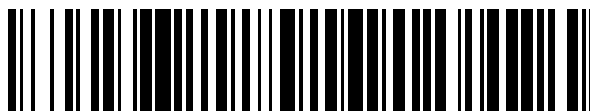


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 141**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2006** **E 06750196 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014** **EP 2003978**

54 Título: **Terapia con células alogénicas para el tratamiento de una infección oportunista**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.08.2014**

73 Titular/es:

**IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)**  
**36-1 HATIVAT GIVATI**  
**71700 MODI'IN, IL**

72 Inventor/es:

**HAR-NOY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 482 141 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

Terapia con células alogénicas para el tratamiento de una infección oportunista

### Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al uso de infusiones de células alogénicas para tratar una enfermedad. Más particularmente, la invención se refiere a una terapia con células alogénicas para la estimulación de la inmunidad celular en huéspedes inmunocomprometidos.

### Antecedentes

- 10 El sistema inmune humano es capaz de proteger a los individuos de una infección por una diversidad de patógenos bacterianos, protozoarios, fúngicos y víricos. Sin embargo, cuando el sistema inmune está debilitado por la edad o una enfermedad (por ejemplo, una infección por el VIH) o por una medicación (corticosteroides, quimioterapia) o por tratamientos para prevenir el rechazo en pacientes con trasplante de órgano o de médula ósea, estos patógenos que normalmente no causan una enfermedad clínica pueden causar infecciones. Los patógenos oportunistas comunes son hongos, *Mycobacterium avium cellulare*, virus, particularmente una infección por citomegalovirus (CMV), y *Pneumocystis carinii*. Los pacientes con una infección por VIH y los sometidos a trasplantes de órganos y médula
- 15 ósea son particularmente vulnerables por infecciones oportunistas.

- El individuo inmunosuprimido es vulnerable por organismos tanto endógenos como externos. Las infecciones oportunistas pueden ser el resultado de la adquisición exógena de un patógeno particularmente virulento (por ejemplo, meningitis meningocócica o neumonía neumocócica), la reactivación de un organismo endógeno latente [por ejemplo, virus herpes simplex (HSV; del inglés, herpes simplex virus), virus herpes zóster (HZV; del inglés, herpes zoster virus) o zóster, o tuberculosis], y la invasión endógena de unos organismos normalmente comensales o saprofitos (por ejemplo, bacterias, virus, hongos o protozoos/parásitos). El tipo exacto de infección oportunista que tiene lugar depende del tipo y el grado de la alteración inmunológica, si es un defecto celular, humoral o fagocítico o un defecto combinado, y de los organismos presentes en los entornos interno y externo.
- 20

- Las infecciones oportunistas son a menudo letales a pesar del tratamiento con medicaciones antivíricas, antifúngicas o antibióticas. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para fortalecer el sistema inmune de los individuos inmunocomprometidos, tanto para tratar como para prevenir una infección oportunista.
- 25

### Sumario de la invención

- La presente invención comprende un método para estimular el sistema inmune en pacientes inmunocomprometidos con objeto de tratar una infección oportunista. El método implica la infusión de células alogénicas deliberadamente incompatibles. Con objeto de evitar las complicaciones de la enfermedad del injerto contra el huésped, las células alogénicas pueden ser irradiadas antes de la infusión.
- 30

### Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

- El *Aspergillus* es un organismo oportunista prototípico. El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, cosmopolita y ubicuo hallado en la naturaleza. Es comúnmente aislado del suelo, restos vegetales y el ambiente aéreo interior. La aspergilosis es un gran espectro de enfermedades causadas por miembros del género *Aspergillus*. Entre todos los hongos filamentosos, el *Aspergillus* es, en general, el más comúnmente aislado en infecciones invasivas. Es el segundo hongo más comúnmente recuperado en micosis oportunistas después de la *Candida* (Kwon-Chung, 1992). El *Aspergillus fumigatus* es también la causa más común de aspergilosis invasiva (IA; del inglés, invasive aspergillosis).
- 35

- La IA es una infección fulminante y muy letal que es común en pacientes inmunocomprometidos (Bodey y Vartivarian, 1989; Denning, 1998). La inmunosupresión es el principal factor que predispone al desarrollo de infecciones oportunistas (Ho y Yuen, 2000). Es muy común la colonización del tracto respiratorio. La infección se inicia tras la inhalación de conidios (esporas fúngicas) por pacientes inmunocomprometidos. Los conidios son eficazmente eliminados de los pulmones en los individuos sanos, pero en pacientes inmunocomprometidos pueden germinar para formar hifas que invaden los tejidos circundantes, lo que da lugar a una neumonía grave y progresiva que se puede diseminar posteriormente a otros órganos. La manifestación clínica y la gravedad de la enfermedad dependen del estado inmunológico del paciente (Bennett, 1995). Una resistencia disminuida del huésped a causa de factores tales como una enfermedad debilitante subyacente, una neutropenia asociada a quimioterapia, una alteración de la flora normal o una respuesta inflamatoria debida al uso de agentes antimicrobianos y esteroides, puede predisponer a los pacientes a sufrir una colonización, una enfermedad invasiva o ambas cosas (Morrison, Haake et al., 1993).
- 40
- 45
- 50

