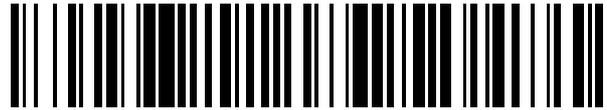


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 394**

51 Int. Cl.:

A61K 35/56 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.1998 E 06021312 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1749534**

54 Título: **Uso de agentes biológicos parasitarios para la prevención y el control de la enfermedad inflamatoria intestinal**

30 Prioridad:

31.12.1997 US 70147 P

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

20.11.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
OAKDALE RESEARCH CAMPUS 100 OAKDALE
CAMPUS NO. 214 TIC
IOWA CITY, IOWA 52242-5000, US**

72 Inventor/es:

**WEINSTOCK, JOEL y
ELLIOTT, DAVID E.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 430 394 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.

Uso de agentes biológicos parasitarios para la prevención y el control de la enfermedad inflamatoria intestinal

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la prevención y/o el tratamiento de una afección o enfermedad en un individuo resultante de una respuesta inmunitaria excesiva.

Antecedentes de la invención

10 Los parásitos son entidades vivas que habitan en otras criaturas durante alguna parte de sus ciclos vitales, extrayendo la nutrición del hospedante. Los parásitos que habitan en los intestinos tienen una interacción compleja con el sistema inmunitario de las mucosas. Pueden establecer una relación tranquila con las defensas mucosas para sobrevivir.

15 Los helmintos son parásitos multicelulares elaborados con ciclos vitales y desarrollos complejos. Los nemátodos (nematelmintos no segmentados) y los platelmintos son los dos grupos de helmintos que colonizan los intestinos humanos. Tal vez más de un tercio de la población mundial actualmente aloja uno o más de estos organismos. El índice de exposición de por vida, no obstante, es realmente mucho mayor. La prevalencia de los helmintos es la más alta en climas cálidos y en poblaciones sujetas a multitudes, mala higiene y suministro alimentario impuro. La enfermedad inflamatoria de los intestinos (IBD), la artritis reumatoidea y las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades excepcionales en estas mismas regiones.

20 Los nemátodos que frecuentemente habitan el intestino humano son *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (oxiuro), *Trichuris trichiura* (tricocéfalo), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (anquilostoma), y *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* infesta el intestino delgado en poco tiempo.

25 Los platelmintos incluyen tremátodos y céstodos. Los tremátodos adultos más frecuentes que residen en los intestinos humanos son las especies *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y *Heterophyes*. Aquellos que viven en el sistema biliar incluyen *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* y *felineus*, y *Fasciola hepatica*. El *Schistosoma* habita en el sistema venoso, pero varias especies afectan crónicamente el intestino por el pasaje de huevos a través de la pared intestinal. Los céstodos adultos que comúnmente infectan a seres humanos son las especies *Diphyllobothrium* (tenia de los peces), *Taenia saginata* (tenia de la carne vacuna), *Taenia solium* (tenia porcina) y *Hymenolepis nana* (tenia enana).

30 El hospedante adquiere diversas especies helmínticas a través del contacto con la suciedad, alimentos o agua contaminada con la forma infectiva del parásito. Los niños más frecuentemente alojan helmintosis debido a su contacto íntimo con suciedad y prácticas de higiene subóptimas. Los helmintos incitan una respuesta intestinal de Th2, que puede causar la expulsión del gusano o limitar la magnitud de la infección. La mayoría de los niños que viven en países no industrializados tienen estos parásitos. Muchas especies helmínticas sobreviven durante años dentro del intestino, el árbol biliar o las venas mesentéricas produciendo miles de huevos diarios. Por lo tanto, comenzando en la infancia, estos parásitos y/o sus huevos liberan moléculas que bañan la superficie mucosa del
35 intestino durante años, incitando la inflamación de tipo Th2. La desregulación del sistema inmunitario que conduce a una respuesta de Th1 excesiva puede causar varias enfermedades humanas.

Algunas enfermedades debidas a respuestas de Th1 dominantes incluyen IBD, artritis reumatoidea, sarcoidosis, esclerosis múltiple y diabetes mellitus insulino-dependiente.

40 La IBD es más frecuente en climas templados. Se desconoce qué causa las diferencias geográficas. Las observaciones indican una exposición ambiental exclusiva de países templados, y que las sociedades altamente industrializadas están predispuestas al desarrollo de IBD. Una explicación alternativa es que no resulta saludable criarse en un ambiente "excesivamente limpio". Se propone aquí que el factor ambiental principal que predispone a la IBD es una menor exposición durante la infancia a helmintos intestinales, que promueven la inflamación de tipo Th2.

45 La frecuencia de CD ha aumentado en gran medida en los últimos 40 años. Su mayor prevalencia tiene lugar en regiones templadas que están altamente industrializadas. Esto parece indicar que existe algún factor ambiental crítico para el cambio en la frecuencia. Además, la colitis ulcerosa es poco frecuente en los países en vías de desarrollo. Se propone de acuerdo con la invención que la ausencia de exposición a helmintosis intestinales en la infancia es un factor ambiental importante que favorece el desarrollo de CD y tal vez de colitis ulcerosa (UC).

50 Las personas de países industrializados viven en ambientes cada vez más higiénicos y adquieren helmintos cada vez con menor frecuencia. La reducción en la frecuencia de las helmintosis parece estar correlacionada con la prevalencia cada vez mayor de CD. Un caso puntual es el remarcado incremento en la frecuencia de CD en asiáticos y africanos jóvenes que residen en Israel por más de 10 años. Además, la frecuencia de la infestación

helmíntica difiere entre israelíes judíos y árabes. En 1969, los exámenes de heces de pacientes hospitalizados en el este de Jerusalén predominante de árabes contenían huevos helmínticos más del 60% de las veces. La frecuencia en el este de Jerusalén predominante de israelíes fue del 10% o menos.

5 Por ende, es posible que al no adquirir helmintos y experimentar la condición Th2 mucosal se predisponga a CD y UC. Existe la necesidad de combatir CD y UC mediante re-colonización del tubo digestivo con estos organismos que pueden proporcionar protección.

Un objeto de la invención es prevenir o tratar IBD en un individuo.

10 Es un objeto de la presente invención dar a conocer una composición farmacéutica que comprende un parásito helmíntico preparado a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la prevención y/o el tratamiento de IBD.

Es otro objeto de la presente invención dar a conocer una preparación de parásitos helmínticos libre de patógenos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la prevención y/o el tratamiento de IBD.

15 El documento WO 96/29082 describe el uso de una preparación de parásitos que consiste en *T muris* y *T suis*, en el tratamiento de rechazo de aloinjertos en un paciente, particularmente supervivencia a aloinjerto de riñón (resumen). El documento W093/23063 describe una composición que comprende el factor inhibidor de neutrófilos en el tratamiento de respuestas inflamatorias no deseadas (resumen). Este factor se aísla de anquilostomas (*hookworms*), que son dos formas de anquilostoma duodenal y *Necator americanus*.

Compendio de la invención

20 Esta invención presenta el uso de una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* en un método para prevenir o tratar IBD en un individuo, administrando una cantidad eficaz de una preparación de parásitos helmínticos para reducir la respuesta inmunitaria excesiva en el individuo.

25 La invención abarca el uso de una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* en un método para tratar la respuesta inmunitaria excesiva en IBD, lo que incluye una respuesta de Th1 aberrante/potenciada, que comprende administrar una preparación de parásitos helmínticos en una cantidad suficiente para reducir reduce la respuesta inmunitaria excesiva.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "preparación de parásitos helmínticos" se refiere a uno cualquiera de un parásito entero, un extracto de parásitos, huevos de parásitos, extracto de huevos de parásitos, larvas de parásitos, extracto de larvas de parásitos, cercarias de parásitos y extracto de cercarias de parásitos.

30 Los parásitos helmínticos se seleccionan del grupo que consiste en *Trichuris muris* y *Trichuris suis*.

La invención abarca prevenir o tratar IBD en un individuo, lo cual comprende administrar una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* en una cantidad suficiente para prevenir o tratar IBD en un individuo.

35 La cantidad de "dosis eficaz" de la preparación de parásitos helmínticos depende de la causa específica de la respuesta inmunitaria excesiva o aberrante, y se hace referencia detallada a esto en lo sucesivo.

40 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión respuesta inmunitaria "excesiva" o "aberrante" se refiere a una respuesta del linfocito T cooperador de tipo 1 (Th1) en donde la actividad de los linfocitos T cooperadores 1 se eleva en un individuo en relación a la actividad de dichos linfocitos en un individuo que no se encuentra afectado por la enfermedad. Típicamente, la elevación de la respuesta de Th1 en el individuo enfermo será de por lo menos el doble, y posiblemente de 5 veces, 10 veces más que la respuesta de Th1 en un individuo que no padece la enfermedad. Las inflamaciones con Th1 producen grandes cantidades de IFN- γ y TNF α , que a su vez estimulan una fuerte reacción inmunitaria celular. Éstas son algunas de las citocinas que se pueden medir para inducir una respuesta de Th1 excesiva o aberrante, como se describe en detalle a continuación.

45 Preferiblemente, el parásito helmíntico se selecciona del grupo que consiste en extracto de parásitos, huevos de parásitos, extracto de huevos de parásito, larvas de parásitos, extracto de larvas de parásitos, cercarias y extracto de cercarias.

La invención también abarca el uso de una preparación de parásitos helmínticos para tratar IBD, que comprende administrar una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* en una cantidad suficiente para reducir IBD.

Otras características y ventajas de la invención se describirán en más detalle en la siguiente descripción de las realizaciones y sus dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

5 Figura 1. La figura describe las concentraciones de IFN γ , IL-4 y IL-5 medidas en sobrenadantes de células del bazo de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos organismos. Se cultivaron esplenocitos (4×10^5 /pocillo) *in vitro* durante 48 h a 37° C en 200 μ l de medio en presencia o ausencia de concentraciones óptimas de PPD o SEA. La segregación de citocinas se cuantificó por ELISA.

10 Figura 2. La figura describe las concentraciones 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 (4×10^5 /pocillo) en 200 μ l de medio se cultivaron *in vitro* a 37° C durante 48 h en presencia o ausencia de la concentración óptima de PPD o SEA. Las citocinas se cuantificaron por ELISA.

Figura 3. La figura describe los niveles de IgG1, IgE y IgG2a en suero de ratones infectados con *M. avium*, *S. mansoni* o ambos (concurrentes). La concentración de inmunoglobulina se determinó por ELISA.

15 Figura 4. La figura indica que el tratamiento con IL-4 puede curar a ratones con una infección crónica por *H. polygyrus*. Los ratones recibieron tres inyecciones de un complejo de IL-4 comenzando 12 días antes de ser sacrificados. Los datos son los errores estándar de la media de múltiples determinaciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el reconocimiento de que las enfermedades que implican respuestas inmunitarias de Th1 excesivas o aberrantes son tratables por administración de una preparación de parásitos helmínticos.

20 La invención se refiere al uso de una preparación de parásitos helmínticos en un método para tratar una respuesta inmunitaria excesiva que incluye una respuesta inmunitaria de Th1 aberrante/potenciada, administrando una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir de *Trichuris suis* o *Trichuris muris* en una cantidad suficiente para reducir la respuesta inmunitaria excesiva en un individuo que padece IBD. La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, ambas conocidas como IBD.

