguladoras MLN entraban en la lámina propia intestinal para producir subsiguientemente citoquinas reguladoras. Como se ve en Fig. 15, las células T reguladoras MLN supuestas procedentes de ratones GFP+ portadores de *H. polygyrus* penetra de hecho en la mucosa intestinal de receptores WT sanos.

35 Este experimento muestra cómo protegen los helmintos de la enfermedad. Se encontró en pruebas clínicas que la colonización helmíntica mejora la IBD activa. Se testó también de qué modo la colonización con *H. polygyrus* invierte la colitis murina en curso.

40 Los ratones IL10 $^{-/-}$  desarrollan colitis Th1 crónica que empeora gradualmente a medida que envejecen los animales. Sin embargo, como ocurre para la mayoría de los modelos IBD de enfermedad espontánea, los ratones IL10 $^{-/-}$  en una instalación SPF desarrollan colitis con expresión variable solamente al cabo de varios meses. El modelo IBD se mejoró para hacerlo más útil para experimentación. Se encontró que la alimentación de ratones IL10 $^{-/-}$  de 5 semanas con NSAID (piroxicam) durante dos semanas induce colitis Th1 severa que persiste indefinidamente incluso después de interrumpir la administración del fármaco. La inflamación es altamente predecible de ratón a ratón, implicando el colon y TI con severidad uniforme (Fig. 16). Los ratones WT no desarrollan colitis con tratamiento de piroxicam.

45 Se encontró que la colonización de ratones IL10 $^{-/-}$  con *H. polygyrus* resuelve la colitis establecida previamente (Fig. 17). Ratones C57BL/6 IL10 $^{-/-}$  de 5 semanas recibieron piroxicam (80 mg/250 g de alimentación). Después de dos semanas, se interrumpió el piroxicam. En este momento, todos los ratones sufrían colitis. Dos días después de la interrupción del piroxicam, algunos ratones se colonizaron con 200 *H. polygyrus* por sonda gástrica, mientras que otros se trataron falsamente. Después de dos semanas de colonización, el registro de colitis descendió desde 3,6  $\pm$  0,4 (SE) en los controles a 0,55  $\pm$  0,5 en los ratones colonizados (p = 0,001).

La curación de la colitis establecida por *H. polygyrus* está asociada con cambios en la producción de citoquinas LPMC.

55 Las LPMC aisladas de ratones naif (sin piroxicam) o colíticos falsamente liberan cantidades copiosas de IFN $\gamma$  después de estimulación con anti-CD3/anti-CD28 (Fig. 18) e IL12 después de estimulación con oligonucleótido CpG



(0,6 µg #1826/ml). Los LPMC de los ratones IL10<sup>-/-</sup> tratados con piroxicam y colonizados con *H. polygyrus* producen poco a nada de IFNγ detectable por ELISA sensible (30 pg/ml) y dan lugar a una liberación de IL12 (Fig. 18). Las LPMC de ratones IL10<sup>-/-</sup> naif o colícticas no producen cantidad alguna de IL4 y una pequeña cantidad de IL13 (Fig. 19). En contraste, las LPMC de ratones colonizados con *H. polygyrus* producen cierta cantidad de IL4 y cantidades abundantes de IL13. La colonización helmíntica invierte la inflamación del colon, pero el perfil de citoquinas LPMC no vuelve simplemente al de los ratones IL10<sup>-/-</sup> naif. En lugar de ello, *la colonización da como resultado un nuevo perfil de citoquinas asociado con la curación de la colitis.*

La colonización de *H. polygyrus* activa los circuitos reguladores en LPMC de los ratones IL10<sup>-/-</sup>. La mezcla de LPMC productoras de IFNγ de los ratones IL10<sup>-/-</sup> colícticas con LPMC de ratones colonizados con *H. polygyrus* da como resultado co-cultivo, con producción inhibida de IFNγ.

*H. polygyrus* reside en el duodeno, pero inicia circuitos reguladores que invierten la colitis y alteran los perfiles de citoquinas LPMC distantes. Se demostró que la colonización de helmintos induce o activa las células reguladoras circulantes que residen en el compartimiento de las células T MLN de los ratones colonizados por *H. polygyrus*. La transferencia de 20 x 10<sup>6</sup> células MLN o 5 x 10<sup>6</sup> células T MLN de ratones IL10<sup>-/-</sup> colonizados con *H. polygyrus* a animales con colitis IL10<sup>-/-</sup> establecida da como resultado la resolución de la inflamación (Fig. 20).