La terapia para la IA se asocia con malos resultados, con un índice global de mortalidad de aproximadamente 60%

(Stevens, Kan et al., 2000). La IA es un problema especialmente serio después de un trasplante de médula ósea (BMT; del inglés, *bone marrow transplantation*) a causa de la inmunosupresión inducida por esteroides y la neutropenia inducida por quimioterapia (Peterson, McGlave et al., 1983; Meyers, 1990).

Los agentes antifúngicos aprobados para el tratamiento de la IA presentan índices de respuesta clínicos que varían de 33% a 52% (Patterson, 2002). Las terapias actuales para la IA incluyen: voriconazol (Herbrecht, Denning et al., 2002); anfotericina B, que causa nefrotoxicidad en el 80% de los pacientes (Wingard, Kubilis et al., 1999); anfotericina B liposómica, que es una formulación menos nefrotóxica (Walsh, Finberg et al., 1999) pero puede ser hepatotóxica y es muy cara; itraconazol, que presenta interacciones con muchos fármacos (Caillot, 2003); extirpación quirúrgica de tejido infartado (Matt, Bernet et al., 2003); y caspofungina, recientemente aprobada por la "US Food and Drug Administration" como terapia de salvamento para pacientes con IA refractarios o intolerantes a otras terapias. Sin embargo, a pesar de una terapia antifúngica agresiva, el pronóstico para la IA en pacientes sometidos a BMT sigue siendo muy malo, con índices de mortalidad de 90% o más (Denning y Stevens, 1990; Denning, 1996).

Puesto que los resultados de los tratamientos siguen siendo subóptimos para la IA, se requieren nuevas estrategias para terapia. Se piensa que los métodos que pueden estimular la inmunidad celular (Th1) son los más eficaces en el tratamiento de infecciones víricas y fúngicas oportunistas.

#### Inmunidad Th1/Th2

La inmunidad adaptativa se caracteriza como Th1 o Th2 dependiendo del tipo predominante de célula T CD4+ implicada en la respuesta. El balance de citocinas producidas por células Th1 y células Th2 es un factor clave que influye en el carácter de una respuesta inmune. La división funcional de los linfocitos CD4+ en los subconjuntos Th1 y Th2 se basa en su perfil de citocinas. Las células Th1 producen interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), pero no IL-4. Las células Th2 producen IL-4 e IL-10, pero no IFN- $\gamma$  (Mosmann y Coffman, 1989; Romagnani, 1991). Las citocinas producidas por estos dos subconjuntos son mutuamente inhibitorias y establecen una regulación cruzada recíproca. Las células Th1 inhiben la proliferación de células Th2, y las células Th2 inhiben la producción de citocinas por células Th1 (Fiorentino, Bond et al., 1989). Esta regulación cruzada da lugar a una respuesta inmune polarizada Th1 o Th2 hacia patógenos que puede determinar la resistencia del huésped o la susceptibilidad a la infección. Las células Th1 se diferencian en presencia de la IL-12 (y son potenciadas por la IL-18) secretada por células dendríticas (DC; del inglés, *dendritic cells*), mientras que las células Th2 se diferencian bajo la influencia de la IL-4 producida por células NKT, basófilos, eosinófilos y mastocitos. Una respuesta Th1 en una infección protozoaria, vírica o fúngica se asocia con resistencia, mientras que una respuesta Th2 a estos patógenos se asocia con enfermedad (Kawakami, 2003).

#### Control natural de infecciones

La activación de mecanismos inmunes tanto innatos como adaptativos es esencial para el control de una infección fúngica por el huésped. Los mecanismos efectores del sistema inmune innato son una defensa esencial frente a la IA (Roilides, Katsifa et al., 1998). La resistencia a una infección requiere una actividad antifúngica innata intacta de las células fagocíticas pulmonares que actúan en un entorno citocínico rico en TNF- $\alpha$  e IL-12, así como la presencia de células T intersticiales que producen IL-2 e IFN- $\gamma$  (Cenci, Mencacci et al., 1998). Los macrófagos alveolares residentes ingieren y matan conidios en reposo, mientras que los neutrófilos atacan a las hifas que germinan de los conidios que escapan de la vigilancia de los macrófagos (Schaffner, Douglas et al., 1982). La eficacia de esta respuesta inmune es evidente a partir de la observación de que una estimulación, incluso con un gran número de conidios, no consigue causar la enfermedad en animales inmunocompetentes (Dixon, Polak et al., 1989).