25 Parásitos helmínticos útiles

En la definición de un parásito helmíntico, existen dos grupos. El primer grupo consiste en los parásitos helmínticos que colonizan naturalmente seres humanos y el segundo grupo consiste en parásitos helmínticos que colonizan animales, pero pueden producir protección para seres humanos.

30 En el primer grupo, los parásitos helmínticos son gusanos multicelulares elaborados con ciclos vitales y desarrollo complejos. Los nemátodos (nematelmintos no segmentados) y los platelmintos (*flat worms*) son dos grupos de helmintos que colonizan en los intestinos humanos. Cualquiera de un número de helmintos que colonizan naturalmente en seres humanos o animales proporcionará los resultados que se tienen como fin.

35 Los nemátodos que frecuentemente habitan el intestino humano son *lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (oxiuro), *Trichuris trichiura* (tricocéfalo), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (anquilostomas), y *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* infesta el intestino delgado en poco tiempo.

40 Los platelmintos incluyen los tremátodos y los céstodos. Los tremátodos adultos más frecuentes que residen en los intestinos humanos son las especies *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y *Heterophyes*. Aquellos que viven en el sistema biliar incluyen *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* y *felineus*, y *Fasciola hepatica*. *Schistosoma* habita en el sistema venoso, pero varias especies afectan crónicamente el intestino mediante el pasaje de huevos a través de la pared intestinal. Los céstodos adultos que comúnmente infectan a seres humanos son las especies *Diphyllobothrium* (tenia de los peces), *Taenia saginata* (tenia de la carne vacuna), *Taenia solium* (tenia porcina) y *Hymenolepis nana* (tenia enana).

Otros helmintos de interés incluyen los parásitos filariales y los *Paragonimus westermani*. Éstos no tienen una fase intestinal, pero estimulan fuertes respuestas de tipo Th2.

45 Los parásitos helmínticos que colonizan en animales, pero que pueden producir mucha protección a seres humanos contra enfermedades mediadas por Th1, incluyen *Trichuris Muris* (tricocéfalo de ratón), *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Hymenolepis nana*, todos helmintos intestinales que infectan a ratones. Además, *Angiostrongylus* es un helminto de rata. *Trichuris suis* y *Ascaris suum* son helmintos de cerdo que pueden infectar a seres humanos. Las especies *Trichuris vulpis*, *Toxocara*, *Gnathostoma* y *Ancylostoma* son helmintos de perro y de gato que también pueden infectar a seres humanos. *Anisakis* y *Pseudoterranova* son nemátodos de mamíferos marinos que pueden transmitirse a seres humanos. Los esquistosomas de aves pueden

50

infectar transitoriamente a seres humanos. Dichos esquistosomas incluyen *S. douthitti*, *Trichobilharzia ocellata*, *T. stagnicolae*, *T. physellae* y *Gigantobilharzia huronensis*.

Enfermedades tratables

A. Enfermedades inflamatorias de los intestinos (CD y UC):

5 Los datos epidemiológicos indican una susceptibilidad genética al desarrollo de enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC). La incidencia de CD en sociedades industrializadas ha aumentado desde los años cincuenta hasta mediados de los años ochenta, y ahora está entre 1 y 8 cada 100.000 personas por año. Esto indica que cambios desconocidos en nuestro entorno han afectado la frecuencia de CD.

10 Si bien la causa de las IBD sigue sin determinarse, se supone que provienen de la desregulación del sistema inmunitario de las mucosas intestinales. Las células inflamatorias en la mucosa normalmente nos protegen de contenidos lumenales. Esta inflamación crónica altamente efectiva se controla estrictamente para limitar lesiones a los tejidos. Las IBD pueden ser resultado de respuestas inmunitarias inoportunamente vigorosas a factores lumenales. La CD parece ser una inflamación vigorosa de tipo Th1 excesiva que produce IFN- γ y TNF α . La naturaleza de la UC está incluso menos definida.

15 Existen varios modelos animales de inflamación intestinal crónica, por ejemplo, como lo describen Elliott et al. (Elliott et al., 1998, *Inflammatory Bowel Disease and Celiac Disease*, en: *The Autoimmune Diseases*, tercera edición., 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 eliminaciones de genes genéticamente modificados pueden desarrollar inflamación intestinal crónica similar a IBD, véase Elson et al., 1995, *Gastroenterology* 109:1344. Éstos incluyen ratones mutantes que portan eliminaciones direccionadas hacia IL-2, IL-10, MHC clase II o genes TCR entre otros. El uso de algunos de estos 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 ha demostrado que un sistema inmunitario desregulado por sí mismo puede mediar la lesión intestinal. La inflamación mucosal de varios de estos modelos genera grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α indicando que la producción excesiva de citocinas de tipo Th1 es un mecanismo común que subyace en la patogénesis de la enfermedad. A su vez, el bloqueo de los circuitos de Th1 previene la inflamación. La CD es una respuesta de Th1. Por lo tanto, estos modelos pueden tener implicancias directas en cuanto a la inmunopatología del proceso de esta enfermedad humana.

B. Artritis reumatoidea (RA):

30 La RA es una enfermedad crónica que se caracteriza por sinovitis inflamatoria persistente, que por lo general compromete las articulaciones periféricas en una distribución simétrica. Esta inflamación puede conducir a erosiones óseas, daño a los cartílagos y destrucción articular. Es una afección de aproximadamente 1% de la población. La prevalencia aumenta con la edad, y las mujeres se ven afectadas con mayor frecuencia que los hombres. La propagación de RA es un evento mediado inmunológicamente por las células CD4+ Th1.

C. Diabetes mellitus juvenil, insulino-dependiente (DM) (tipo 1):

35 La DM de tipo 1 es una enfermedad que usualmente comienza durante los primeros años de la adultez y que es resultado de la incapacidad de producir insulina en respuesta al aumento de glucosa en la sangre. Esta hiperglucemia persistente y la incapacidad de metabolizar la glucosa correctamente causan alteraciones metabólicas que eventualmente dañan los ojos, los riñones, el corazón y otros órganos. Recibir insulina por vía parenteral puede controlar parcialmente estos problemas metabólicos. La DM de tipo 1 es causada por un ataque autoinmunitario en las células beta pancreáticas, que son la fuente de insulina. Los macrófagos activados y las células T citotóxicas rodean y destruyen las células beta pancreáticas. La susceptibilidad genética y los eventos ambientales mal definidos desencadenan el proceso de enfermedad.

D. Lupus eritematoso (LE):

45 El LE es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que es más frecuente en mujeres en la mitad de la etapa adulta. El daño a los tejidos es causado por autoanticuerpos y células T reguladoras hiperactivas. La respuesta inmunitaria anormal permite la producción sostenida de anticuerpos patogénicos y complejos inmunitarios. Esto lleva a daño de los sistemas músculo-esquelético, cutáneo, hematológico, renal y otros. La respuesta inmunitaria anormal probablemente depende de la interacción de múltiples factores hereditarios y ambientales.

E. Sarcoidosis;

50 La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa crónica de los pulmones y otros órganos de causa desconocida. La mayoría de los pacientes tienen entre 20 y 40 años. El síntoma más frecuente es dificultad para respirar. La enfermedad es el resultado de una respuesta inmunitaria de Th1 exagerada, probablemente limitada a un número de antígenos. La sarcoidosis se desarrolla en todo el mundo y afecta a todas las razas. No obstante, hay una destacada

diversidad de la prevalencia de la sarcoidosis entre ciertos grupos étnicos y raciales. Por ejemplo, la enfermedad es rara en Polonia, el Sudeste Asiático e India.

F. Esclerosis múltiple (MS):

5 La MS es un trastorno inflamatorio multifocal crónico y recidivante del sistema nervioso central que conduce a la desmielinación focal y a la cicatrización del cerebro. Es una enfermedad frecuente que afecta a aproximadamente 330.000 estadounidenses y que comienza durante la primera etapa o en la mitad de la adultez.

La MS es una enfermedad autoinmunitaria mediada por lo menos en parte por células Th1. Las lesiones de la MS se asemejan a aquellas inducidas por respuestas de hipersensibilidad demorada que contienen células T activadas y macrófagos. Es una enfermedad de climas templados, que aumenta en prevalencia con distancia del Ecuador.

10 Preparaciones de parásitos helmínticos

A. Vacunas de organismos viables:

Los organismos de parásitos helmínticos viables pueden proveer el acondicionamiento mucosal de Th2 más profundo, debido a su longevidad relativa comparada con las vacunas de componentes.

15 Los organismos viables pueden administrarse o bien en formas de huevo, larva, cercaria o de larvas enquistadas, dependiendo del helminto. Se pueden utilizar helmintos que pueden colonizar en seres humanos y un animal preparatorio.

20 El animal preparatorio puede necesitar manipulación para permitir alta patencia por parte del helminto. Dicha manipulación puede incluir el tratamiento con agentes que son inmunosupresores como glucocorticoides o agentes de azatioprina; agentes que impiden los efectos de Th2 como los antihistamínicos, anti-citocinas o citocinas recombinantes; y agentes que influyen en la movilidad intestinal como los anti-colinérgicos u opiáceos. La dieta del animal se alterará para reducir el contenido de fibra gruesa. El animal puede ser una rata, cerdo, hámster, pájaro u otro animal preparatorio.

25 Los animales preparatorios se crían en entornos libres de patógenos específicos (SPF) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Se ensayan para asegurar la ausencia de bacterias y micobacterias humanas, y de patógenos víricos.

Huevos: algunos helmintos intestinales se adquieren por ingestión de huevos viables.

30 Los helmintos se mantienen en animales preparatorios SPF, por ejemplo, cerdos SPF. Para obtener los huevos, a los animales se les asigna una dieta especial baja en fibra gruesa. Los animales reciben un purgante oral para inducir la defecación. Se recogen las heces y se digieren enzimáticamente para liberar los huevos. Los huevos se aíslan de las heces licuadas por flotación en gradientes de densidad, filtración con tamices, Visser o elutriación centrífuga. La conservación de los huevos varía con el helminto utilizado. Los huevos de helmintos que son resistentes a desecación se secan, se mezclan con material inerte, se incorporan en una cápsula entérica y se refrigeran. Los huevos de helmintos que son susceptibles a desecación se conservan por refrigeración en medio líquido o añadiendo crioprotector y congelando en nitrógeno líquido. Los huevos viables se lavan, se mezclan con
35 budín libre de lactosa frío u otro vehículo en el sitio de administración. Los huevos conservados en crioprotector a base de glicerol pueden no requerir lavado. Los huevos de cada lote se ensayan para saber el índice de empollado a fin de determinar la dosis eficaz. Los huevos de cada lote se ensayan para determinar la ausencia de patógenos bacterianos y víricos.

40 Larvas: algunos helmintos (es decir, anquilostomas) requieren una fase de maduración en el suelo antes de colonizar en seres humanos. Los huevos de estos agentes se incubarán bajo condiciones óptimas para madurar el embrión, o empollar el huevo y proporcionar formas de larvas. Los pacientes pueden ser inoculados por inyección subcutánea de larvas viables.

45 Cercarias: algunos helmintos tienen ciclos vitales complejos que utilizan un hospedante intermedio. El hospedante intermedio imparte la forma capaz de colonizar en seres humanos. Las cercarias son la forma de los helmintos tremátodos impartidos por hospedantes intermedios como caracoles. Las cercarias se aíslan de caracoles colonizados en condiciones SPF. Las cercarias se lavan. Se pueden preservar añadiendo crioprotector y congelando en nitrógeno líquido. Las cercarias descongeladas o frescas se lavan e inyectan subcutáneamente para inocular a pacientes. Las muestras de cada lote se ensayan para determinar la ausencia de patógenos y para determinar la dosis eficaz.