Scurfina es un factor de transcripción, codificado por el gen *foxp3*, importante para el desarrollo o la actividad de las células T reguladoras. Los transcritos de *foxp3* están incrementados en MLN de los ratones colonizados con *H. polygyrus* comparados con los ratones IL10<sup>-/-</sup> exentos de gusanos como se cuantifica por RT-PCR en tiempo real (Fig. 21). Cada disminución en el umbral del ciclo PCR es equivalente a un contenido duplicado de *Foxp3* normalizado para mRNA de HPRT. La colonización helmíntica da como resultado una expresión de *Foxp3* incrementada de 3 a 5 veces en las células MLN. *Foxp3* está aumentado también (3 veces) en LPMC de ratones IL10<sup>-/-</sup> colonizados con *H. polygyrus*, comparado con los controles exentos de gusanos. Únicamente se sabe que las células T reguladoras expresan *Foxp3* (Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science. 299:1057-1061). *The increase in Foxp3 expression in MLN and LPMC supports the hypothesis that helminths induce regulatory T cells that orchestrate resolution of established colitis.*

Otros transcritos para factores inmunorreguladores se alteran por colonización con *H. polygyrus*. *Smad7* es un factor de transcripción que bloquea la señalización de TGFβ. La colonización con *H. polygyrus* reduce la expresión de *Smad7* en las células MLN 4,5 veces, como se mide por TR-PCR en tiempo real (Fig. 22). Los transcritos de *Smad7* están reducidos también en LPMC. Una disminución en *Smad7* podría permitir que las células fuesen más sensibles al TGFβ inmunorregulador. Adicionalmente, la disminución en la expresión de *Smad7* muestra que mecanismos reguladores múltiples están funcionando análogamente para resolver la colitis IL10<sup>-/-</sup>.

Los cebadores y la sonda para *Smad7* son TCCTGCTGTGCAAAGTGTTTC (SEQ ID NO. 4), GAGTAAGGAGGAGGGGAGA (SEQ ID NO. 5), y FAM-TTGATCTTCCCGTAAGATTCACAGCAACA-TAMRA (SEQ ID NO. 6). La expresión de mRNA de *Foxp3* y *Smad7* se normaliza para la de HPRT. Los iniciadores y la sonda para HPRT son TGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (SEQ ID NO. 7), GCAAGCTTGCAACCTTAACCAT (SEQ ID NO. 8), y TET-TGCTTTCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCC-TAMRA (SEQ ID NO. 9).

### **OTRAS REALIZACIONES**

Los ejemplos que anteceden demuestran experimentos realizados y contemplados por los presentes inventores en la preparación y realización de la invención. Se cree que estos ejemplos incluyen una descripción de las técnicas que sirven tanto para comunicar la técnica de la práctica de la invención como para demostrar su utilidad.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> University of Iowa

<120> Método de cribado de preparaciones de parásitos para la eficacia en la prevención y control de enfermedades

10 <130> 27045/2039EP

<140> No asignada aún

<141> No presentada aún

15 <150> 10/715,659

<151> 17-Noviembre-2003

<160> 9

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido sintético

30 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(42)

<223> oligonucleótido sintético

35 <400> 1

cccaggaag acagcaacct ttctcaca ccaggccact tg 42

<210> 2

<211> 28

40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

45 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(28)

<223> oligonucleótido sintético

50 <400> 2

atcctacca ctgctggcaa atggagtc 28

<210> 3

55 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> oligonucleótido sintético

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(20)

	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 3 tccatgacgt tctgacgtt	20
	<210> 4 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(20) <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 4 20 tcctgctgtg caaagtgtc	20
	<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(20) <223> oligonucleótido sintético	
35	<400> 5 gagtaaggag gagggggaga	20
	<210> 6 <211> 29 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(29) <223> oligonucleótido sintético	
50	<400> 6 ttgatctcc cgtaagattc acagcaaca	29
	<210> 7 <211> 28 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> característica miscelánea <222> (1)..(28) <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 7 tgaagagcta ctgtaatgat cagtcaac	28
5	<210> 8 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <221> característica miscelánea	
15	<222> (1)..(22) <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 8 gcaagcttgc aaccttaacc at	22
20	<210> 9 <211> 28 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> característica miscelánea	
30	<222> (1)..(28) <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 9 tgctttccct ggtaagcag tacagccc	28

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de cribado *in vitro* de una preparación de parásitos helmínticos que altera el nivel de una actividad de las células T reguladoras humanas, comprendiendo dicho método los pasos de:
- (a) obtener una preparación de parásitos helmínticos;
- 5 (b) poner en contacto dicha preparación de parásitos helmínticos con un sistema humano *in vitro* que contiene células T reguladoras; y
- (c) determinar el nivel de un marcador interno para la actividad de las células T reguladoras en dicha diana después de dicho contacto, en donde dicho marcador interno es el factor de transcripción FOXP3 (Scurfina);
- 10 en donde un cambio en dicho nivel de dicho marcador interno después de dicho contacto es indicativo de que dicha preparación de parásitos helmínticos altera una actividad de las células T reguladoras.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel de dicho factor de transcripción se mide en su nivel de proteínas o de mRNA.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha actividad mediada por las células T reguladoras se encuentra en las células mononucleares de la lámina propia de dicho sistema.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha actividad mediada por las células T reguladoras se encuentra en los nódulos linfáticos mesentéricos de dicho sistema.
5. Un método para monitorizar la eficacia del tratamiento de una preparación de parásitos helmínticos para una enfermedad autoinmune o alérgica en un modelo animal no humano que comprende:
- 20 (i) administrar una composición que comprende una preparación de parásitos helmínticos o una fracción de la misma a dicho modelo animal no humano; y
- (ii) determinar el nivel de un marcador interno para la actividad de las células T reguladoras en dicho modelo animal no humano después de dicha administración, en donde dicho marcador interno es el factor de transcripción FOXP3 (Scurfina);
- 25 en donde un aumento en dicho nivel de dicho marcador interno después de dicha administración es indicativo de la eficacia de tratamiento de dicha preparación de parásitos helmínticos.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho nivel de dicho factor de transcripción se mide en su nivel de proteína o de mRNA.
7. El método de la reivindicación 5, en donde dicho nivel de dicho marcador se encuentra en las células mononucleares de la lámina propia de dicho modelo.
- 30 8. El método de la reivindicación 5, en donde dicho nivel de dicho marcador se encuentra en los nódulos linfáticos mesentéricos de dicho modelo.