Las células dendríticas (DC) son las células inmunes innatas reconocidas como iniciadores de la respuesta inmune a patógenos, incluyendo *Aspergillus*, y sirven como un puente entre las inmunidades innata y adaptativa. Las DC desempeñan un papel fundamental en la vigilancia de patógenos en las superficies mucosas (Banchereau y Steinman, 1998). Se ha descrito una densa red de DC en los tractos respiratorios (Pollard y Lipscomb, 1990). En el estado de reposo, las DC del tracto respiratorio están especializadas en la incorporación y el procesamiento del antígeno (Ag), pero no en su presentación, requiriendo esto último señales de maduración de citocinas (Stumbles, Thomas et al., 1998).

Las DC inmaduras del tracto respiratorio reconocen y fagocitan el hongo. Tras la fagocitosis y la señalización procedente de citocinas inflamatorias, tal como el TNF-, las DC se vuelven activas y migran luego como DC maduras a los ganglios linfáticos (Bozza, Gaziano et al., 2002; Bauman, Huffnagle et al., 2003). A su vez, las DC maduras activan células T naífs en los ganglios linfáticos por medio de la presentación del antígeno fúngico en el contexto de moléculas de los MHC I y MHC II, concurrentemente con la expresión de moléculas coestimulantes. La producción de citocinas por las DC determina el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa Th1 o Th2 (Huffnagle y Deepe, 2003).

En modelos murinos de aspergilosis, las citocinas Th1 se correlacionan con protección frente a la enfermedad

mientras que las citocinas Th2 se correlacionan con susceptibilidad (Nagai, Guo et al., 1995; Cenci, Perito et al., 1997). El desarrollo de una inmunidad adaptativa protectora está asociado con la activación de células Th1 que producen IFN- $\gamma$  y macrófagos que producen IL-12. Consistentemente con esta observación, la neutralización de la citocina Th2 IL-4 o la administración de la citocina Th1 IFN- $\gamma$  ejerce un efecto curativo sobre la infección por *Aspergillus*, mientras que la neutralización de IFN- $\gamma$  y una producción aumentada de la citocina Th2 IL-10 dan lugar a una patología aumentada (Nagai, Guo et al., 1995). También se ha mostrado que las respuestas inmunes Th1 controlan exitosamente la IA en pacientes con malignidades hematológicas (Hebart, Bollinger et al., 2002).

#### Inmunidad después del arraigo ("engraftment")

Los pacientes con una respuesta inmune celular deteriorada están predispuestos al cáncer y la infección. La inmunidad celular deteriorada puede ser desencadenada por la presencia de enfermedades malignas o víricas, o iatrogénicamente a través de fármacos inmunosupresores, trasplante, quimioterapia o irradiación. Inmunidad celular deteriorada y enfermedad se correlacionan con desequilibrios en las citocinas Th1/Th2 en favor de la inmunidad Th2 y la función efectora (Shurin, Lu et al., 1999; Kidd, 2003). En enfermedades infecciosas tales como infección crónica por el virus de la hepatitis C (Fan, Liu et al., 1998), lepra (Yamamura, 1992), infecciones por helmintos, protozoos y retrovirus (Gazzinelli, Makino et al., 1992; Sher, Gazzinelli et al., 1992) y sida (Clerici y Shearer, 1993), y como parte del proceso de envejecimiento (Deng, Jing et al., 2004), están presentes respuestas Th2 potenciadas que crean un estado inmunosuprimido.

En el marco del BMT alogénico, las infusiones de células alogénicas provocan un efecto antitumoral llamado el efecto del injerto contra el tumor (GVT; del inglés, *graft versus tumor*), efecto mediado a través de la potenciación de la inmunidad Th1 (Jung, Foley et al., 2003). La inmunidad Th1 potenciada después de un BMT alogénico también se correlaciona con una eficaz vigilancia inmune para la prevención o el retraso en la recaída del cáncer (Guo, Qiao et al., 2004). Sin embargo, los efectos beneficiosos del GVT son a menudo compensados por la aparición de la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD; del inglés, *graft versus host disease*), que sigue siendo la principal complicación del BMT alogénico.

