(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 667 476**

(51) Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2010** **PCT/US2010/059450**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011** **WO11072006**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010** **E 10836605 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2510106**

(54) Título: **Método para invertir la supresión inmunitaria de células de Langerhans**

(30) Prioridad:

08.12.2009 US 267590 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2018

(73) Titular/es:

IRX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
140 West 57th Street Suite 9C
New York, NY 10019, US

(72) Inventor/es:

EGAN, JAMES;
KAST, MARTIN y
BRANDWEIN, HARVEY

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 667 476 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para invertir la supresión inmunitaria de células de Langerhans

Campo Técnico

La presente invención se refiere a la inversión de la supresión inmunitaria. En particular, la presente invención se refiere a un agente biológico primario derivado de células para el uso en la inversión de la supresión inmunitaria en el papilomavirus humano (HPV) y el tratamiento de la infección por HPV.

Antecedentes de la invención

Los papilomavirus humanos (HPV) son una familia de virus de ADN de transmisión sexual con más de 100 genotipos diferentes. Los genotipos se dividen en las categorías de bajo riesgo y alto riesgo que se basan en el espectro de lesiones que inducen. Los tipos de bajo riesgo inducen principalmente condilomas genitales benignos y lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo mientras que los tipos de alto riesgo están asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales y se pueden detectar en >99% de los cánceres de cuello uterino, con HPV16 encontrado en aproximadamente 50% de los casos. En los Estados Unidos, un 75% estimado de la población sexualmente activa adquiere al menos un tipo de HPV genital durante su vida.

Aunque la morbidez y la mortalidad provocadas por el cáncer de cuello uterino se pueden reducir con una prueba de Papanicolaou (Pap) eficaz, detección temprana y tratamiento, nada de esto está disponible en los países en desarrollo, el origen de muchos inmigrantes hacia los EE. UU. En los países en desarrollo, el cáncer de cuello uterino sigue siendo la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres. De forma importante, se espera que la carga de esta enfermedad se incremente drásticamente en las próximas décadas debido a los cambios demográficos. Incluso en los EE. UU., donde los programas de cribado han reducido la tasa global de cáncer invasivo, existe una disparidad en la incidencia del desarrollo del cáncer entre mujeres blancas no hispanas, negras, hispanas y económicamente desfavorecidas. La penetración de la actual vacuna preventiva aprobada por la FDA para HPV, GARDASIL® (Merck), en los EE. UU. ha sido decepcionante. La vacuna fue administrada a solo 25% de las niñas de 13-17 años, 10% de todas las mujeres de 18-26 años y se administró solamente a 1,1% de las mujeres hispanas en 2007. Por otra parte, la vacuna es ineficaz en mujeres que ya han sido infectadas con el virus, hayan desarrollado o no lesiones cervicouterinas (pre)cancerosas. Dado el riesgo vital de la infección por HPV y el hecho de que las poblaciones muy subrrepresentadas en la cobertura vacunal continuarán desarrollando enfermedades cervicouterinas y otras relacionadas con HPV a una velocidad alarmante, está claro que existe una gran necesidad de enfoques terapéuticos que mitiguen los efectos carcinogénicos después de que se haya producido la infección viral.

Los HPV son virus no líticos sin envuelta. Sus regiones codificantes del genoma se indican E y L por las siglas en inglés de proteínas "tempranas (early)" y "tardías (late)". Las proteínas E cumplen funciones reguladoras vitales para la replicación genómica, dos de las cuales (E6 y E7) representan un papel significativo en la oncogénesis, mientras que las dos proteínas L (L1 y L2) son las proteínas de la cápside autoensamblantes responsables del empaquetamiento de ADN y el ensamblaje de los viriones. La infección por papilomavirus es única ya que su ciclo vital productivo está acoplado a la diferenciación celular de células epiteliales basales epidérmicas o mucosas hospedadoras proliferativas. El HPV sigue siendo suprabasal a lo largo de su ciclo vital y por lo tanto solo entra en contacto con células de la epidermis tales como células basales y células de Langerhans (LC). Debido al acoplamiento de su ciclo vital a la diferenciación celular, es difícil producir viriones de HPV in vitro. Como una alternativa a los viriones de HPV, se han desarrollado partículas viroides de HPV (VLP) y pseudoviriones de HPV, capaces de soportar plásmidos indicadores, y ambas son tecnologías que se establecen en el laboratorio de los Solicitantes.