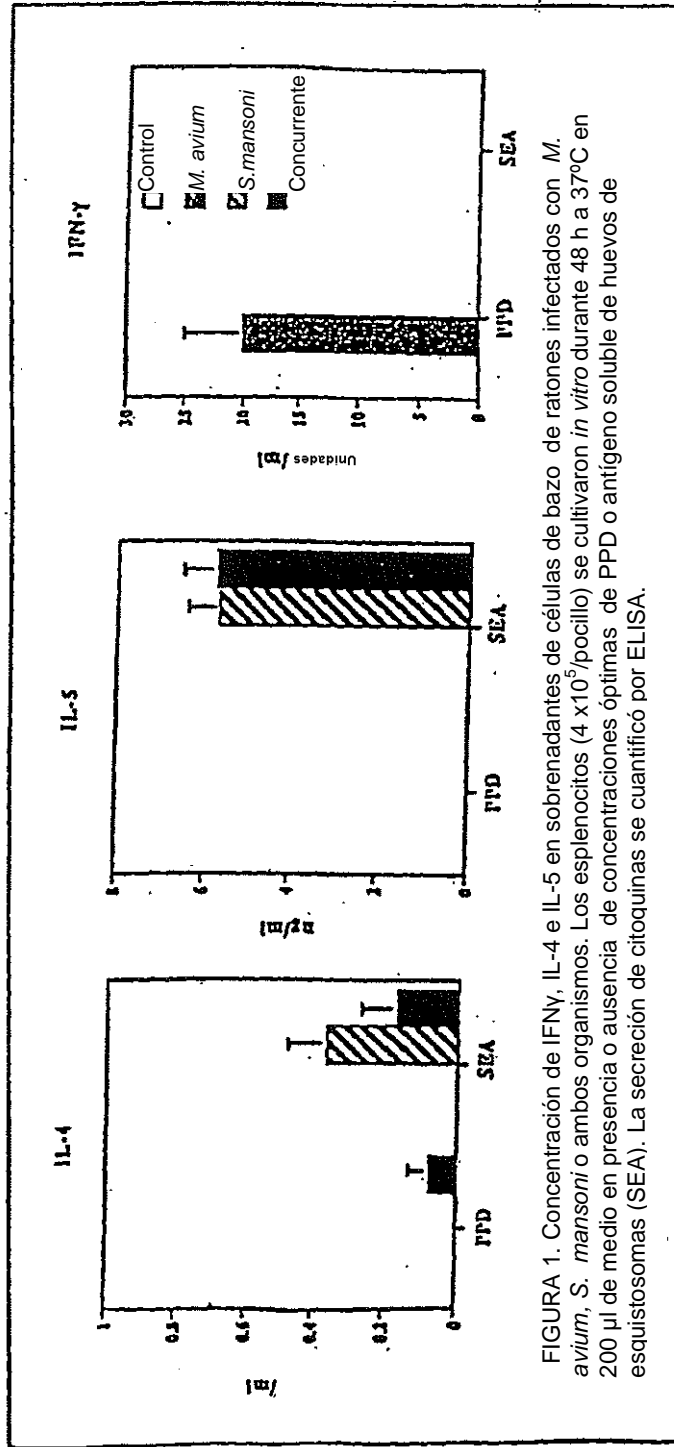


FIGURA 1. Concentración de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-5 en sobrenadantes de células de bazo de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos organismos. Los esplenocitos ( $4 \times 10^5$ /pocillo) se cultivaron *in vitro* durante 48 h a 37°C en 200  $\mu$ l de medio en presencia o ausencia de concentraciones óptimas de PPD o antígeno soluble de huevos de esquistosomas (SEA). La secreción de citoquinas se cuantificó por ELISA.