La GVHD es iniciada por células T alorreactivas del donante que reconocen antígenos leucocitarios humanos (HLA; del inglés, *human leukocyte antigens*) extraños del huésped. La desregulación de redes citocínicas es la causa principal de la GVHD (Krenger y Ferrara, 1996). La liberación de citocinas Th1 predomina en la GVHD (Rus, Svetic et al., 1995; Ochs, Blazar et al., 1996; Das, Imoto et al., 2001), mientras que las células Th2 inhiben la letalidad de la GVHD (Fowler, Kurasawa et al., 1994). La terapia para la GVHD crónica es muy inmunosupresora y se debe continuar durante un tiempo prolongado. La terapia primaria más ampliamente empleada para el tratamiento de la GVHD crónica es un régimen de ciclosporina A (CSA) y prednisona. El tratamiento tanto con CSA (Kim, Cho et al., 2000) como con prednisona (Elenkov, 2004) tiende a inhibir la inmunidad Th1 y promover la inmunidad Th2.

El control de la GVHD requiere la supresión de mecanismos inmunes celulares y la potenciación de la inmunidad Th2. La inmunosupresión para controlar la GVHD hace a los pacientes susceptibles a una infección oportunista de una gran variedad de patógenos. Estas infecciones, incluyendo la infección por *Aspergillus*, son la causa principal de muerte debida a una GVHD, seguidas por una insuficiencia orgánica progresiva procedente de la respuesta inmune de la GVHD crónica.

Los pacientes inmunosuprimidos presentan niveles elevados de IL-10 en el plasma. La IL-10 es producida por linfocitos Th2, macrófagos, mastocitos y células B (Moore, O'Garra et al., 1993) y tiene potentes propiedades inmunosupresoras, capaces de potenciar respuestas inmunes Th2 e inhibir la diferenciación de una respuesta Th1 (de Vries, 1995). El tratamiento de la GVHD con glucocorticoides potencia directamente la inducción de células T que producen IL-10. Se sabe que la IL-10 inhibe la producción de IL-12 y la expresión de Ags del MHC de clase II y moléculas coestimulantes por macrófagos, monocitos y diversos tipos de células dendríticas (Moore, de Waal Malefyt et al., 2001). Además, el tratamiento de células dendríticas con IL-10 contribuye a un estado de anergia en células T activadas por aloantígenos (Groux, Bigler et al., 1996; Steinbrink, Wolf et al., 1997). El *Aspergillus* también es capaz de estimular directamente la producción de IL-10 (Clemons, Grunig et al., 2000). Se ha mostrado que antígenos corpusculares de *Aspergillus* provocan respuestas Th2 en ratones Balb/c (Kurup, Seymour et al., 1994).

Por lo tanto, el reto de diseñar una inmunoterapia para tratar la IA y otras infecciones oportunistas en el marco de un BMT después del arraigo es diseñar un método para potenciar la inmunidad Th1 anti-patógeno en un marco inmunosuprimido, predispuesto a Th2, sin exacerbar la GVHD.

#### Terapia con células alogénicas

Con objeto de desarrollar una inmunoterapia eficaz para la IA y otras infecciones oportunistas en el marco de un BMT después del arraigo, es necesario estimular primero la inmunidad innata e inducir luego una respuesta inmune adaptativa Th1, específica para hongos (o específica para otros patógenos), contra un escenario de fármacos inmunosupresores, así como una existente y acusada inmunidad hacia el patógeno nocivo, sesgada a Th2. Un reto adicional es la necesidad de provocar una inmunidad antifúngica (o específica para otros patógenos) Th1 en este

escenario sin la estimulación concurrente de una GVHD mediada por Th1.

En general, la generación de una eficaz respuesta inmune adaptativa Th1 requiere una cascada definida de procesos inmunológicos que deben tener lugar bajo condiciones rigurosamente controladas. La infusión de células alogénicas incompatibles en cuanto a HLA a un huésped inmunocomprometido provoca una potente respuesta de alorreconocimiento del huésped, capaz de desencadenar esta cascada de procesos. Estos procesos incluyen: (i) la activación de mecanismos efectores innatos que causan el desprendimiento del antígeno (Ag) fúngico (u otro); (ii) la incorporación y el procesamiento del Ag fúngico (u otro) por células dendríticas en los pulmones; (iii) la migración de las células dendríticas a los ganglios linfáticos de drenaje y la subsiguiente presentación del Ag fúngico (u otro) a células T naífs en el contexto de moléculas del MHC I o MHC II; (iv) el acondicionamiento del microentorno del ganglio linfático para la diferenciación de células efectoras Th1; (v) la migración y extravasación de células efectoras Th1 primariamente sensibilizadas, específicas del hongo (u otro), al sitio de la infección; y (vi) el reconocimiento de células efectoras y la eliminación del hongo (u otro patógeno) del tejido. Todos estos procesos deben tener lugar en el contexto de un entorno prolongado de citocinas Th1 proinflamatorias. El que no se produzca alguno de estos procesos en el correcto contexto de citocinas dará lugar a una inadecuada respuesta inmune antifúngica (u otra).