50 Larvas enquistadas: algunos elmintos (p. ej., los acantocéfalos) forman larvas enquistadas o cisticercos en hospedantes intermedios. Es la forma de larva enquistada la que inicia la colonización humana. Las larvas enquistadas se extraen de los hospedantes intermedios, por ejemplo, ganado o peces o plantas que crecen en

condiciones SPF. Los quistes se lavan y se dejan libres de tejido de hospedante. Los quistes pueden conservarse añadiendo crioprotector y congelando en nitrógeno líquido. Los quistes se descongelan o se usan frescos, se lavan, se mezclan con budín libre de lactosa frío u otro vehículo en el sitio de administración y se alimentan a los sujetos. Las muestras de cada lote se ensayan para determinar la ausencia de patógenos y para determinar la dosis eficaz.

5 B. Vacunas de componentes no viables

Los componentes no viables de parásitos helmínticos proporcionan suficiente acondicionamiento de Th2 de la respuesta inmunitaria para prevenir la patología mediada por Th1. Los componentes no viables derivan de huevos, larvas o gusanos adultos.

10 Los huevos de esquistosomas intactos, no viables producen una fuerte respuesta de Th2. Los huevos se aíslan de hígados de animales preparatorios (es decir, hámsteres) que se desarrollan bajo condiciones SPF. Los huevos se aíslan por un método modificado de aquel originalmente descrito por Coker y Lichtenberg, 1956, Proceedings of the Soc. For Exp. Biol. & Med. 92:780. Las modificaciones consisten en usar disolución salina tamponada con fosfato con glucosa en lugar de 1,7% disolución salina para incubación y etapas de lavado junto con reducción del tiempo de digestión autolítico. Estos cambios promueven el aislamiento de huevos viables. El método es el siguiente.

15 Hámsteres dorados infectados con 1000 a 1500 cercarias. Se deja madurar la infección (6 a 7 semanas). Se extirpan los hígados de los animales y se disponen en 600 mOsm de disolución salina tamponada con fosfato estéril que contiene 5% de glucosa, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los hígados se dejan autodigerir durante 24 horas a temperatura ambiente.

20 Se homogenizan por pulsos los hígados a baja velocidad durante 3 minutos en un mezclador Waring frío. Se incuban el homogeneizado con colagenasa (2 mg/ml) y tripsina (2 mg/ml) a 32° C durante una hora. Se filtra el homogeneizado a través de tamices de mallas 50 y 80-100 para eliminar cúmulos de tejido y residuos. Se recuperan los huevos del filtrado pasando por un tamiz de malla 325. Los huevos no se pasan por el tamiz. Se lavan los huevos fuera del tamiz y se disponen en un tubo centrífugo de polipropileno de 50 ml. Se lavan los huevos por centrifugación a baja velocidad repetida (400 x g) en disolución salina tamponada con fosfato estéril con 5% de glucosa. Los
25 huevos deben estar libres de cualquier residuo colagenoso. Se cuenta una alícuota de huevos en una cámara Sedwick de 1 ml para determinar el número total de huevos.

Los huevos aislados se suspenden en disolución salina y se lavan congelados en nitrógeno líquido sin crioprotector. Esto extermina el huevo. Se inyectan huevos descongelados por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa, o en los sitios de inflamación de Th1 para producir fuertes respuestas de Th2. También se pueden utilizar huevos de
30 otros helmintos.

Las vacunas de componentes que emplean proteínas, lípidos o carbohidratos aisladas de huevos de parásitos pueden también utilizarse. Un ejemplo consiste en antígenos de huevos solubles de esquistosoma (SEA). El método para preparar el antígeno de huevo de esquistosoma se ha descrito previamente por Boros y Warren, 1970, J. of Experimental Med. 132:488 y se describe sintéticamente a continuación.

35 Los huevos lavados se resuspenden en 50.000 huevos/ml de disolución salina tamponada con fosfato. Esto se transfiere a un homogeneizador de tejido de vidrio. Los huevos se homogenizan en hielo. Para asegurar que todos los cascarones se rompan y se quiebren los miracidios, se extrae una alícuota (5 µl) para inspección microscópica. Se transfiere el homogeneizado a tubos centrífugos. 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 proteína. Se conserva la SEA en pequeñas
40 alícuotas a -70°C. Este método puede requerir la modificación para aislar los productos de huevos parasitarios que más fuertemente promueven el acondicionamiento de Th2, es decir, para lograr una concentración eficaz óptima, (100 µg SEA o 10.000 huevos/animal). Los huevos o los componentes de huevo solubles se usan para iniciar las respuestas de Th2 o para disparar las respuestas de Th2 previamente iniciadas por la colonización con helmintos viables. Los huevos o los componentes de huevo se ensayan para confirmar la ausencia de patógenos y endotoxina.

45 Las vacunas de componentes pueden también crearse a partir de larvas y gusanos adultos de parásitos helmínticos. Las larvas o gusanos se aíslan de animales preparatorios que crecen bajo condiciones SPF. Las vacunas que emplean organismos o proteínas intactos, no viables, lípidos o carbohidratos aislados del helminto se preparan y utilizan en un modo similar a aquel descrito para huevos de helmintos.

C. Mantenimiento de organismos helmínticos:

50 Los helmintos se ciclan a través de animales intermedios y preparatorios que crecen bajo condiciones SPF. Las muestras de poblaciones de helmintos se ensayan para asegurar la estabilidad fenotípica tal como índices de colonización, fecundidad y susceptibilidad a antihelmínticos.

Dosis, administración y formulaciones farmacéuticas

Dependiendo de los parásitos helmínticos seleccionados, el tratamiento se administra mediante uno de diversos planteamientos. Los sujetos que necesitan tratamiento reciben la forma infectada del parásito (huevo, cercaria o larva) por vía oral o parenteral, dependiendo del ciclo de vida natural del parásito seleccionado. Alternativamente, el gusano soluble o los extractos de huevo pueden administrarse por vía oral o parenteral para inducir respuestas de TH2.

Con respecto a helmintos intestinales y hepáticos y a esquistosomas, comienzan produciendo huevos que aparecen en la materia fecal aproximadamente 30-60 días después de la inoculación. La cuantificación de los huevos en las heces es satisfactoria para evaluar la aptitud e intensidad de la infección. Las alícuotas de materia fecal se procesan por flotación de sacarosa para determinar el número total de huevos en cada muestra. La flotación sobre la disolución de sacarosa es un método frecuentemente utilizado para aislar huevos de heces para recuento preciso según lo descrito por Koontz y Weinstock, 1996, Gastroenterology Clinics of N. America, 25:435.

Los compuestos de parásitos helmínticos de la invención se pueden formular para administración en cualquier modo conveniente, y la invención incluye por lo tanto dentro de su alcance composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de parásito helmíntico de acuerdo con la invención adaptado para uso en seres humanos. Dichas composiciones pueden presentarse para uso en un modo convencional con la ayuda de cualquier vehículo o excipiente farmacéutico que sea necesario.

El compuesto de parásito helmíntico de acuerdo con la invención se puede formular para inyección, y por ende, para uso como vacuna, y se puede presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, o en envases de múltiples dosis, si es necesario, con el agregado de un conservante. Las composiciones pueden también tener formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones de vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el parásito helmíntico puede tener forma de polvo o reconstituirse con un vehículo adecuado, p. ej., agua libre de pirógeno estéril, antes del uso.

Si se desea, dicha formulación en polvo puede contener una base no tóxica apropiada con el fin de asegurar que el polvo se reconstituya con agua, donde el pH de la formulación acuosa resultante será fisiológicamente aceptable.

Los compuestos de parásitos helmínticos pueden también formularse como supositorios, p. ej., que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Los compuestos de parásitos helmínticos pueden también formularse para una dosis oral con cargas, vehículos y excipientes convencionales. La cantidad de parásito administrada al individuo que lo necesita es una cantidad suficiente para prevenir o tratar la enfermedad autoinmunitaria. Esta cantidad puede variar dependiendo de la enfermedad que se esté tratando o previniendo y del parásito helmíntico, ya sea que se administre intacto, como un huevo, larva, extracto o cercaria.

Típicamente, cuando los parásitos se administran para todas las enfermedades autoinmunitarias descritas en este documento, la cantidad oscila entre aproximadamente 50 y aproximadamente 50.000. Más particularmente, esta cantidad puede oscilar entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000. Cuando se utilizan huevos, se pueden utilizar aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 para tratar las enfermedades autoinmunitarias que se describen en este documento. Cuando se administran extractos, se utilizan aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10.000 µg para tratar las enfermedades autoinmunitarias. Cuando se utilizan larvas y cercarias, las dosis pueden oscilar entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000 en cada caso.

Para prevención o uso como vacuna, las cantidades de los parásitos pueden estar entre 500 y 5.000.

D. Determinación de respuestas de Th1 y Th2

Con el fin de demostrar la eficacia de la presente invención, se puede distinguir entre la respuesta de Th1 y la de Th2. Metawali et al., 1996, J. of Immunol. 157:4546 ha demostrado que en ratones, es posible distinguir una respuesta de Th1 de una respuesta de Th2 por análisis histológico, y por análisis de citocinas y perfiles de inmunoglobulina. Asimismo, Sandor et al., 1990, J. of Exp. Med. 171:2171 ha demostrado que la expresión de la superficie celular de moléculas de clase II Fcγ3 y MHC proporciona discriminación. En este procedimiento, se examinan histológicamente el intestino delgado y el colon para determinar el grado de inflamación mucosal, eosinofilia y mastocitosis. Estos últimos tipos de células son indicativos de la respuesta de Th2. Los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y los bazo pueden disociarse en suspensiones de una sola célula para cultivo *in vitro* en placas de micropocillos. Las células (1-2 x 10⁷/pocillo) en medio de RPMI completo se cultivan durante hasta 72 h en presencia o ausencia de antígeno de gusano o anti-CD3, y los sobrenadantes se ensayan para citocinas e inmunoglobulinas. IFN-γ, TNFα y IgG2a caracterizan una respuesta de Th1, mientras que IL-4, IL-5, IgE e IgG1 tipifican una reacción de Th2. Además, el suero puede ensayarse para determinar concentraciones de citocinas e inmunoglobulinas. A su vez, los leucocitos inflamatorios dispersados se examinan 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 bazos de ratones de la misma edad y la misma camada apropiados que no hospedaron parásitos. Asimismo, hay otros marcadores de las respuestas de Th1 frente a Th2.

5 Un análisis similar puede diferenciar una respuesta de Th1 de una Th2 humanas. Se examina el tejido inflamado, los leucocitos aislados de regiones de inflamación y células de sangre periférica. Los leucocitos se cultivan *in vitro* solos o en presencia de antígenos o mitógenos de parásitos para estimular la liberación de citocinas. La IgG2a se sustituye por IgG2.