Figura 1

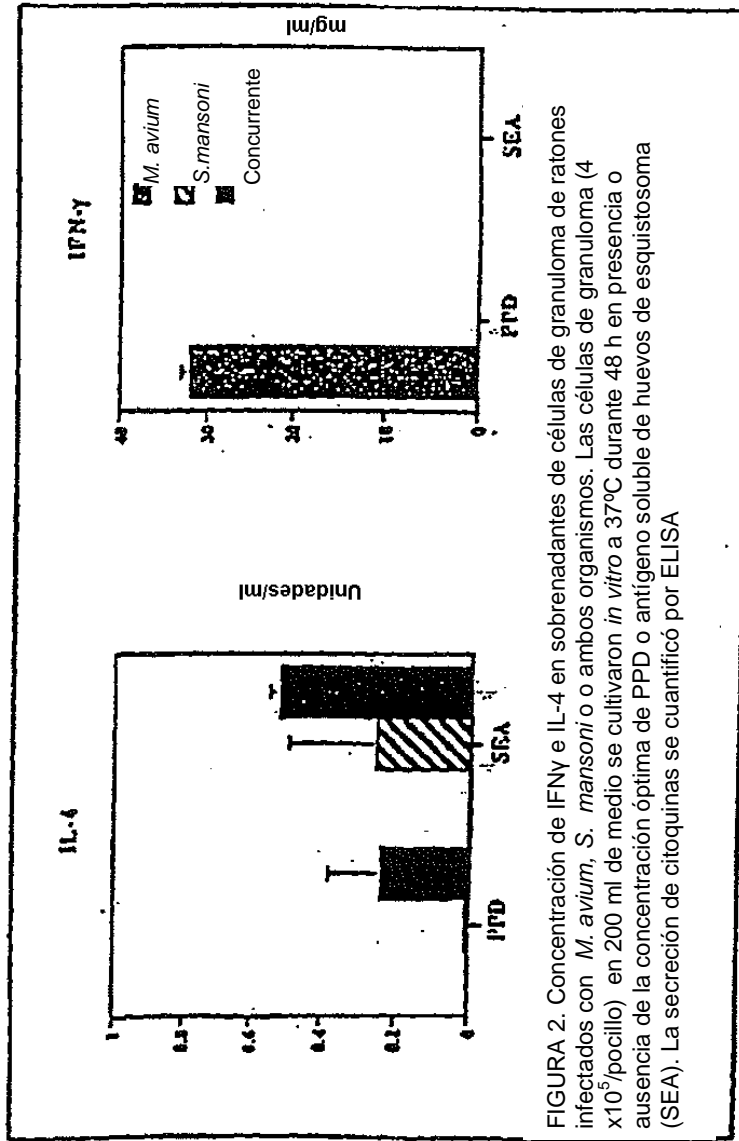


FIGURA 2. Concentración de IFN-γ e IL-4 en sobrenadantes de células de granuloma de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos organismos. Las células de granuloma ( $4 \times 10^5$ /pocillo) en 200 ml de medio se cultivaron *in vitro* a 37°C durante 48 h en presencia o ausencia de la concentración óptima de PPD o antígeno soluble de huevos de esquistosoma (SEA). La secreción de citoquinas se cuantificó por ELISA

Figura 2

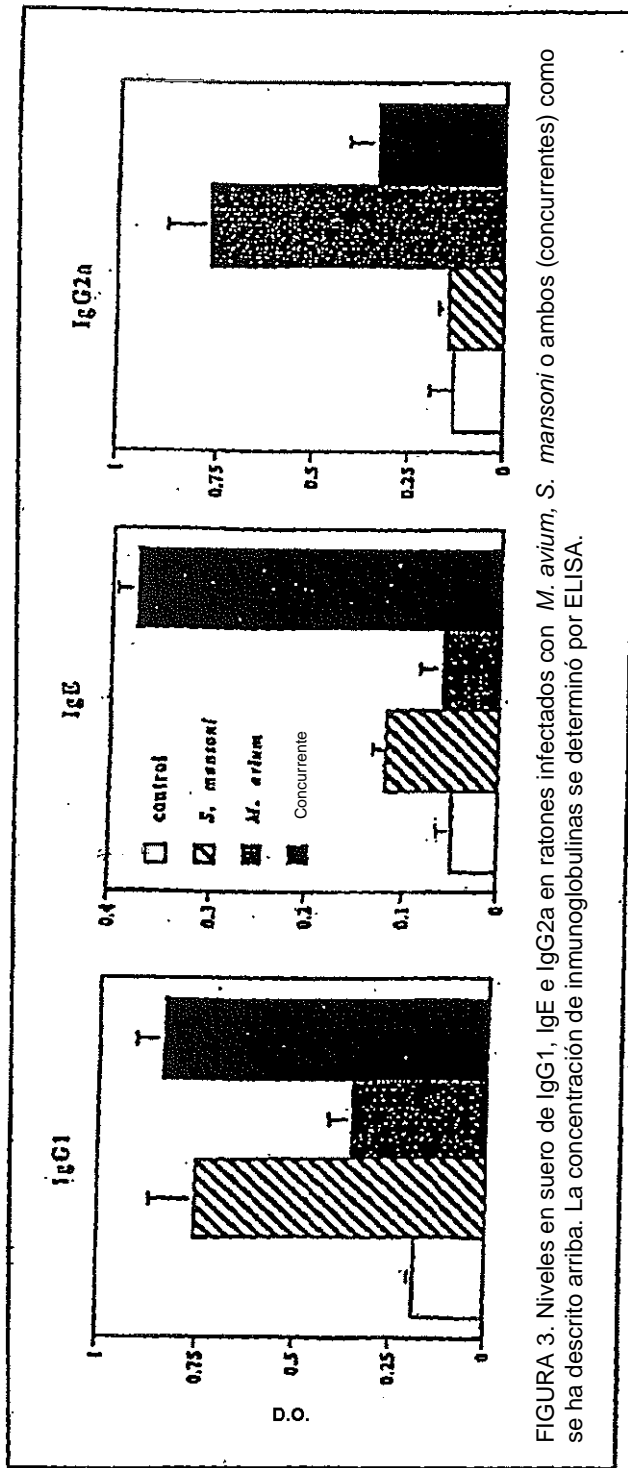


FIGURA 3. Niveles en suero de IgG1, IgE e IgG2a en ratonulas infectadas con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos (concurrentes) como se ha descrito arriba. La concentración de inmunoglobulinas se determinó por ELISA.