Por lo tanto, con objeto de crear un entorno conducente al desarrollo de una inmunidad antifúngica (u otra) Th1 *de novo*, primero es necesario inducir la expresión de citocinas Th1 y mantener este entorno de citocinas durante la activación de células efectoras inmunes innatas y hasta el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa Th1 antifúngica (u otra). La presencia de citocinas Th1 infrarregulará las citocinas Th2 existentes.

Con objeto de cambiar inicialmente el existente entorno inmune dominado por Th2 en el huésped inmunocomprometido y fúngicamente infectado, se infunden linfocitos alogénicos incompatibles en cuanto a HLA, preferiblemente linfocitos Th1 activados que expresan una alta densidad de CD40L. La infusión de células alogénicas incompatibles en cuanto a HLA provoca un estallido de citocinas Th1 desde células inmunes del huésped como parte de la respuesta de rechazo. Se sabe que se produce una predominancia de citocinas Th1 después de una infusión de células alogénicas (Carayol, Bourhis et al., 1997). Además, se ha observado que, en reacciones de linfocitos mixtos, las células alogénicas del estimulador provocan la producción de citocinas Th1 por células del respondedor (DuPont y Hansen, 1976; Tounouz, Denys et al., 1995). Además, la estimulación de células T por múltiples incompatibilidades de HLA en macacos rhesus facilita la polarización hacia una respuesta proinflamatoria de tipo Th1 *in vitro* e *in vivo* en los receptores de trasplantes (Lobashevsky, Wang et al., 1998). Hay también una predominancia de citocinas de tipo Th1 en el desarrollo de una GVHD humana inducida por la infusión de células alogénicas (Das, Imoto et al., 2001).

Clínicamente, los números reducidos y la función deteriorada de los neutrófilos son con mucho los factores de riesgo mejor caracterizados para una aspergilosis invasiva (Wald, Leisenring et al., 1997). La producción de citocinas Th1 como resultado de la infusión de células alogénicas servirá para activar células efectoras innatas antifúngicas alternativas. Las citocinas Th1 (predominantemente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-12 e IL-18) producidas como resultado de la infusión de células alogénicas y de la respuesta de rechazo activan células efectoras inmunes innatas alternativas tales como células NK y DC, y también activan células T (Antin y Ferrara, 1992). A su vez, estas células producen citocinas Th1 que crean una red de citocinas autocrinas y paracrinas que sirve tanto para mantener como para potenciar la producción de citocinas Th1 (Mailliard, Son et al., 2003). Las células inmunes innatas activadas producen IL-12 e IL-18, que actúan sinérgicamente en un bucle de retroalimentación autocrina para potenciar la producción de IFN- $\gamma$  (Micallef, Tanimoto et al., 1997; Okamura, Kashiwamura et al., 1998). La producción de IFN- $\gamma$  por células NK activadas actúa en el proceso de sensibilización primaria de células Th1, lo que respalda a su vez la expansión y la función efectora de CTLs CD8+ en la respuesta inmune adaptativa Th1 (Trinchieri, 1995).

La activación de células NK y DCs por las citocinas Th1 producidas en respuesta a la infusión alogénica es un elemento esencial para generar *de novo* el desprendimiento de Ags fúngicos y la presentación a células T en un entorno de conducción por Th1. Las células NK son esenciales para la protección frente a virus, parásitos, bacterias y también hongos (Trinchieri, 1989). Se ha mostrado que, en huéspedes inmunocomprometidos, el reclutamiento de células NK a los pulmones es un mecanismo de defensa eficaz frente a la IA (Morrison, Park et al., 2003). Las DCs organizan la resistencia inmune antifúngica global en los pulmones y se ha hallado además que son esenciales en la activación de respuestas Th1 a *Aspergillus in vivo* (Bozza, Gaziano et al., 2002) e *in vitro* (Grazziutti, Przepiorka et al., 2001).