10 Detección de citocinas por citometría de flujo: se disponen esplenocitos, MLN o células inflamatorias intestinales en medio completo RPMI en placas de cultivo de 24 pocillos a 2×10^6 células/pocillo. Las células se incuban 4-6 h en presencia o ausencia de anti-CD3 o antígeno apropiado con brefeldin A a 10 µg/ml. Brefeldin previene la exocitosis de proteínas y promueve la acumulación de la citocina dentro de la célula. Para detección de citocinas citoplasmáticas, las células se fijan en 2% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 5 min después de la tinción superficial para distinguir los subtipos de células. Las células se lavan y resuspenden en 50 µl de PBS, 0,2% Saponina y 1 µg anticuerpo anti-citocinas, y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego las células se lavan dos veces en Saponina y se re-suspenden en PBS/FCS. La especificidad de la tinción del anticuerpo de citocina se confirma pre-bloqueando las células con un exceso de anticuerpo no conjugado del mismo isotipo y especificidad de citocina, o incubando las células en presencia de citocina recombinante. Los controles de anticuerpo irrelevantes marcados con ficoeritrina (PE) también se incluyen para evaluar la tinción de fondo. Las células se analizan usando citometría de flujo.

20 Ensayos ELISA: Los ensayos ELISA miden las concentraciones de citocinas y anticuerpos en sobrenadantes celulares de células cultivadas en placas de microtitulación y manipuladas como se describió anteriormente. Muchos de estos ensayos ya se ejecutan en nuestro laboratorio. Las citocinas se ensayan usando dos anticuerpos monoclonales (mAb) en un ELISA sándwich de dos sitios. Los mAb anti-citocinas se purifican por precipitación de amonio de sobrenadantes de anticuerpo que segregan clones de hibridoma. Las placas de microtitulación se recubren con 50 µl de 1 µg/ml de anticuerpo de recubrimiento en PBS que contiene Tween 20 (PBS-T), y se incuban a 4° C durante una noche. Después, los pocillos se bloquean por adición de 150 µl de 10% FCS en PBS con incubación a 37° C durante 30 min. Los estándares comprenden citocina recombinante o sobrenadantes que contienen citocina recombinante de células de bazo activadas con Con A de ratones infectados con esquistosomiasis. Se realizan la muestra y diluciones en serie en RPMI que contiene 10% FCS (RPMI completo) en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos, y se transfieren volúmenes de 50 µl a las placas de ELISA que han sido lavadas tres veces en PBS-T. Las muestras se incuban en las placas de ensayo durante 1 h a 37°C. Se conjuga el mAb apropiado a biotina. Después de lavar tres veces en PBS-T, cada pocillo recibe 50 µl de conjugado de anticuerpo-biotina a 0,5 µg/ml en 1% BSA/PBS-T. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 h seguidas de tres lavados en PBS-T. Se añade conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (75 µl) a 1 µg/ml en 1% BSA/PBS-T y se incuba a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavan 10 veces en PBS-T fresco, y se añaden 100 µl de sustrato (ácido 2,2'-azino(3-etilbenzotiazolina sulfónico) a 1 mg/ml en Na₂HPO₄ 44 mM, ácido cítrico 28 mM y 0,003% H₂O₂. El producto coloreado se mide a una longitud de onda de 405 nm con una longitud de onda de referencia de 490 nm, usando una lectora de microplacas de multibarrido.

40 Las inmunoglobulinas se cuantifican usando ensayos ELISA específicos anti-isotipo. Se usan anti-IgM, -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgA e -IgE de cabra purificados de afinidad como anticuerpos de captura y se absorben en platos de microtitulación de polivinilo flexibles a 10 µg/ml. Después de la adición de sobrenadantes de cultivo, incubación y lavado, se usa anti-inmunoglobulina de cabra conjugada a fosfatasa alcalina isotipo para detectar la inmunoglobulina de ratón total ligada a las placas. Las curvas estándar se generan usando inmunoglobulina purificada. Para medir el anticuerpo específico de antígenos parasitarios, el antígeno soluble se biotinila y se usa para detectar la inmunoglobulina de ratón ligada. Las placas se analizan en una lectora de ELISA a 410 nm, y las concentraciones de inmunoglobulina total se determinan usando la curva estándar y el software del análisis de ajuste óptimo. Las concentraciones de anticuerpo específicas de antígenos se comparan en relación con las lecturas O.D., ya que el antígeno parasitario soluble no es un antígeno definido que permita una cuantificación precisa.

50 Ensayos ELISPOT: Los ensayos ELISPOT se establecieron para contar los linfocitos segregados o bien por anticuerpos policlonales o por citocinas. Se recubren placas de microtitulación de celulosa de 96 pocillos durante una noche a 4° C con 1µg/ml o bien de anticuerpos anti-citocina o anti-inmunoglobulina en PBS-T. Las placas se bloquean luego con PBS que contiene 10% FCS y se lavan ampliamente con PBS-T.

55 Diluciones en serie de una suspensión unicelular, comenzando con 5×10^4 células/pocillo, se incuban en la placa durante 5 h a 37° C en una atmósfera de 5% CO₂ humidificado. Las placas se lavan con PBS-T y se cubren con anticuerpos anti-inmunoglobulina o anti-citocina biotinilados durante una noche a 4° C. Después las placas se lavan y se tratan con conjugado de estreptavidina-glucosa oxidasa durante 2 h y se vuelven a lavar.

El anticuerpo o la citocina segregada por las células individuales se visualiza con sustrato. La reacción colorimétrica se interrumpe después de 30 min lavando, y las manchas se enumeran por magnificación 30X. La dilución de células que producen 10-50 manchas/pocillo se usa para calcular el número total de células segregantes por

muestra. Los controles incluyen pocillos recubiertos con anticuerpo de cabra inapropiado o antígeno inapropiado, o se dejan sin recubrir.

5 Una modificación del ensayo que usa antígeno soluble para recubrir los pocillos permite también la cuantificación de células B que segregan inmunoglobulina específica de antígenos de parásitos. En síntesis, por ejemplo, se recubren placas con antígeno *T. Muris* de adulto a 0,25 µg/pocillo o antígeno de control irrelevante adecuado. Las células se añaden a los pocillos después del lavado. Después de una incubación apropiada, las placas se vuelven a lavar y se tratan como se describió precedentemente.

10 Métodos estadísticos: algunos datos se analizan mediante la prueba de la t de una muestra para determinar si los valores de la media difieren significativamente de cero. Se usa la prueba t pareada para analizar diferencias entre las medias grupales. El análisis de varianza y la prueba t de Dunnett se usan para analizar múltiples datos de comparación.

La evidencia de la presencia de una enfermedad autoinmunitaria y su cura o alivio es necesaria para determinar la necesidad de tratamiento y para vigilar el progreso del tratamiento. Los siguientes procedimientos se utilizan para medir los parámetros clínicos de las enfermedades observadas.

15 *1. Enfermedad inflamatoria de los intestinos*

Evaluación de inflamación: en ratones, los datos clínicos de enfermedad incluyen adelgazamiento, diarrea, prolapso rectal y datos histológicos de inflamación intestinal. Por lo tanto, una mejora en estos parámetros significaría el alivio de la enfermedad.

20 Para calificar la inflamación intestinal en modelos animales, se extirpa tejido, se efectúa un rollo suizo y se embebe en parafina de acuerdo con métodos convencionales. Los cortes se tiñen con hematoxilina y eosina. El grado de inflamación colónica es calificado semicuantitativamente de 0 a 4 en un modo anónimo por un patólogo usando nuestra técnica estandarizada usual: 0 = sin inflamación; 1 = nivel bajo de inflamación; 2 = nivel intermedio de inflamación; 3 = nivel alto de inflamación con engrosamiento de pared y 4 = infiltración transmural, y pérdida de células caliciformes con engrosamiento de pared.

25 Para contar los mastocitos, se preparan muestras de tejido intestinal de ratones sanos por la técnica de rollo suizo, se fijan en parafina fijativa de Carnoy y se procesan para tinción con azul alcian y safranina. Se exploran 50 campos adyacentes de un corte determinado para determinar los mastocitos mucosales en la lámina propia y en las capas de músculo. Los mastocitos se identifican por su tinción granular intracelular distintiva con azul alcian. Todas las muestras se evalúan de manera anónima.

30 La actividad de la enfermedad en seres humanos se monitorea usando diversos criterios clínicos, de laboratorio e histológicos. Hay varios índices de IBD bien consolidados que vigilan los parámetros clínicos como la frecuencia de diarrea y de 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). El CDAI incorpora 8 variables relacionadas con la actividad de la enfermedad y se ha utilizado en los estudios más nuevos de agentes terapéuticos en la enfermedad de Crohn. Incluye la cantidad de heces líquidas o muy blandas, la intensidad del dolor abdominal o cólicos, el bienestar general, la presencia de manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, la presencia o ausencia de masa abdominal, el uso de fármacos antidiarreicos, hematocrito y peso corporal. El puntaje compuesto oscila entre 0 y aproximadamente 600. Los puntajes debajo de 150 indican una remisión y los puntajes por encima de 450 indican enfermedad intensa.

40 Puede también administrarse un cuestionario de calidad de vida ensayado, aceptado y específico de la enfermedad antes y después del tratamiento para evaluar el progreso terapéutico. El Cuestionario de Enfermedad Inflamatoria de los Intestinos de Irvine es un cuestionario de 32 secciones. Evalúa la calidad de vida con respecto a la función de los intestinos (p. ej., heces sueltas y dolor abdominal), síntomas sistémicos (fatiga y alteración del patrón del sueño), función social (asistencia al trabajo y necesidad de cancelar eventos sociales) y estado emocional (enojo, depresión o irritación). El puntaje oscila entre 32 y 224, donde los puntajes más altos indican una mejor calidad de vida. Los pacientes en remisión usualmente tienen un puntaje entre 170 y 190.

Son también útiles las evaluaciones endoscópicas, radiográficas e histológicas de la actividad de la enfermedad intestinal. Los niveles de proteína reactiva C y el índice de sedimentación de las células sanguíneas pueden también controlarse como indicadores sistémicos de inflamación.

50 Modelos animales útiles de acuerdo con la invención

La siguiente Tabla I ilustra las enfermedades que pueden prevenirse o tratar con los parásitos helmínticos de acuerdo con la presente invención.

Tabla 1

ENFERMEDADES TRATABLES	ALGUNOS MODELOS ANIMALES
1. Enfermedades inflamatorias de los intestinos	TNBS colitis (Neurath et al., 1995, <u>J. of Exp. Med.</u> 182:1281) IL-2 mutant mice (Ludviksson et al., 1997, <u>L of Immunol.</u> 158:104) IL-10 mutant mice (Berg et al., 1996, <u>J. of Clin. Investigation</u> 98:1010) TCR transgenic mice (Mombaerts et al., 1993, <u>Cell</u> 75:274) CD45+ T cells transferred into SCID mice (Powrie et al., 1994, <u>Immunity</u> 1:553)
2. Artritis reumatoidea	Murine pristane-induced arthritis (Stasluk et al., 1997, <u>Immunol.</u> 90:81) Murine collagen-induced arthritis (Horsfall et al., 1997, <u>L of Immunol.</u> 159:5687)
3. Diabetes insulino-dependiente (tipo 1)	<i>NOD</i> mouse (Cameron et al., 1997, <u>J. of Immunol.</u> 159:4686)
4. Lupus	(<i>NZWX NZB</i>) <i>F</i> , <i>models</i> (Santiago et al., 1997, <u>J. of Exp. Med.</u> 185:65) <i>GRD</i> , <i>LPR</i> mouse (FAS mutation) (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 & Immunol.</u> 104:332) <i>M. avium</i> mouse (Chen et al., 1994, <u>Science</u> 265:1237)
6. Esclerosis múltiple	Experimental allergic encephalomyelitis in mice

Mecanismo de acción

5 La presente invención se refiere a la prevención y/o el tratamiento de individuos mediante la administración de parásitos helmínticos, y a la prevención y/o el tratamiento de una respuesta inmunitaria excesiva o de una respuesta inmunitaria aberrante en un individuo debido a IBD, enfermedad de Crohn (CD) o colitis ulcerosa (UC), mediante la administración de parásitos helmínticos a ese individuo.