La persistencia de una infección por HPV de alto riesgo es un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Aunque una mayoría de las mujeres infectadas con HPV depuran el virus, el tiempo transcurrido para hacerlo puede variar de muchos meses a años. Aproximadamente 15% de las mujeres que tienen infecciones por HPV de alto riesgo no inician una respuesta inmunitaria eficaz contra HPV, permitiendo que el virus persista durante décadas. La velocidad de depuración lenta y la falta de inmunidad eficaz indica que HPV se escapa de algún modo de la respuesta inmunitaria.

El HPV ha desarrollado una variedad de mecanismos de escape que evitan la eliminación inmediata, permitiendo la replicación viral y la persistencia en el hospedador. Los Solicitantes han mostrado que el HPV manipula las LC como un mecanismo de escape inmunitario, mostrado en la FIGURA 4. Las LC situadas en la capa epitelial de la piel y la mucosa son las APC primeras y críticas en entrar en contacto con HPV. Por consiguiente, las LC son responsables de iniciar una respuesta inmunitaria eficaz contra la infección por HPV. Al reconocer un antígeno extraño, las LC sufren maduración, que consiste en cambios fenotípicos y funcionales incluyendo la regulación al alza de las moléculas coestimulantes CD80 y CD86, MHC clase I y II, receptores de quimiocinas tales como CCR7, secreción de citocinas y quimiocinas y migración a nódulos linfáticos regionales. Los Solicitantes han establecido que las LC

expuestas a VLP de HPV16 L1L2 no regulan al alza moléculas coestimulantes ni receptores de quimiocinas, no secretan citocinas ni quimiocinas y no inician respuestas inmunitarias específicas epitópicamente contra antígenos derivados de VLP de HPV16. En contraste, las DC mieloides son activadas por VLP de HPV16 L1L2 y, una vez activadas, estimulan células T específicas de HPV. Diferentes cascadas de señalización intracelular son iniciadas en DC frente a LC al captar VLP de HPV16 L1L2. Cuando se estimula con VLP de HPV16 L1L2, la ruta de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) se activa en DC mientras que se inactiva en LC. Sin embargo, la ruta del fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K) se activa en LC, conduciendo a una cascada de señalización que da como resultado la inactivación de Akt. Células T específicas de HPV16 E7 pueden reconocer y destruir LC expuestas a VLP quiméricas (cVLP) de HPV16 L1L2-E7, indicando que los péptidos de HPV son presentados por LC después de la internalización de cVLP pero que las VLP de HPV16 L1L2 inhiben la inducción por LC de una respuesta inmunitaria. Tomados conjuntamente, los datos sugieren que las LC presentan péptidos derivados de HPV en ausencia de coestimulación, haciéndose de ese modo tolerogénicas e inmunosupresoras. A su vez, esto puede conducir a la persistencia de la infección por HPV y a un incremento de la probabilidad de desarrollo del cáncer.

Las vacunas profilácticas para HPV inducen altas concentraciones de anticuerpos neutralizadores de HPV y han mostrado gran eficacia hasta 6,5 años de seguimiento y niveles sostenidos de anticuerpos. Sin embargo, en mujeres infectadas con HPV, un estudio de fase 3 no encontró evidencia de depuración viral acelerada en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control, ilustrando concluyentemente la falta de eficacia terapéutica en vacunas preventivas basadas en VLP. Por otra parte, con el tiempo de incubación prolongado del HPV, los varios mecanismos de evasión inmunitaria y solo unos pocos años de observación, todavía se tiene que determinar la eficacia sostenida de las vacunas profilácticas sobre la prevención del cáncer. El hecho de que aproximadamente un tercio del cáncer de cuello uterino esté provocado por tipos de HPV distintos a los actualmente presentes en las vacunas incrementa el alcance del problema. Así, llevará décadas poder detectar un efecto cuantificable sobre las tasas de cáncer de cuello uterino. Mientras tanto, continúa la necesidad de terapias para tratar infecciones por HPV y las lesiones asociadas para los cientos de millones de mujeres de todo el mundo que actualmente están infectadas con HPV de alto riesgo o se infectarán en los próximos años.