Las DCs se vuelven activas en presencia de citocinas Th1. Las DCs activadas deberían circular posteriormente a ganglios linfáticos de drenaje después de la incorporación del Ag fúngico. Estas DCs presentarán una capacidad potenciada para la presentación de productos antigénicos de estos patógenos a células T a través de las vías del MHC I y el MHC II. Las DCs activadas son capaces de producir IL-12 después de la exposición al Ag fúngico, y se ha mostrado que la producción de IL-12 por DC induce inmunidad Th1 (Heufler, Koch et al., 1996). Se plantea además la hipótesis de que las células T del huésped activadas por citocinas Th1 que resultan de la respuesta alogénica de rechazo expresarán el marcador superficial CD40L. El CD40L se expresa en la superficie de células T

activadas. La ligación de CD40 de DC por células T que expresan CD40L desencadena una producción aumentada de IL-12 de DC y potencia la suprarregulación de moléculas coestimulantes y la capacidad para presentar Ag (Cella, Scheidegger et al., 1996; Kelsall, Stuber et al., 1996). La interacción CD40-CD40L es crucial para la sensibilización primaria, dependiente de IL-12, de células Th1 *in vivo* (Kelsall, Stuber et al., 1996).

5 Los antígenos de MHC extraños expresados por las células alogénicas infundidas son incorporados por APCs del huésped de un modo convencional autorrestringido por el MHC (alorreactividad indirecta) y/o son directamente reconocidos en la superficie de las células infundidas por el receptor de células T (TCR; del inglés, T-cell receptor) de las células T del huésped (alorreactividad directa). La respuesta alogénica del huésped por cualquiera de los dos mecanismos dará lugar al rechazo de las células infundidas y al establecimiento de una inmunidad adaptativa Th1  
10 específica para los aloantígenos (Ciubotariu, Tsang et al., 2002). Se propone la hipótesis de que, en presencia de citocinas Th1 adyuvantes, se desarrollará en el huésped una reserva de células de memoria Th1 específicas para los aloantígenos. Las subsiguientes infusiones de células alogénicas activarán estas células de memoria aloespecíficas resultantes. Las células de memoria activadas expresan receptores CCR5, CCR2 o CCR3 de quimiocinas, que estimulan la suprarregulación de receptores de adhesión en el endotelio pulmonar y permiten la  
15 extravasación a sitios de infección fúngica local (Sallusto, Lanzavecchia et al., 1998). La infiltración inespecífica y la producción citocínica de células de memoria Th1 activadas en el sitio de la infección fúngica ejercen un potente efecto estimulante sobre células inmunes innatas y adaptativas locales que responden al hongo.

20 Cuando el sistema inmune resulta influido por una alta frecuencia de células de memoria específicas para un antígeno patógeno dado, la activación de estas células durante una infección por patógenos no relacionados puede potenciar significativamente la eliminación de la infección no relacionada (Selin, Varga et al., 1998). Se ha mostrado que la patogénesis de infecciones víricas en el pulmón está relacionada con la experiencia del huésped con patógenos no relacionados (Chen, Fraire et al., 2003). Este mecanismo inmunológico es conocido como "inmunidad heteróloga" (Selin, Varga et al., 1998; Chen, Fraire et al., 2003). Por lo tanto, múltiples infusiones de células alogénicas pueden crear una reserva de memoria que potenciará la inmunidad antifúngica (o contra otro organismo oportunista) mediante el mismo mecanismo o un mecanismo similar.  
25

El respaldo de fondo para este descrito mecanismo de inmunidad hacia organismos oportunistas mediante una inmunidad Th1 potenciada hacia un aloantígeno que causa un cambio en la existente inmunidad Th2 hacia una infección residente, por una inmunidad Th1, viene respaldado por diversas observaciones. Por ejemplo, se produce el cambio opuesto en una infección con *Schistosoma mansoni*, que induce una respuesta inmune Th2. Esta  
30 respuesta causa una infrarregulación de las respuestas Th1 existentes y una elevación de respuestas Th2 a inmunógenos extraños no relacionados (Kullberg, Pearce et al., 1992). La patología mediada por Th1 en modelos de enfermedad en ratón puede ser mejorada mediante una infección concurrente con un parásito no relacionado que provoca inmunidad Th2 (Whary y Fox, 2004). La inmunoterapia adoptiva puede inducir actividad antitumoral a través de la producción de citocinas Th1, aun cuando las células transferidas no sean capaces de reconocer antígenos  
35 tumorales. Por ejemplo, células Th1 policlonales administradas a ratones con tumores no inmunogénicos dieron lugar al rechazo del 60-90% de los tumores. Los animales curados desarrollaron una memoria tumoralmente específica y fueron capaces de rechazar nuevas estimulaciones con el mismo tumor (Saxton, Longo et al., 1997). Similarmente, la inyección conjunta de antígeno PPD y un clon Th1 específico de PPD en un modelo murino de tumor metastásico produjo efectos antimetastásicos y actividad antitumoral (Shinomiya, Harada et al., 1995).