Sin desear estar influenciados por ningún mecanismo de acción, se propone el siguiente mecanismo.

10 La inflamación es un proceso complejo que implica muchos tipos de células y la liberación de diversas moléculas inmunorreguladoras denominadas citocinas. Los tipos de citocinas segregados determinan la naturaleza de la respuesta inflamatoria. Las respuestas inmunitarias usualmente se presentan o bien como Th1 o como Th2. Las inflamaciones de tipo Th1 producen grandes cantidades de IFN- γ y TNF α , que estimulan una fuerte reacción inmunitaria celular a patógenos invasores como bacterias, virus y protozoos. Una respuesta de tipo Th2 contiene IL-4, IL-5, IgE, IgG1, mastocitos y eosinófilos. Este tipo de inflamación se observa comúnmente en reacciones alérgicas. Las fuertes respuestas de Th1 y Th2 son mutuamente exclusivas. IFN- γ previene la expresión de IL-4, y IL-4 impide la producción de IFN- γ , que son dos citocinas centralmente importantes para los patrones de inflamación de Th1 y Th2. Además, hay otras citocinas como IL-10 y TGF-P que inhiben la síntesis de IFN- γ .

La respuesta inmunitaria a los parásitos helmínticos promueve respuestas de Th2 a antígenos no relacionados. La infestación con parásitos helmínticos, que inducen la inflamación de tipo Th2, puede modular la respuesta inmunitaria de Th1 a infecciones parasitarias, bacterianas y víricas concomitantes no relacionadas (Kullberg et al., 1992, *J. Immunol.* 148:3264). Los pacientes infectados con *S. mansoni* montan más de una respuesta de tipo Th2 a la inmunización antitetánica que Th1 o Th0 habitual (Sabin et al., 1996, *J. Infec. Pis.* 173: 269). Los inmigrantes de Etiopía con una alta prevalencia de helmintosis padecen eosinofilia y son propensos a responder a PHA con Th2, en lugar de citocinas de Th1 (Bentwich et al., 1996, *Clin. Exp. Immunol.* 103:

239).

La experimentación con animales respalda este punto de vista. Los ratones infectados con *Mycobacterium avium* desarrollan inflamación granulomatosa de tipo Th1 en los pulmones y el hígado. Los esplenocitos y las células de granuloma de estos animales infectados normalmente producen IgG2a y IFN- γ , y no IL-4 ni IL-5. No obstante, los ratones infectados con *S. mansoni* después de la consolidación de la infección por *Mycobacterium avium* forman granulomas micobacterianos que contienen eosinófilos. A su vez, los esplenocitos y las células de granuloma de ratones co-infectados segregan más IgG1 y mucho menos IgG2a. Las citocinas liberadas de estas células, tanto constitutivamente como después de la estimulación con antígeno micobacteriano, incluyen IL-4 y IL-5, y cantidades mucho menos normales de IFN- γ .

Hay otros ejemplos. La infección de ratones con *S. mansoni* demora el aclaramiento del virus variolovacunal y altera la sensibilidad a mioglobina de esperma de ballena. Los ratones también desarrollan una respuesta de Th2 cuando están infectados con las microfilarias *Brugia malayi*, o inmunizados con un extracto filarial soluble de este parásito. La continua respuesta de Th2 a este antígeno de helmintos modula la respuesta de Th1 al antígeno micobacteriano. Asimismo, *Nippostrongylus brasiliensis*, un nemátodo intestinal murino, estimula la actividad de Th2. *Nippostrongylus* demora el rechazo de injerto de riñón en ratas.

Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos en los que se emplean los siguientes materiales y métodos.

Ejemplo 1. Métodos generales:

Animales: Colonias de 129/SV ratones deficientes de IL-10 mutantes, y animales control apropiados se mantienen alojados en establecimientos mantenidos como entornos libres de patógenos específicos de acuerdo con métodos convencionales.

Mantenimiento de parásitos, infección animal, producción de huevos de esquistosoma: El mantenimiento de *T. muris* y el método utilizado para infección son como lo describen Else y Wakelin, 1990, *Parasitology*, vol. 100, parte 3: 479.

Los huevos de esquistosoma se extrajeron de los hígados de hámsteres infectados con esquistosoma y se conservaron como lo describe Elliott, 1996, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 9:255. Cinco hámsteres infectados producen aproximadamente 2×10^6 huevos.

Preparación de huevos de *T suis*: El siguiente procedimiento se usó en la preparación y obtención de huevos de *T. suis*. Se aislaron gusanos *T. suis* adultos del colon de cerdos de 7-8 semanas de vida después de la exposición a una inoculación experimental de huevos de *T suis*. Los huevos embrionados se obtuvieron cultivando gusanos adultos *in vitro*, y luego los huevos excretados, separados del medio de cultivo por centrifugación, se dispusieron en disolución de dicromato de potasio al 0,2% a 22°C durante 5-6 semanas con burbujeo para obtener las larvas infectivas en la primera etapa. Los huevos se lavaron dos veces en agua estéril por centrifugación a 1200 x g durante 10 min, se contaron y se resuspendieron en la cantidad deseada de disolución salina basada en una dosis calculada de 2.500. Los huevos se conservaron para uso en los sujetos.

Los huevos son estables durante por lo menos un año en el refrigerador. Para asegurar la infectividad, se controló a los pacientes para determinar el aspecto de los huevos en las heces después de la colonización. La cantidad de huevos en las heces es proporcional a la intensidad de la infestación. Además, ocasionalmente, infectamos cerdos con nuestros huevos conservados para asegurar la continuidad de la infectividad.

Infección con *M. avium*: Se infectaron ratones inyectando 10^6 unidades formadoras de colonias (CFU) de *Mycobacterium avium* (ATCC 25291) por vía intraperitoneal. En el día 60 de la infección, algunos ratones recibieron 35 cercarias *S. mansoni* para inducir la infección dual.

Infección de esquistosoma y aislamiento de huevos: Algunos experimentos emplearon 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 granuloma: Los granulomas se forman en ratones infectados con esquistosoma debido a la deposición de huevos natural, que comienza en la sexta semana de infección. *M. avium* también induce granulomas. Estudiamos granulomas hepáticos aislados de ratones infectados como se ha descrito (Elliott, 1996, arriba). Los granulomas se dispersaron para producir suspensiones unicelulares. Los granulomas aislados se agitaron durante 35 min a 37°C en un baño de agua con agitación en medio RPMI que contenía 5 mg/ml de colagenasa. Los granulomas residuales se succionaron y expelieron a través de una jeringa de 1 ml para inducir mayor disociación. La suspensión celular resultante se filtró a través de una gaza y se lavó tres veces. La viabilidad de las células se determinó por exclusión de Eosina Y. Este protocolo resultó en un alto rendimiento de células inflamatorias viables que demostraron expresión conservada de moléculas superficiales.
- 5
- 10 Dispersión de células esplénicas y MLN: Se dispersaron esplenocitos y MLN desmenuzando y lavando el tejido a través de una malla de acero inoxidable. Los RBC contaminantes se lisaron con H₂O, y las células se lavaron x3 en RPMI antes del uso.
- Inducción de colitis por TNBS: La colitis se indujo por instilación rectal de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) como lo describen Neurath et al., 1995, J. Exp. Med., 182: 1281. En síntesis, ratones BALB/c control o expuestos a parásitos se dejaron en ayunas durante 30 horas, luego se anestesiaron con metoxiflurano. Se avanzó 4 cm una sonda de 1,2 mm hacia el colon, y se instiló 0,1 ml de disolución TNBS (5 mg/ml TNBS (Sigma) en etanol al 50%). El animal se sostuvo por el rabo durante 3 minutos para asegurar el contacto uniforme con la mucosa colónica.
- 15
- Evaluación de inflamación mucosal: Para calificar la inflamación intestinal, se extirpó el tejido en los puntos de tiempo indicados, se efectuó un rollo suizo y se embebió en parafina de acuerdo con métodos convencionales. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Un patólogo calificó el grado de inflamación colónica semicuantitativamente de 0 a 4 en un modo anónimo usando nuestra técnica estandarizada usual (19). 0 = sin inflamación, 1 = nivel bajo de inflamación, 2 = nivel intermedio, 3 = nivel alto de inflamación con engrosamiento de pared, 4 = infiltración transmural, pérdida de células calciformes, engrosamiento de pared.
- 20
- Ensayos ELISA para citocinas de murino: Los ensayos ELISA se efectuaron como se describió precedentemente en la sección VI.
- 25
- Ejemplo 2. La respuesta de Th2 a *S. mansoni* reduce una respuesta de Th1 continua a un antígeno que induce Th1 bacteriano, no relacionado:
- Está consolidado que las respuestas inmunitarias de las células Th pueden polarizarse en patrones de Th1 o Th2. Esta polarización ocurre debido a que el IFN γ de las células Th1 inhibe la proliferación de células Th2, mientras que la IL-4 y la IL-10 de las células Th2 inhibe el desarrollo de células Th1. Los siguientes experimentos demostraron que la esquistosomiasis altera la respuesta de Th1 en murinos a una infección micobacteriana consolidada.
- 30
- Los ratones se co-infectaron con *M. avium* y *S. mansoni* para evaluar la respuesta del hospedante a estos estímulos inflamatorios de Th1 y Th2 bien distintos. Los ratones BALB/cAnN desarrollaron infección por *M. avium* crónica cuando se les inyectó este organismo (10⁶ CFU). Sesenta días después de la consolidación de la infección micobacteriana, los ratones se infectaron con *S. mansoni* (40 cercarias). Los ratones fueron sacrificados 60 días después. Los grupos control incluyeron ratones que habían recibido o bien *M. avium* solamente durante 120 días o *S. mansoni* solamente durante 60 días. Se cultivaron esplenocitos dispersados o células de granuloma aisladas de estos animales *in vitro* (4 x 10⁵ células/pocillo) durante 48 h en presencia o ausencia de antígeno de huevos de esquistosoma (SEA, un fuerte antígeno de Th2) o derivado de proteínas purificadas (PPD, un fuerte antígeno inductor de Th1) de antígenos bacterianos a una concentración óptima. Después de la incubación, se ensayaron los sobrenadantes para determinar la producción de citocinas o inmunoglobulina usando ensayos ELISA. Los datos en las figuras 1-3 son los valores de los errores estándar de la media de tres experimentos separados.
- 35
- 40
- Los esplenocitos de ratones infectados solamente con *M. avium* segregaron grandes cantidades de IFN γ después de la estimulación con PPD (antígeno de Th1). Las células del bazo de los ratones control no infectados no produjeron ninguna cantidad. De hecho, no se detectó ningún IFN γ en cultivos de células del bazo de ratones concurrentemente infectados (*M. avium* solo frente a infección concurrente, P<.0001, Figura 1).
- 45
- El antígeno de huevos de esquistosoma soluble (SEA, antígeno de Th2) estimuló solamente la liberación de IL-4 e IL-5 de esplenocitos de animales infectados por *S. mansoni*. Los ratones infectados singularmente con *M. avium* no produjeron IL-4 ni IL-5 en respuesta a PPD o SEA. No obstante, los esplenocitos de animales co-infectados segregaron algo de IL-4 después de la estimulación con PPD (Figura 1).
- 50
- Se aislaron granulomas de los hígados de ratones infectados con *M. avium* o *S. mansoni*, o de animales que tenían una infección concurrente. Los animales concurrentemente infectados desarrollaron granulomas hepáticos que contenían tanto huevos de esquistosoma como micobacterias fácilmente detectables en el 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 en una concentración óptima. Las células de granuloma de ratones solamente infectados con
- 55

M. avium segregaron grandes cantidades de IFN γ después de la estimulación con PPD. No se detectó IFN γ en cultivos celulares de granuloma de ratones concurrentemente infectados (*M. avium* solo frente a otro, $P < 0,001$) (Figura 2).