Figura 3



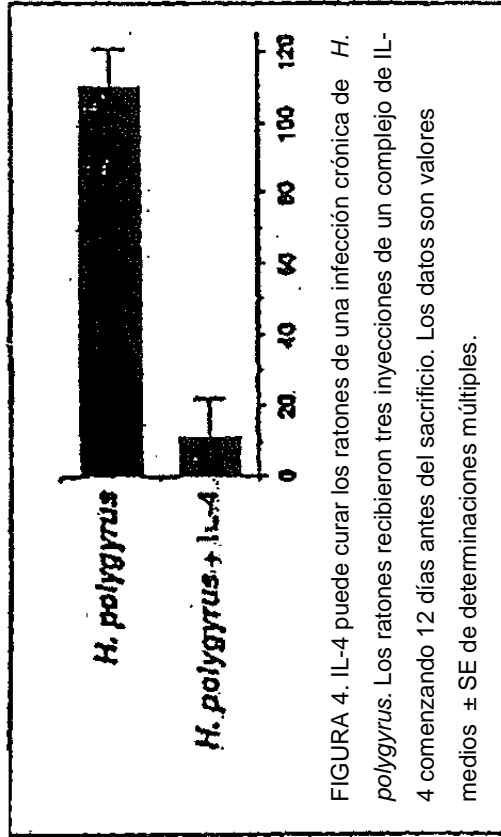
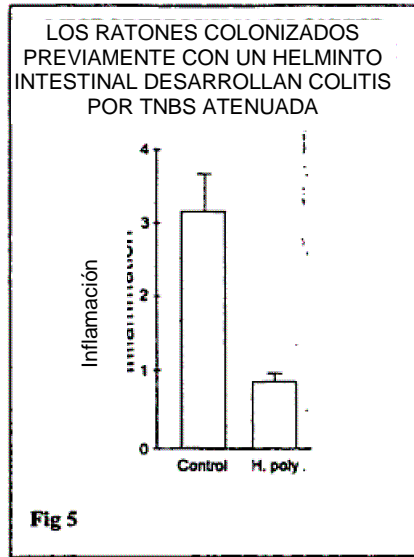
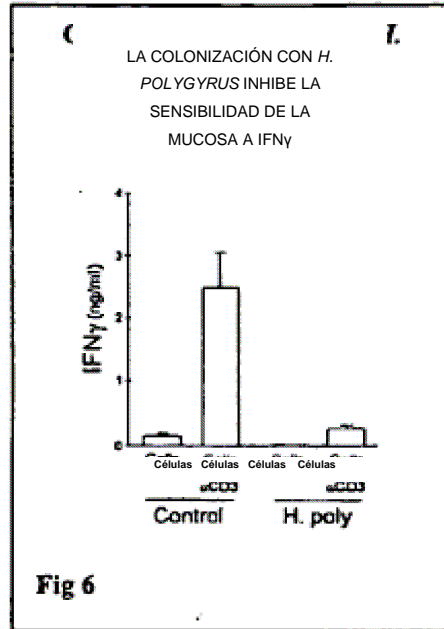
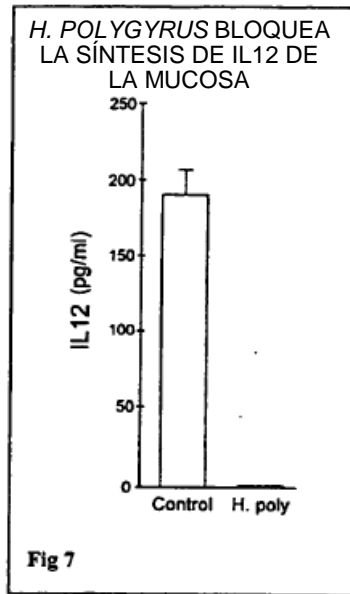


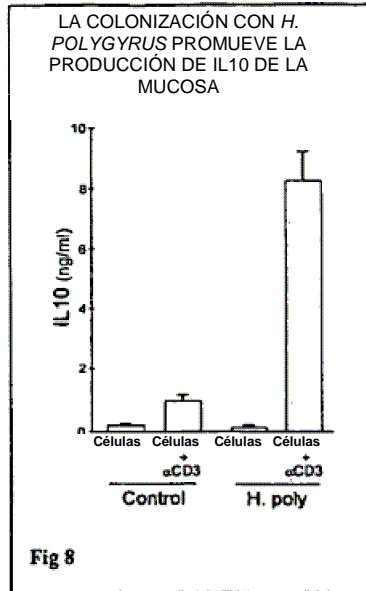
FIGURA 4. IL-4 puede curar los ratones de una infección crónica de *H. polygyrus*. Los ratones recibieron tres inyecciones de un complejo de IL-4 comenzando 12 días antes del sacrificio. Los datos son valores medios  $\pm$  SE de determinaciones múltiples.