40 El que la inmunidad Th1 hacia el hongo pueda ser inducida en un huésped inmunosuprimido viene respaldado por la observación de que la inmunización de ratones, inmunosuprimidos con cortisona, con múltiples inyecciones de *A. fumigatus* confiere protección frente a una nueva estimulación con una dosis letal de conidios en el contexto de una producción aumentada de citocinas Th1 (Centeno-Lima, Silveira et al., 2002). Además, la inmunidad Th1 puede ser conservada (Williams, Adams et al., 2003) y también inducida en huéspedes quiméricos (Ildstad, Wren et al., 1985; Ruedi, Skyes et al., 1989).  
45

En conclusión, múltiples infusiones de células alogénicas incompatibles en cuanto a HLA, preferiblemente células Th1 activadas que expresan una elevada densidad de CD40L, a huéspedes inmunocomprometidos con una infección oportunista causan un estallido de citocinas Th1 que servirá como el escenario en que células activadas de los sistemas inmunes tanto innato como adaptativo generarán una respuesta inmune Th1 *de novo* contra el patógeno.  
50

Las infusiones de células alogénicas son preferiblemente células Th1 activadas procedentes de un donante con HLA incompatible. Las células alogénicas deberían ser irradiadas antes de la infusión a pacientes inmunocomprometidos para evitar el arraigo y la GVHD.

Un protocolo preferido es someter primero al paciente a una sensibilización primaria con una infusión intravenosa de  
55 células alogénicas en dosis de entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{10}$  células. Después de al menos 7 días, se inyectan células alogénicas adicionales mezcladas con una fuente de antígenos del patógeno (preferiblemente organismos congelados/descongelados) y se inyecta la mezcla intradérmicamente. Si es necesario, como inyecciones de

refuerzo se pueden administrar inyecciones intradérmicas o intravenosas adicionales de la fuente de aloantígeno sola o mezclada con la fuente de antígenos del patógeno.

### Ejemplos

#### El modelo animal

- 5 Se subcultivó *A. fumigatus* en medios inclinados de agar y patata-dextrosa durante 5 días a 27 °C. Los conidios de los cultivos se recogieron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate-buffered saline) que contenía Tween 20 al 0,1%. Se centrifugó la suspensión de conidios durante 2 minutos a 13.000 x g, se desechó el sobrenadante y se contaron las células. Se ajustó la concentración para administrar  $10^7$  o  $10^8$  conidios por ratón en un volumen de 20 µl de PBS-Tween 20 estériles. Los ratones fueron inmunosuprimidos mediante la administración intraperitoneal de cuatro dosis de 250 mg/kg de acetato de cortisona de la manera siguiente: (a) 3 días antes de la infección, (b) el día de la infección, y (c) el día 2 y el día 4 después de la infección. Los ratones tratados con cortisona e infectados con un gran inóculo de conidios de *A. fumigatus* desarrollaron una infección letal, mientras que los ratones inmunocompetentes infectados con el mismo inóculo fueron capaces de controlar al hongo.

#### Células Th1 alogénicas

- 15 Se prepararon células Th1 a partir de ratones Balb/c. Se recogieron células esplénicas de los ratones y se lisaron con ACK. Se generaron células T1 usando glóbulos magnéticos revestidos con anti-CD3 y anti-CD28 (CD3/CD28), en una relación de glóbulos/células T de 3:1, con 20 UI/ml de IL-2 humana recombinante, 20 ng/ml de rhIL-7, 10 ng/ml de IL-12 murina recombinante, 10 µg/ml de mAb anti-IL-4 murina y N-acetilcisteína 3,3 mM en medio completo RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, penicilina-estreptomicina-glutamina, aminoácidos no esenciales (NEAA; del inglés, non-essential amino acids) y 2-mercaptoetanol (2-ME; Life Technologies). De los días 2 a 6 se añadió diariamente medio completo que contenía citocinas para mantener una concentración celular de entre 0,2 y  $1,0 \times 10^6$  células/ml. Sin embargo, sólo se añadió rIL-12 el día 0 de cultivo. Después de 5 días en cultivo, las células fueron mezcladas con partículas biomagnéticas revestidas con anti-CD3/anti-CD28 (Miltenyi) y fueron recogidas para su uso el día 6.

#### Ejemplo nº 1

Se inoculó una dosis letal ( $10^7$  conidios) de hongo a ratones C57BL/6 inmunosuprimidos. Los ratones fueron divididos en un grupo testigo no tratado, un grupo de una sola infusión alogénica y un grupo vacunado (n = 8 en cada grupo).