5 Liberación de IL-4 estimulada por SEA de células de granuloma de animales infectados con *S. mansoni*. SEA no promovió segregación de IFN γ bajo ninguna circunstancia. Los ratones infectados singularmente con *M. avium* no produjeron IL-4 en respuesta a PPD. No obstante, las células de granuloma de animales co-infectados segregaron algo de IL-4 después de la estimulación con PPD (Figura 2).

10 Las respuestas de Th1 promueven la producción de IgG2a, mientras que las reacciones de Th2 potencian IgG1 e IgE. La Figura 3 indica que los ratones infectados con *M. avium* tienen altos niveles de IgG2a en el suero. Incluso así, los animales co-infectados tienen concentraciones normales de IgG2a en el suero, pero mayores niveles de IgG1 e IgE.

Estos datos tomados en conjunto indican que una respuesta de Th2 a una infección helmíntica puede reducir la respuesta continua del hospedante incluso a un organismo muy inductor de Th1 como *M. avium*.

15 Ejemplo 3. La Colonización con helmintos intestinales o exposición a sus huevos atenúa la inflamación del intestino de tipo Th1 en colitis inducida por TNBS en murinos

20 La instilación rectal de TNBS en etanol al 50% induce una colitis en ratones que comparten características con la enfermedad de Crohn. La inflamación colónica se caracteriza por células CD4+ T infiltrantes con expresión elevada de mRNA de IFN γ . Las células T de lámina propia de ratones tratados con TNBS segregan 50 veces más IFN γ y 5 veces menos IL4 que las células T de los controles (Neurath et al., 1995, supra). Las células mononucleares de lámina propia segregan 30 veces más TNF α que las células de los ratones control (Neurath et al., 1997, Eur. J. Immunol., 27: 1743). Cabe destacar que la colitis inducida por TNBS puede prevenirse o mejorarse mediante tratamiento con anti-IL-12 (Neurath et al., 1995, supra), anti-TNF α (Neurath et al., 1997, supra) o rIL-10 (Duchmann et al., 1996, Eur. J. Immunol., 26: 934). La colitis inducida por TNBS puede también prevenirse mediante exposición oral previa al hapteno (Elson et al., 1996, J. Immunol., 157: 2174) probablemente aumentando las respuestas de IL-4, IL-10 y TGFP mucosales (Neurath et al., 1996, J. Exp. Med., 183: 2605).

30 Establecimos este modelo de colitis inducida por TNBS usando ratones BALB/c en nuestro laboratorio. La administración rectal de TNBS (0,1 ml de 5 mg/ml stock) en etanol al 50% produjo de manera reproducible la colitis en estos animales. Para cada uno de los experimentos con TNBS anteriormente descritos, los animales expuestos a los parásitos y los animales de control recibieron la misma preparación de TNBS en el mismo día y administrada por el mismo operador, quien desconocía cada grupo de tratamiento.

A. La esquistosomiasis inhibe la liberación de IFN γ de células de MLN y esplénicas en ratones tratados con TNBS.

35 Como se describió anteriormente, la esquistosomiasis inhibe la respuesta de Th1 en murinos a una infección micobacteriana consolidada. Extendimos estas observaciones para determinar si la infección de esquistosoma altera la respuesta de Th1 en ratones tratados con TNBS. Los ratones fueron infectados con 35 cercarias de *S. mansoni* por inyección sc.. Los parásitos maduran y comienzan a poner huevos aproximadamente 6 semanas después del inicio de la infección. Dos semanas más tarde (a las 8 semanas de la infección), los ratones se trataron con TNBS. La capacidad de MLN y de las células esplénicas de producir IFN γ en respuesta a la estimulación de las células T (anti-CD3) se examinó varios días después. Como se indica en la Tabla 1, la infección de esquistosoma natural inhibe fuertemente la liberación de IFN γ de células esplénicas y de ganglio linfático mesentérico (MLN) en ratones
40 tratados con TNBS.

Tabla 1.		
La esquistosomiasis inhibe la producción de IFN γ de células T de MLN y esplenocitos en ratones tratados con TNBS		
Grupo	IFN γ estimulado con α -CD3 (ng/ml)	
	Células de MLN	Células esplénicas
Ratones no infectados a los que se les administró TNBS	3,2 \pm 0,7	44,1 \pm 2,3
Ratones infectados con esquistosoma a los que se les administró TNBS	1,9 \pm 0,3 ^b	4,2 \pm 0,4 ^b

Error estándar de la media de IFN γ (ng/ml) de determinaciones por triplicado medidas por ELISA, a) $p < 0,1$ b) $p < 0,05$.

Los cultivos contenían 10⁶ células de MLN o bazo dispersadas por pocillo incubadas en 200 μ l de medio durante 48 horas a 37°C en presencia de anti-CD3 (1 μ g/ml) (2C11). Los resultados son representativos de dos experimentos.

B. La exposición a huevos de esquistosoma inhibe la liberación de IFN γ de células de MLN y esplénicas en ratones tratados con TNBS.

- 5 En esquistosomiasis, es la exposición a huevos de parásitos en lugar de gusanos adultos lo que induce la respuesta de Th2. La infección de esquistosoma no induce fuertes respuestas de Th2 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 de Th2 (Oswald et al., 1994, *J. Immunol.*, 153: 1707). Estas observaciones indicarían que la exposición a huevos de esquistosoma en
- 10 ausencia de infección natural puede inducir la respuesta de Th2 y suprimir la respuesta de Th1.

Ensayamos la hipótesis de que la pre-exposición a huevos de esquistosoma inhibiría las respuestas de Th1 sin requerir la infección por gusanos adultos. Los ratones se inocularon dos veces con 10⁴ huevos de esquistosoma por inyección intraperitoneal (ip) 14 y 4 días antes de la exposición rectal a TNBS. Estos tiempos se eligieron para modelar la deposición continua de huevos que ocurre en una infección natural. Los ratones no expuestos a los

15 huevos del parásito pero tratados con TNBS sirvieron como controles. Los huevos se congelaron previamente y no fueron viables al momento de la inyección. Una vez más, la capacidad de las células de MLN y de las células esplénicas de producir IFN γ en respuesta a la estimulación con células T (anti-CD3) se examinó durante varios días después de la instilación de TNBS. Al igual que la infección de esquistosoma natural (Tabla 1), la exposición ip. a los

20 huevos inhibió la producción de IFN γ de células T de MLN y esplénicas en ratones tratados con TNBS como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.		
La exposición a huevos de esquistosoma inhibe la producción de IFN γ de células T de MLN y esplénicas en ratones tratados con TNBS		
Tratamiento	IFN γ estimulado con α -CD3 (ng/ml)	
	Células de MLN	Células esplénicas
TNBS solo	4,65 \pm 0,02	47,1 \pm 3,0
Huevos ip. y TNBS	2,19 \pm 0,11 ^a	21,8 \pm 3,4 ^b

Desviación estándar de la media de IFN γ (ng/ml) de determinaciones por triplicado medidas por ELISA, a) p<0,5. Los cultivos contenían 10⁶ de células de MLN o esplénicas dispersadas por pocillo incubadas en 200 μ l de medio durante 48 horas a 37 °C en presencia de anti-CD3 (1 μ g/ml) (2C11). Los resultados son representativos de tres experimentos separados.

C. La exposición a huevos de esquistosoma protege a los ratones contra colitis inducida por TNBS.

5 La inhibición del desarrollo de la respuesta de Th1 mucosal puede atenuar la colitis inducida por TNBS. La exposición previa a huevos de esquistosoma inhibe la segregación de citocinas de Th1 por células T de MLN y esplénicas. Luego determinamos si la inyección de huevos de esquistosoma inhibiría la colitis inducida por TNBS. Se inyectaron los huevos anteriormente mencionados seguidos de tratamiento con TNBS. El tratamiento con los huevos redujo en drástica medida la mortalidad acumulativa en tres experimentos separados desde el 60% (16/27) en el grupo control hasta el 22% (6/27) en los ratones expuestos a los huevos. Se midió la inflamación intestinal en una escala de 4 puntos como se detalló precedentemente en Métodos generales. En los ratones que sobrevivieron, el tratamiento con los huevos atenuó la inflamación intestinal de 3,1 \pm 0,5 (desviación estándar de la media) en el grupo control a 1,3 \pm 0,3 en los ratones expuestos a los huevos (p<0,05, Figura 4). Los experimentos subsiguientes demostraron que la mayor diferencia entre los grupos fue obvia 3 días después del tratamiento con TNBS Otros experimentos llevados a cabo 14 días después de la instilación de TNBS demostraron que la exposición a los huevos proporciona protección más prolongada. Estos datos indican que los huevos de esquistosoma protegen a los ratones contra desarrollo de colitis mortal, inhibiendo las respuestas de Th1 mucosales.

D. Los helmintos intestinales inducen las respuestas de Th2 del hospedante.

Es probable que otros parásitos helmínticos distintos de *S. mansoni* puedan modular las respuestas de Th1 del hospedante. La expresión de inmunidad protectora para los nemátodos intestinales depende de las células CD4 T. Los ratones expelen gusanos o limitan la infección montando una respuesta de Th2. La expulsión de gusanos no parece depender exclusivamente de la eosinofilia intestinal ni de la mastocitis mucosal. La IL-4 puede tener una función crítica en la expulsión de gusanos, ya que el tratamiento de bloqueo de mAb de los receptores anti-IL-4 o anti-IL-4 promueve la retención de los gusanos (Else et al., 1994, J. Exp. Med., 179: 347). A la inversa, el tratamiento con IL-4 promueve el aclaramiento de los gusanos (Figura 4).

25 *T. muris* vive en el colon del hospedante murino. Se relaciona con *Trichuris trichiura*, un parásito portado por prácticamente un billón 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 del ciego. Luego maduran y se convierten en parásitos adultos. El parásito no se replica dentro del hospedante, lo que nos permite controlar la intensidad de la infección (Bancroft et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24: 3113).

30 Usamos *T. muris* para reducir la sensibilidad intestinal a Th1. La infección por *T. muris* se establece por gavaje oral con 250 huevos embrionados que contienen larvas viables. Los ratones BALB/c pueden alojar *T. muris* y expeler naturalmente los parásitos al cabo de 4 semanas de infección. Tratamos ratones infectados con *T. muris* o ratones infectados control con instilación rectal de TNBS 4 semanas después del inicio de la infección. Antes de la colonización con *T. muris* redujo la mortalidad acumulativa en dos experimentos separados del 58% (7/12) en el grupo infectado control al 21% (3/14) en el grupo expuesto al parásito. Asimismo, los ratones previamente colonizados con *T. muris* desarrollaron colitis inducida por TNBS atenuada (0,92 \pm 0,5, desviación estándar de la media) según lo comparado con los ratones infectados control (3,13 \pm 0,63, p<0,05). Estos datos indican que la

exposición previa a parásitos intestinales (*T. muris*) protege a los ratones contra el desarrollo de colitis severa mediada por Th1.