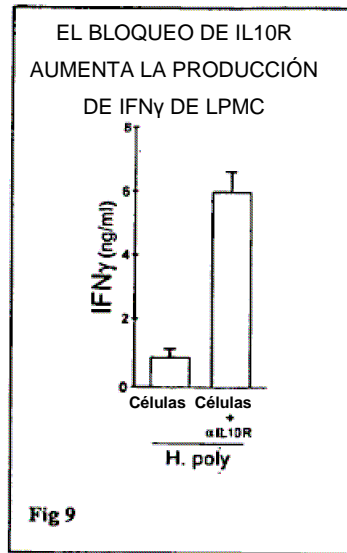
Figura 4

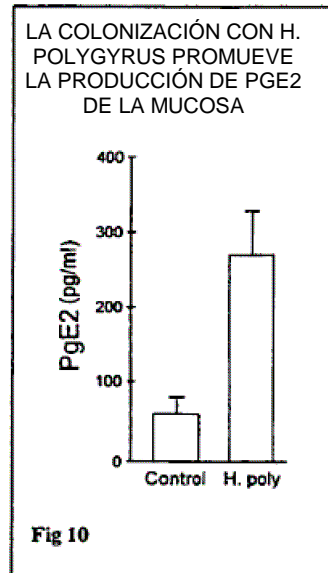


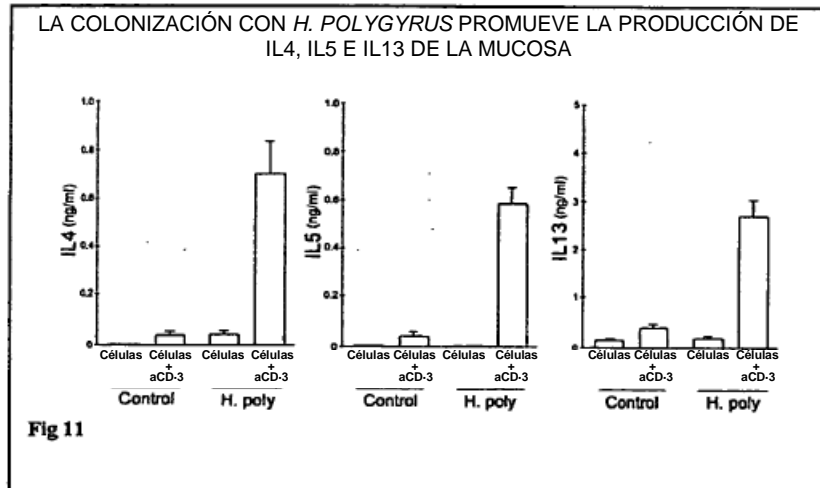




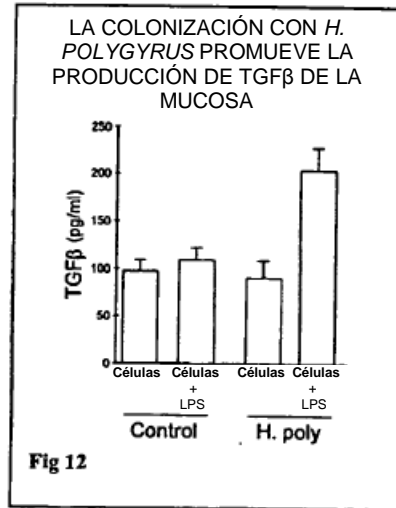


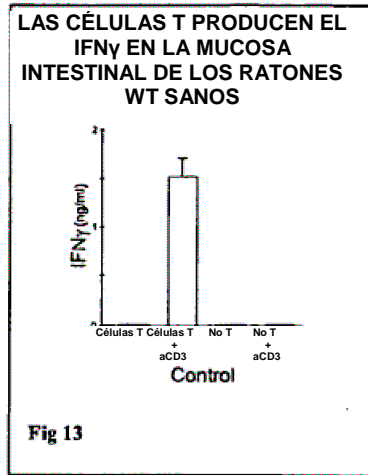


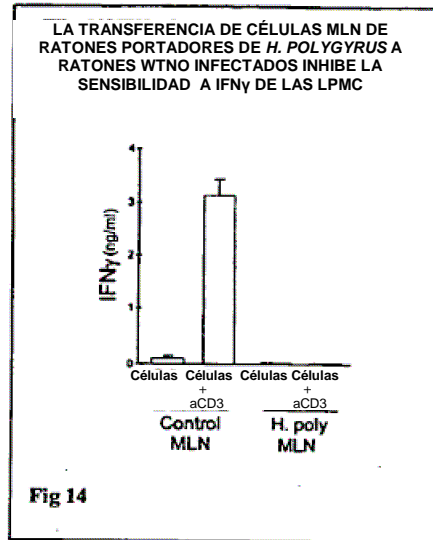