- 30 El grupo de una sola infusión alogénica recibió una infusión intravenosa de  $1 \times 10^6$  células Th1 CD4+ alogénicas activadas (irradiadas) el día 7 después del inóculo.

El grupo vacunado recibió una dosis de sensibilización primaria de  $1 \times 10^6$  células Th1 CD4+ alogénicas activadas (irradiadas) el día 7 después del inóculo. El día 14, se inyectaron intradérmicamente  $1 \times 10^4$  células Th1 CD4+ alogénicas activadas, mezcladas con el sobrenadante de  $10^6$  conidios que habían sido previamente sometidos a 2 ciclos de congelación y descongelación, en la pata trasera de los ratones.

- 35 La infección de los ratones inmunosuprimidos dio lugar a una mortalidad de 100% después de 5-7 días, mientras que todos los ratones inmunocompetentes infectados sobrevivieron. Las necropsias de órganos de los ratones muertos revelaron una invasión fúngica y la destrucción de los órganos observados (cerebro, pulmones y riñones).

Los ratones con una sola infusión sobrevivieron una media de 22 días después de la infección (intervalo de 12-28 días).

- 40 5 de los 8 ratones vacunados sobrevivieron más de 30 días sin evidencia alguna de infección.

Estos datos demuestran que la infusión de células alogénicas puede conducir al control del hongo y a la supervivencia de los ratones.

Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a realizaciones preferidas, los trabajadores expertos en la técnica reconocerán que se pueden realizar cambios en la forma y el detalle.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende células alogénicas para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido, células alogénicas que comprenden células Th1 activadas capaces de proliferación y que provocan una respuesta inmune por las células inmunes del huésped contra el patógeno infeccioso, y las células inmunes del huésped rechazan las células alogénicas.
2. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde el patógeno infeccioso es un miembro del género *Aspergillus*.
3. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde la infusión de las células alogénicas activadas da lugar a la producción de citocinas Th1 por el huésped; óptimamente, en donde las citocinas Th1 incluyen predominantemente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-12 o IL-18 o cualquier combinación de las mismas.
4. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde la infusión de células alogénicas da lugar a la maduración de células dendríticas del huésped para producir IL-12.
5. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde la respuesta inmune da lugar a la expresión del marcador superficial CD40L en células T del huésped.
6. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde la respuesta inmune es la activación de células Th1; opcionalmente, en donde la activación de células Th1 es el resultado de una producción de citocinas Th1; opcionalmente, en donde la respuesta inmune da lugar a células de memoria Th1 específicas para aloantígenos de la composición.
7. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde la respuesta inmune da lugar a la activación de células NK y células T del huésped.
8. La composición para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 1, en donde las células alogénicas son linfocitos Th1.
9. Una infusión alogénica que comprende células Th1 activadas capaces de proliferación para uso en la activación de células asesinas naturales del huésped y células dendríticas del huésped en un huésped inmunocomprometido, que da lugar a la producción de citocinas Th1 por las células inmunes del huésped.
10. La infusión alogénica para uso en la activación de células asesinas naturales del huésped y células dendríticas del huésped en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 9, en donde la infusión alogénica da lugar a la activación de células T del huésped que dan lugar a la expresión del marcador superficial CD40L.
11. La infusión alogénica para uso en la activación de células asesinas naturales del huésped y células dendríticas del huésped en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 9, en donde la infusión alogénica da lugar al desarrollo de una reserva de células de memoria Th1 en el huésped.
12. La infusión alogénica para uso en la activación de células asesinas naturales del huésped y células dendríticas del huésped en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 11, en donde las células de memoria Th1 del huésped expresan receptores CCR5, CCR2 o CCR3 de quimiocinas o cualquier combinación de los mismos.
13. Células alogénicas incompatibles para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido, células alogénicas incompatibles que comprenden células Th1 activadas capaces de proliferar y provocar una respuesta inmune por las células inmunes del huésped contra el patógeno infeccioso, y las células inmunes del huésped rechazan las células alogénicas.
14. Las células alogénicas incompatibles para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 13, en donde el patógeno infeccioso es un miembro del género *Aspergillus*.
15. Las células alogénicas incompatibles para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 13, en donde las células alogénicas son linfocitos Th1.
16. Las células alogénicas incompatibles para uso en el tratamiento de una infección por patógenos oportunistas en



un huésped inmunocomprometido según la Reivindicación 13, en donde la respuesta inmune por parte del huésped es la activación de células Th1 del huésped; opcionalmente, en donde la activación de células Th1 del huésped es el resultado de una producción de citocinas Th1; opcionalmente, en donde la respuesta inmune da lugar a células de memoria Th1 específicas para aloantígenos de la composición.