Ejemplo 4. La ruptura de genes de IL-10 no altera significativamente la interacción hospedante/parásito.

5 IL-10 es una importante citocina inmunorreguladora que reduce la activación de macrófagos y la función celular accesoria (Moore et al., 1993, Ann. Rev. Immunol., 11: 165). Los ratones que se vuelven deficientes de IL-10 por ruptura génica direccionada (IL-10^{-/-}) desarrollan una enterocolitis crónica que es influenciada por la flora colónica (Kuhn et al., 1993, Cell, 75: 263). La inflamación intestinal es atenuada por el tratamiento con anticuerpo anti-IFN γ , demostrando que la colitis proviene de respuestas de Th1 exuberantes a los contenidos colónicos (Berg, et al., 1996, J. Clin. Invest., 98: 1010). Estos ratones sirven como excelentes modelos para colitis espontánea similar a aquella de la enfermedad de Crohn. En este ejemplo, hemos utilizado ratones que carecen de IL-10 en los fondos 129 y C57B1/6.

A. La ruptura del gen de IL-10 no altera la susceptibilidad del hospedante a la colonización de parásitos.

15 Ratones deficientes de IL-10 desarrollaron espontáneamente inflamación intestinal crónica. Una preocupación potencial fue que esta inflamación podría prevenir la colonización eficaz con *T. muris*. Hemos descubierto, no obstante, que obtenemos rutinariamente (>95%) la colonización patente con *T. muris* en ratones que carecen de IL-10 en ambos fondos 129 y C57B1/6. Hasta la fecha, hemos colonizado más de 40 ratones deficientes de IL-10 con *T. muris*. Los ratones deficientes de IL-10 también pueden alojar *S. mansoni* que maduran hasta convertirse en gusanos adultos y poner huevos (Wynn et al., 1998, J. Immunol., 160: 4473). Hemos confirmado estos hallazgos (véase a continuación).

20 B. Los ratones que carecen de IL-10 pueden montar respuestas de Th2 a parásitos.

Los ratones infectados con el nemátodo intestinal *N. brasiliensis* desarrollan inflamación de tipo Th2 al parásito con producción de IL-4, IL-5 y IL-10. *N. brasiliensis* puede colonizar ratones deficientes de IL-10 y estimular una respuesta de Th2 intestinal adecuada (Kuhn et al., 1993, arriba). Infectamos ratones deficientes de IL-10 con *S. mansoni* para examinar si montan una respuesta de TH2.

25 La Tabla 3 demuestra que los esplenocitos de ratones con ruptura del gen de IL-10 colonizados durante 8 semanas con *S. mansoni* segregan grandes cantidades de IL-4 tras la estimulación con antígeno de huevos de esquistosoma (SEA) o anti-CD3. Los granulomas que rodean los huevos de esquistosoma en estos ratones contienen el alto porcentaje habitual (45-50%) de eosinófilos y producen IL-4 y IL-5. Por consiguiente, exhiben una respuesta de Th2 eficaz. Estos datos indican que la exposición a parásitos helmínticos como *S. mansoni* inducirá una fuerte respuesta de Th2 incluso en ausencia de IL-10.

Tabla 3.			
La esquistosomiasis induce una respuesta de Th2 en ratones deficientes de IL10			
Citocina	Células esplénicas de ratones infectados con esquistosoma		
	Sin estimulación	Con estimulación de SEA	Con estimulación de α -CD3
IL-4 (ng/ml)			
Tipo salvaje	0,07 \pm 0,08	0,21 \pm 0,02	3,94 \pm 0,12
IL-10 ^{-/-}	0,41 \pm 0,10	2,56 \pm 0,23	5,06 \pm 0,33

Desviación estándar de la media de IL-4 (ng/ml) de determinaciones por triplicado según lo medido por ELISA. Los cultivos contenían 10⁶ células/pocillo incubadas durante 48 horas a 37 °C en 200 μ l de medio en ausencia o presencia de antígeno de huevos de esquistosoma (SEA 5 μ g/ml) o anti-CD3 (1 μ g/ml) (2C11). Los resultados son representativos de dos experimentos separados que usan un mínimo de cuatro ratones genéticamente intactos y genomanipulados en cada experimento.

D. El acondicionamiento de Th2 helmíntico inhibe el desarrollo natural de inflamación mucosal en ratones IL-10^{-/-}.

Demostramos que los ratones deficientes de IL-10 podrían alojar parásitos helmínticos y montar una fuerte respuesta de Th2. Ya que los ratones deficientes de IL-10 pueden desarrollar respuestas de Th2 y alojar parásitos intestinales, sirven como excelentes modelos para estudiar el efecto de la exposición a parásitos sobre colitis espontánea o continua. IL-10 es una importante citocina anti-inflamatoria. Es posible que la ruptura de este circuito inmunorregulador esencial prevenga el acondicionamiento de Th2 mucosal por parásitos. Los datos actuales indican que la infección con *T. muris* impide la colitis espontánea que se desarrolla en ratones deficientes de IL-10. Los animales (6 semanas de vida) recibieron *T. muris* o infección control y fueron sacrificados 6 semanas después. La inflamación colónica de ratones deficientes de IL-10 infectados con *T. muris* o con infección control se midió en una escala de 4 puntos como se indicó en detalle anteriormente en Métodos generales. La infección previa con *T. muris* atenuó la inflamación intestinal de $3,0 \pm 0,3$ (error estándar de la media) en el grupo de infección control a $2,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) en los ratones deficientes de IL-10 expuestos al parásito. Estos datos demuestran que la exposición previa a parásitos helmínticos atenúa la colitis espontánea en ratones que carecen de IL-10.

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

Nuestra principal hipótesis es que la ausencia de helmintosis y acondicionamiento de Th2 mucosal durante la infancia predisponen a la enfermedad de Crohn y a otras enfermedades autoinmunitarias que son consecuencia de reacciones de Th1 activas en exceso. Una hipótesis corolaria importante es que la colonización con parásitos intestinales reducirá la inflamación establecida. Esperamos que esto sea posible debido a que la esquistosomiasis concurrente impide respuestas de Th1 en una infección por *M. avium* establecida (ver arriba). Ensayamos esta hipótesis colonizando a pacientes con enfermedad de Crohn con *Trichuris suis* y evaluando la mejoría en la actividad de la enfermedad.

T. suis, el tricocéfalo porcino, se relaciona mucho con *T. trichiura*, un helminto humano frecuente en países en vías de desarrollo. El tricocéfalo es un agente potencial para terapia. El parásito humano natural *Trichuris trichiura* es un organismo muy pequeño que reside en el colon por adhesión a la mucosa. La colonización ordinaria usualmente no produce síntomas y no causa problemas de salud al hospedante. Éste es el caso en millones de personas colonizadas de todo el mundo, pero en una minoría, la infestación intensa produce diarrea, hemorragia y anemia con deficiencia de hierro. Cabe destacar que el ciclo vital del parásito es tal que el hospedante no se autoinfecta. Los huevos requerirían una fase de suelo para madurar y poder tornarse infectivos y luego deberían re-ingerirse para aumentar la carga parasitaria para un individuo. Por lo tanto, la infestación con *T. trichiura* no aumentará dentro del hospedante, a menos que se ingieran los huevos en la tierra. El agente se trata fácil y eficazmente con tres días de mebendazol. El tricocéfalo humano podría usarse para colonizar al hospedante y se consideraría un agente experimental para modificar los procesos inmunitarios en la enfermedad de Crohn.

No obstante, *Trichuris trichiura* presenta un problema sanitario potencial para el hospedante. Ya que el ser humano es el único hospedante natural, los huevos para uso experimental tendrían que recogerse de otros seres humanos, creando el potencial de transmisión de otras enfermedades infecciosas al sujeto experimental. Por ende, utilizamos en su defecto un parásito animal muy relacionado, el tricocéfalo porcino (*Trichuris suis*), que posee el potencial de colonizar temporariamente un hospedante humano sin causar síntomas, enfermedad, una enfermedad co-infecciosa o un peligro sanitario público.

El tricocéfalo porcino está muy relacionado con las especies que infectan a seres humanos. Los dos organismos son de la misma familia y son morfológicamente similares, pero pertenecen a distintas especies y pueden distinguirse desde el aspecto morfológico, del desarrollo y clínico.

El huevo del tricocéfalo porcino es ligeramente más grande, tiene un espolón de forma diferente, y la velocidad de desarrollo de un huevo a un adulto es más lenta que aquella de *Trichuris trichiura* (Beer, 1976, Res. Vet. Sci., 20:47). Cabe destacar que podemos obtener huevos infecciosos de animales SPF.

Produjimos un suministro de huevos *T. suis* infectivos como se describió anteriormente. Los huevos se ensayaron para confirmar la ausencia de contaminación con patógenos entéricos (p. ej. *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* y *E. coli* enterotóxica) y virus (p. ej., CMV, HSV, VZV, adenovirus y enterovirus).

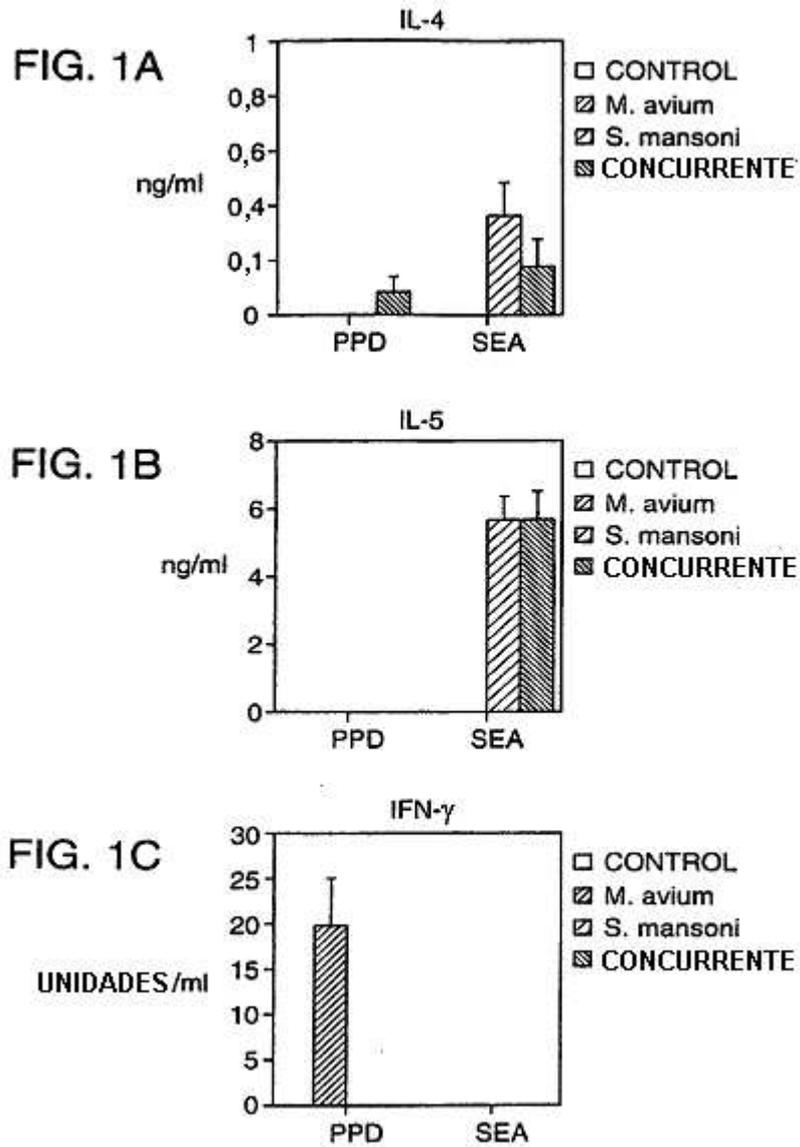
Dos pacientes con enfermedad de Crohn avanzada resistentes a la medicación se colonizaron con *T. suis*. Toleraron el parásito con pocos o sin ningún síntoma atribuible a este organismo. La Tabla 4 demuestra que después de lograr la colonización del paciente, ambos participantes tuvieron una reducción en los valores CDAI, diarrea e índices inflamatorios. Este resultado indica que los helmintos son útiles para modular las respuestas inmunitarias anormales, incluyendo, aunque sin limitarse a, enfermedad de Crohn.