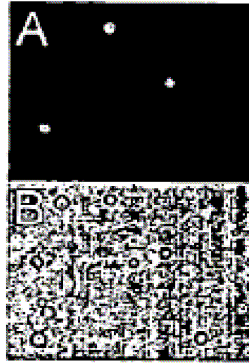




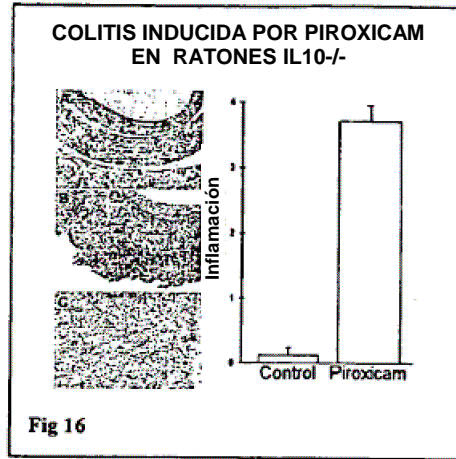


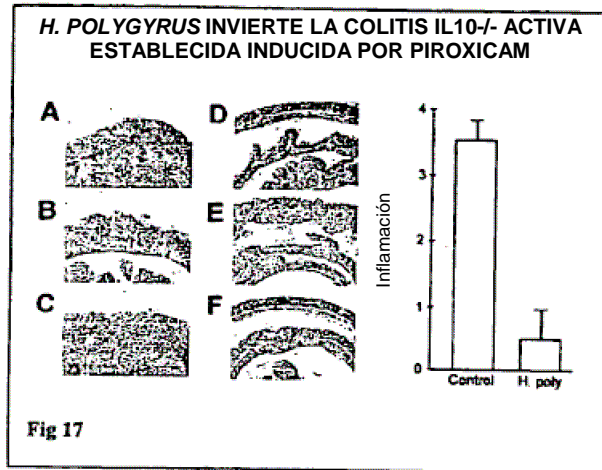


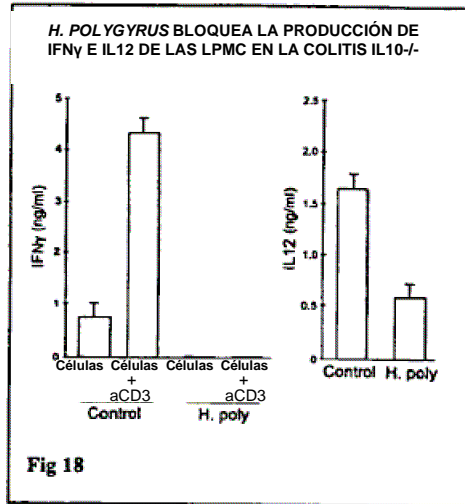
LAS CÉLULAS T MLN DE LOS RATONES PORTADORES  
DE *H. POLYGYRUS* PENETRAN EN LA MUCOSA  
INTESTINAL CUANDO SE TRANSFIEREN  
A RECEPTORES WT