Se cita habitualmente que la cirugía, el tratamiento de referencia para pacientes con lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicouterinas (CIN), es hasta 90% eficaz para retirar lesiones CIN cuando se siguen durante un año. Sin embargo, es menos eficaz cuando las mujeres se comprueban durante toda su vida. Más de 80% de las mujeres que se someten a operaciones quirúrgicas volverán a necesitar posteriormente una segunda operación relacionada en casos en los que la cirugía no retira la infección por HPV o cuando la eliminación de un tipo de HPV potencie la reactivación de infecciones por HPV secundarias. Las vacunas terapéuticas que están en desarrollo se dirigen a controlar la enfermedad maligna al activar la propia respuesta inmunitaria celular del paciente y elegir como diana antígenos presentes en las células (pre)cancerosas. Se han desarrollado varias posibles vacunas a lo largo de los últimos quince años; sin embargo, hasta la fecha, no existe una sola vacuna contra el cáncer que haya sido aprobada por the Food and Drug Administration.

Son necesarias intervenciones que eviten que las infecciones por HPV alcancen el estadio de inducir carcinogénesis. Estas intervenciones son factibles, ya que la infección por HPV se puede detectar tempranamente con un estuche de detección de HPV disponible comercialmente (Digene Corp.).

Varias líneas de evidencia apoyan la importancia del sistema inmunitario celular en el control de la patogénesis del HPV y las lesiones cervicouterinas asociadas. En primer lugar, 25-40% de las lesiones levemente displásicas positivas a HPV se resuelven espontáneamente o poco después de una biopsia local, sugiriendo que la inducción de la inflamación local puede estar implicada en la regresión. En segundo lugar, la inmunodeficiencia está asociada con un incremento de la incidencia de infección por HPV. Las verrugas cutáneas y las verrugas genitales regresivas asociadas con HPV tienen a menudo linfocitos T en las lesiones, sugiriendo que las respuestas inmunitarias mediadas por células activas a HPV pueden ser un componente de la regresión de la enfermedad. Tomados conjuntamente, estos estudios ilustran que los regímenes terapéuticos para la infección por HPV y sus enfermedades asociadas deben dirigirse a inducir una fuerte inmunidad celular en la zona de infección.

Por lo tanto, existe una necesidad tanto de un tratamiento inmunológico eficaz de HPV a lo largo de la vida de la mujer como de un método para vencer la supresión inmunitaria inducida por HPV de LC que impide un tratamiento eficaz.

Se conocen formulaciones que comprenden un agente biológico primario derivado de células que contiene IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-gamma y TNF-alfa. Por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6977072 y el documento US2006/0194242 divulgan estas citocinas naturales para el tratamiento de inmunodeficiencias celulares (por ejemplo las caracterizadas por linfocitopenia T). Estas formulaciones también se mencionan en Dueñas-González W y cols. "A pilot study of perilymphatic leukocyte cytokine mixture (IRX-2) as neoadjuvant treatment for early stage cervical carcinoma"; Int Immunopharmacol; 2, 2002, 1007-1016. La divulgación se ocupa del tratamiento del carcinoma cervicouterino usando IRX-2, una afección distinta a la infección viral HPV.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un agente biológico primario derivado de células que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-gamma y TNF-alfa, para el uso en el tratamiento inmunoterapéutico de papilomavirus humano (HPV), al inducir una respuesta inmunitaria a la infección por HPV en un paciente infectado con HPV.

Breve descripción de los dibujos

Otras ventajas de la presente invención se apreciarán fácilmente ya que la misma se entiende mejor con referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considere en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

la FIGURA 1 es un histograma de marcadores fenotípicos expresados en células de Langerhans (LC) (técnica anterior);

la FIGURA 2 es una gráfica que muestra la expresión de CD86 por LC (técnica anterior);

la FIGURA 3 es un diagrama de LC inactivadas frente a LC activadas;

la FIGURA 4 es un diagrama de la tolerización de LC inducida por HPV;

la FIGURA 5 es un diagrama del diseño experimental de experimentos sobre la activación de LC;

la FIGURA 6 es una gráfica de la regulación al alza de marcadores de activación superficiales sobre LC humanas expuestas a HPV16 e IRX-2;

la FIGURA 7 es una gráfica que muestra que IRX-2 induce la migración de LC humanas en ausencia y en presencia de HPV16;

la FIGURA 8 es una gráfica que muestra que las células de Langerhans humanas expuestas a IRX-2 son superiores en la estimulación de células T alogeneicas en presencia de HPV; y

la FIGURA 9 es una gráfica que muestra que células de Langerhans humanas tratadas con IRX-2 después de la exposición a HPV secretan altos niveles de IL-8 e IP-10.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona en general un agente biológico primario derivado de células (IRX-2) para el uso en el tratamiento de HPV (IRX-2). El agente biológico primario derivado de células de la presente invención es eficaz para tratar pacientes con HPV persistente y cuyo sistema inmunitario no es capaz de producir una respuesta eficaz contra HPV.