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

a) Valores estables al ingreso en el estudio, b) Valores 2 y 4 semanas después del inicio de la colonización con *T. suis*. c) Índice de actividad de la enfermedad de Crohn, d) Índice de sedimentación de eritrocitos. ND; no determinado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris*, en la elaboración de un medicamento para prevenir y/o tratar la enfermedad inflamatoria de los intestinos, en donde la preparación de parásitos helmínticos se selecciona del grupo que consiste en un parásito, un extracto de parásitos, huevos de parásitos, extracto de huevos de parásitos, larvas de parásitos, extracto de larvas de parásitos, cercarias de parásitos y extracto de cercarias de parásitos.
- 10 2. Una preparación de parásitos helmínticos preparada a partir del parásito *Trichuris suis* o *Trichuris muris* para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedad inflamatoria de los intestinos, en donde la preparación de parásitos helmínticos se selecciona del grupo que consiste en un parásito, un extracto de parásitos, huevos de parásitos, extracto de huevos de parásitos, larvas de parásitos, extracto de larvas de parásitos, cercarias de parásitos y extracto de cercarias de parásitos.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de parásitos helmínticos para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha preparación de parásitos helmínticos está libre de patógenos.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la preparación de parásitos helmínticos de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha preparación es adecuada para administración oral.



CONCENTRACIÓN DE IFN γ , IL-4 Y IL-5 EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS ESPLÉNICAS DE RATONES INFECTADOS CON *M. avium*, *S. mansoni* O AMBOS ORGANISMOS. LOS ESPLENOCITOS (4×10^5 /POCILLO) SE CULTIVARON *IN VITRO* DURANTE 48 H A 37° C EN 200 μ L DE MEDIO EN PRESENCIA O AUSENCIA DE CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE PPD O ANTÍGENO DE HUEVO DE ESQUISTOSOMA SOLUBLE (SEA). LA SEGREGACIÓN DE CITOCINAS SE CUANTIFICÓ POR ELISA.

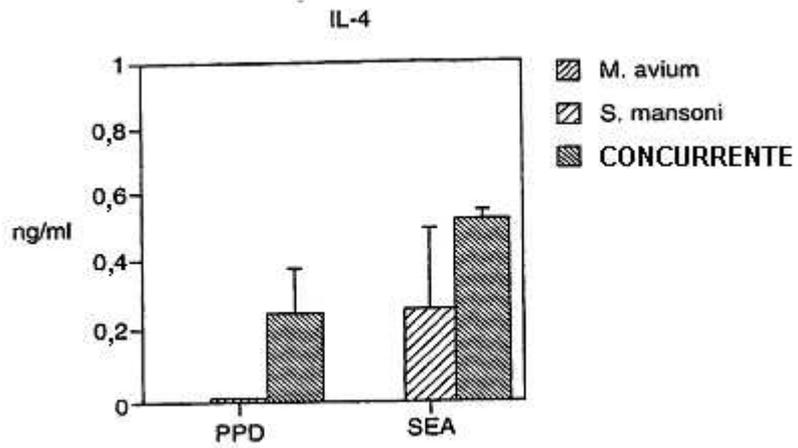


FIG. 2A

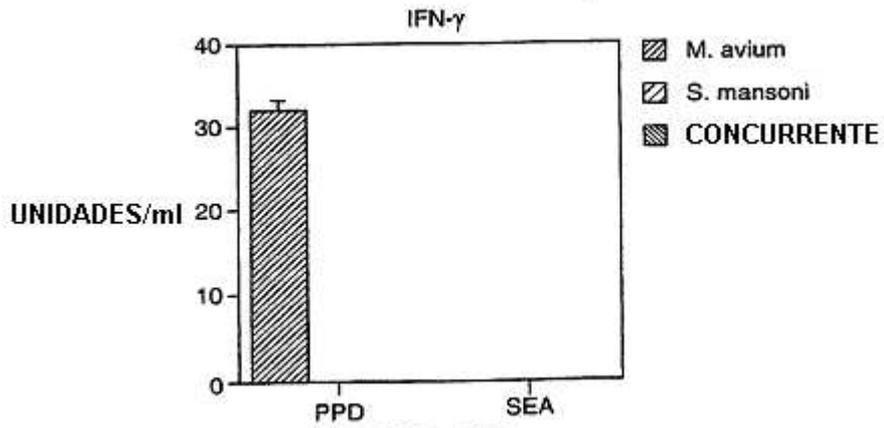
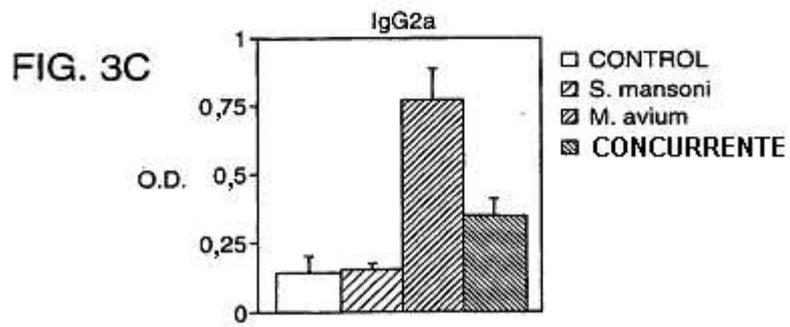
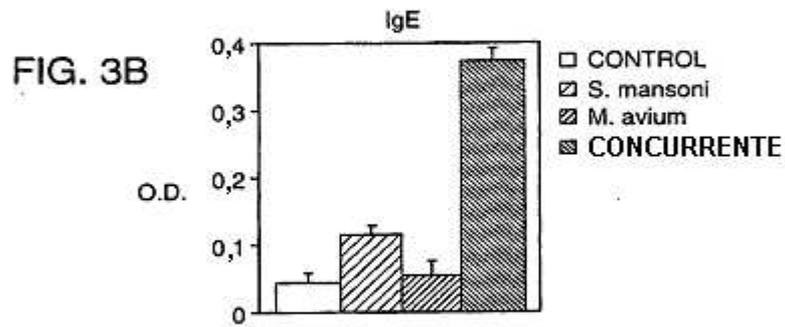
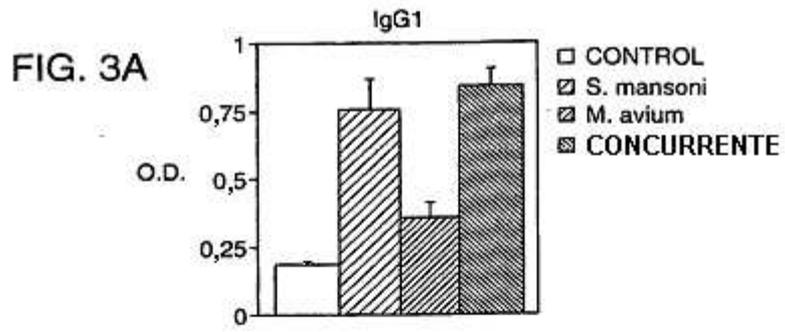


FIG. 2B

CONCENTRACIÓN DE IFN γ , IL-4 EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE GRANULOMA DE RATONES INFECTADOS CON *M. avium*, *S. mansoni* O AMBOS ORGANISMOS. LAS CÉLULAS DE GRANULOMA (4×10^5 /POCILLO) EN 200 μ L DE MEDIO SE CULTIVARON *IN VITRO* A 37° C DURANTE 48 H EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE PPD O ANTÍGENO DE HUEVO DE ESQUISTOSOMA SOLUBLE (SEA). LA SEGREGACIÓN DE CITOCINAS SE CUANTIFICÓ POR ELISA.



NIVELES DE IgG1, IgE E IgG2a EN SUERO EN RATONES INFECTADOS CON *M. avium*, *S. mansoni* O AMBOS (CONCURRENTE) COMO SE DESCRIBIÓ ANTERIORMENTE. LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINA SE DETERMINÓ POR ELISA.

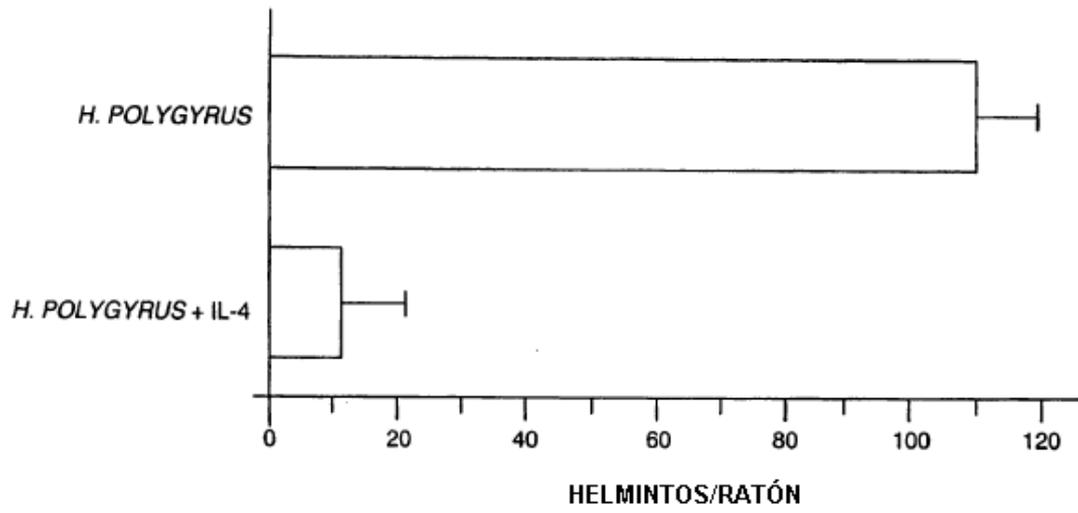


FIG. 4

IL-4 PUEDE CURAR A RATONES DE UNA INFECCIÓN CRÓNICA POR *H. polygyrus*. LOS RATONES RECIBIERON TRES INYECCIONES DE UN COMPLEJO DE IL-4 COMENZANDO 12 DÍAS ANTES DE SER SACRIFICADOS. LOS DATOS SON LOS ERRORES ESTÁNDAR DE LA MEDIA DE MÚLTIPLES DETERMINACIONES.