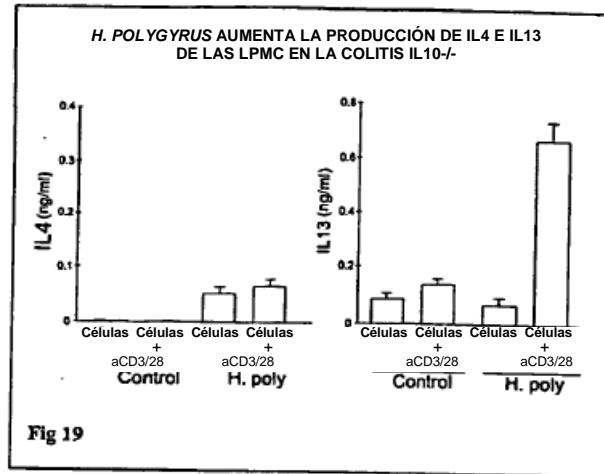


**Fig 15**

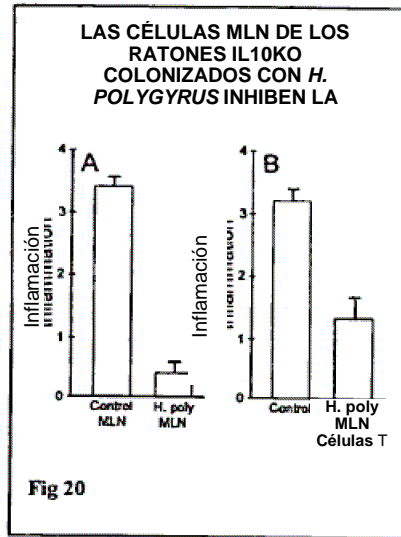


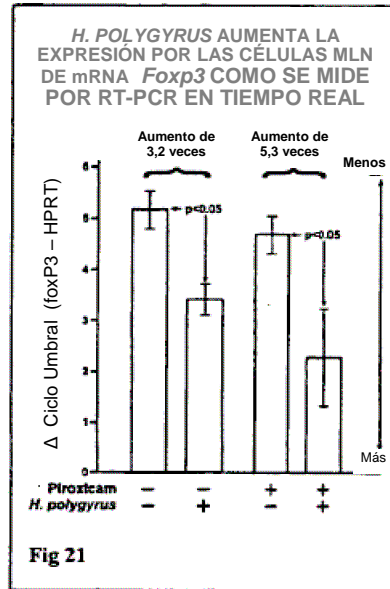


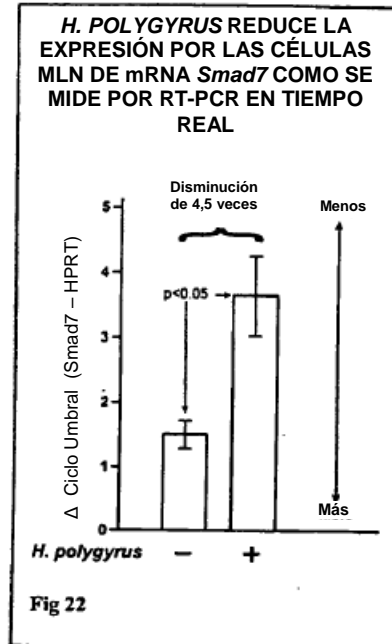












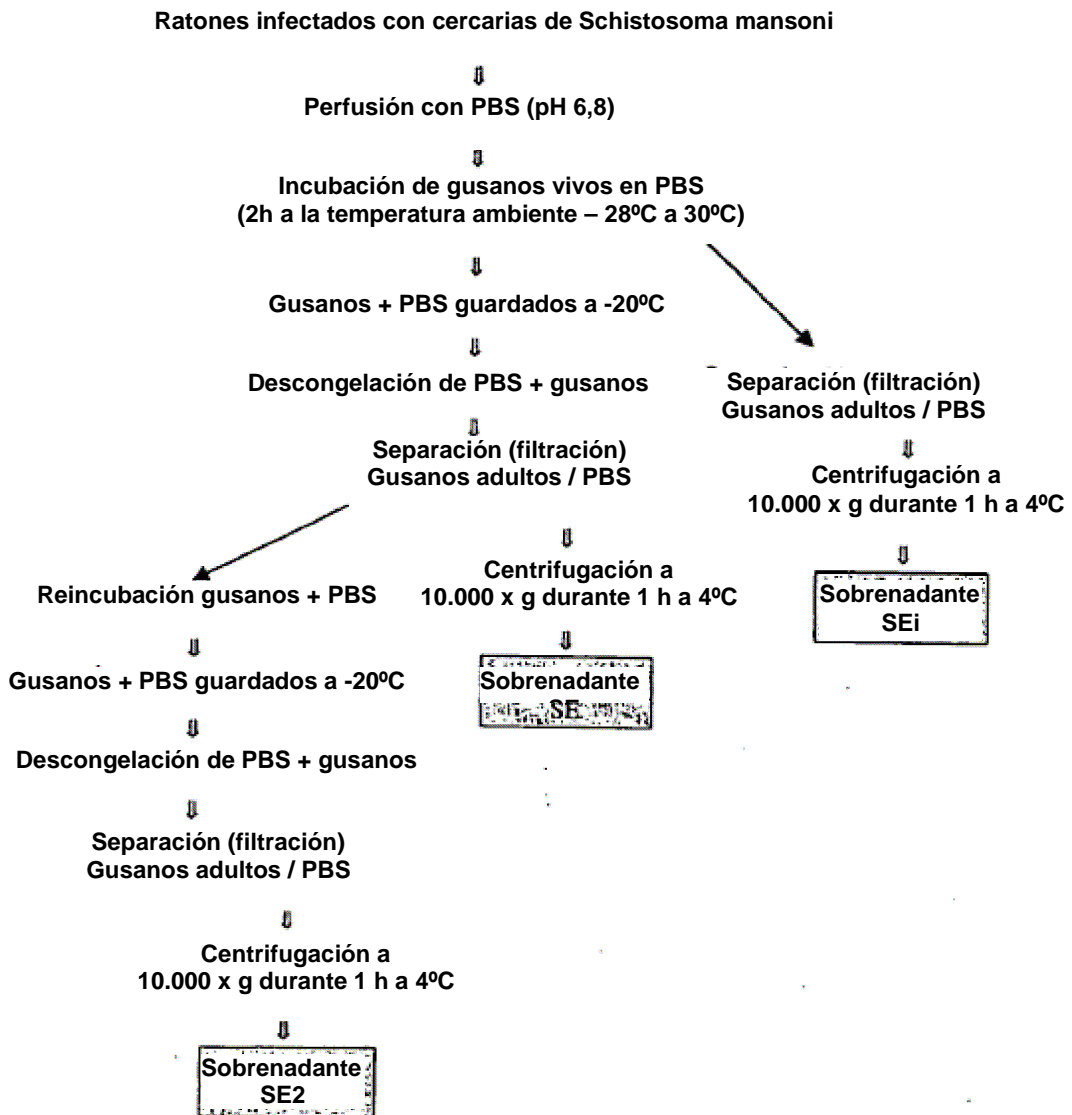


Fig. 23: Antígenos – Diagrama de procedimientos de extracción