Según se usa en la presente, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de agente biológico primario derivado de células que es necesaria para alcanzar el resultado deseado de la presente invención, a saber, producir una inversión de la supresión inmunitaria de LC en pacientes infectados con HPV. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad eficaz del agente biológico primario derivado de células que se debe aportar a un paciente particular.

"IRX-2", también conocida como "citopluriquina", es un agente biológico primario derivado de células, natural, derivado de leucocitos, producido bajo estándares de cGMP por glóbulos blancos (células mononucleares) humanos purificados estimulados mediante fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina (CIPRO). Los principales componentes activos son interleucina 1β (IL-1β, también denominada en la presente IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y γ-interferón (IFN-γ). Preferiblemente, la IRX-2 usada en la presente invención incluye estas seis citocinas críticas y solo puede contener estas seis citocinas críticas. IRX-2 también se ha denominado previamente "NCM", una mezcla de citocinas naturales, definida e indicada en las Patentes de EE. UU. Nº 6.977.072 y 7.153.499. Los términos IRX-2, agente biológico primario derivado de células y NCM se usan intercambiablemente en la presente.

Brevemente, IRX-2 se prepara en presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y con la presencia continua o pulsátil de un mitógeno, que en la realización preferida es PHA. Sin embargo, también se pueden usar otros mitógenos. La IRX-2 producida para la administración a pacientes contiene una concentración de IL-1β que varía de 60 - 6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 150 - 1.800 pcg/ml; una concentración de IL-2 que varía de 600-60.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 3.000-12.000 pcg/ml, y concentraciones de IFN-γ y TNF-α que varían de 200-20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pcg/ml.

La IRX-2 también puede contener una concentración de IL-6 que varía de 60-6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 300-2.000 pcg/ml; una concentración de IL-8 que varía de 6000-600.000 pcg/ml, más preferiblemente de 20.000-180.000 pcg/ml; una concentración de TNF-α que varía de 200-20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pcg/ml. Se pueden usar citocinas recombinantes, naturales o pegiladas, o la IRX-2 puede incluir una mezcla de citocinas recombinantes, naturales o pegiladas. La IRX-2 puede contener solamente las citocinas anteriores; sin embargo, se pueden incluir otras citocinas. La IRX-2 de la presente invención puede incluir además otras citocinas recombinantes, naturales o pegiladas tales como IL-7, IL-12, IL-15, GM-CSF (en una concentración que varía de 100-10.000 pcg/ml, más preferiblemente de 500-2.000 pcg/ml) y G-CSF. El método de elaboración de IRX-2 se divulga en las patentes citadas anteriormente así como en la Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 12/423.601.

También son abarcados por la presente invención derivados, fragmentos y péptidos relacionados con las citocinas divulgadas en la presente, en donde estos derivados, fragmentos y péptidos retienen la actividad biológica de sus respectivas citocinas.

Los múltiples componentes activos de citocina de IRX-2 actúan sobre múltiples tipos de células del sistema inmunitario, incluyendo células T y células dendríticas. En pruebas clínicas de pacientes H&NSCC, se mostró que IRX-2 era segura, tolerable y biológicamente activa, dando como resultado tanto supervivencia libre de enfermedad evidente como supervivencia global. Las cantidades fisiológicas de citocinas en IRX-2 se pueden administrar localmente, incluyendo tópicamente, proporcionando una oportunidad de alterar el microambiente en el que las LC encuentran el HPV. Mezclas de citocinas naturales procedentes de medio acondicionado con monocitos o mezclas de citocinas inflamatorias recombinantes que contienen TNFα, IL-1β, IL-6 y PGE2 se han usado tradicionalmente para madurar DC para vacunas contra el cáncer basadas en DC generadas *ex vivo*. Los niveles fisiológicos de citocinas en IRX-2 son muy inferiores que las concentraciones de citocinas recombinantes usadas en la maduración de DC *ex vivo* o en terapias sistémicas con citocinas en dosis altas. Los bajos niveles de citocinas in IRX-2 permiten que se inyecte directamente en los pacientes sin toxicidad significativa.

La IRX-2 también contiene varias citocinas que son mediadores críticos de la activación y la proliferación de células T. La capacidad de IRX-2 para activar tanto DC como células T la hace especialmente atractiva ya que es esta combinación de subgrupos de células inmunitarias la que coordina la respuesta inmunitaria contra células infectadas con virus.

También se pueden administrar otros compuestos junto con IRX-2, tales como inhibidores químicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS), cinc, y combinaciones de los mismos.

El inhibidor químico puede ser cualquier agente quimioterapéutico que no sea inmunosupresor (preferiblemente usado en dosis bajas) y que tenga efectos inmunomoduladores a fin de incrementar la inmunidad y/o una respuesta inmunitaria, p. ej., al inhibir la supresión inmunitaria o mecanismos supresores del cuerpo. Según una realización preferida, el inhibidor químico es un agente antineoplástico, incluyendo, pero no limitado a, agentes alquilantes, antimetabolitos y antibióticos. El inhibidor químico también puede ser un agente inmunomodulador tal como talidomida. El inhibidor químico también puede estar en forma de sal u otra forma compleja. Preferiblemente, el inhibidor químico es el agente alquilante ciclofosfamida (CY).

El NSAID es preferiblemente indometacina (INDO), que es un inhibidor tanto de Coxl como de Coxll. El NSAID también puede ser ibuprofeno o inhibidores de Coxll tales como celecoxib y rofecoxib, o combinaciones de los mismos.

Los cuatro componentes usados conjuntamente (es decir, inhibidor químico, NSAID, agente biológico primario derivado de células y cinc) son capaces de dirigirse al ambiente supresor creado por la diana inmunitaria y restaurar la respuesta inmunitaria celular del paciente. Más específicamente, el inhibidor químico inhibe células T reguladoras; el NSAID invierte la supresión inmunitaria local por prostaglandinas, el agente biológico primario derivado de células activa células dendríticas, estimula células T y protege a las células T de la apoptosis; y el cinc proporciona nutrientes clave para la función de las células T. Esta acción combinada potencia la respuesta inmunitaria a antígenos tanto endógenos como exógenos.

Más específicamente, la presente invención proporciona IRX-2, para el uso en el tratamiento de HPV al inducir una respuesta inmunitaria a HPV. La IRX-2 incluye las seis citocinas críticas de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α y IFN-γ según se describe anteriormente. También se pueden incluir citocinas adicionales según se describe anteriormente. También se pueden administrar compuestos adicionales tales como un inhibidor químico, NSAID y cinc según se describe anteriormente. Preferiblemente, la IRX-2 se administra al epitelio mediante inyección donde está presente la infección por HPV así como donde están situadas las LC que son necesarias para inducir una respuesta inmunitaria. También se prefiere la aplicación tópica al cuello uterino. Métodos de aplicación tópica incluyen, pero no se limitan a, la dispersión de IRX-2 en la formulación liposómica Biphasix™ (Helix Biopharma Corp., Aurora, Ontario, CA), seguido por la aplicación al epitelio cervicouterino; el uso del Cervical Drug Delivery System™ (Cytocore®, Inc. Chicago, IL), en donde la IRX-2 está absorbida en un parche de polímero bioadhesivo, que a continuación se fija al

epitelio cervicouterino; y la infusión de solución de IRX-2 en el cuello uterino a través de un aparato de aislamiento y aporte cervicouterino tal como los divulgados en la Patente de EE. UU. Nº 7.165.550 de Tracy y cols.

En general, la IRX-2 actúa para "encender" eficazmente el sistema inmunitario al madurar células dendríticas inmaduras, estimular la producción de células T vírgenes y presentar eficazmente antígeno a las células T vírgenes. La IRX-2 es capaz de tratar eficazmente HPV al inducir una respuesta inmunitaria a HPV, algo que está ausente en pacientes de HPV debido a las acciones supresoras inmunitarias de HPV sobre LC.

La respuesta inmunitaria a HPV es inducida al activar LC. LC activadas frente a no activadas se muestran en la FIGURA 3. Esencialmente, la IRX-2 es capaz de vencer la supresión inmunitaria de LC por HPV. A continuación, las LC activadas pueden secretar citocinas activadoras de células T y moduladoras inmunitarias a fin de inducir una respuesta inmunitaria a HPV, eliminando así todas las lesiones presentes así como protegiendo contra la erupción de lesiones futuras debidas a la capacidad del sistema inmunitario para atacar eficazmente HPV. Por ejemplo, la IRX-2 incrementa la secreción de IL-8 y la producción de ILIP-10 por LC. Las LC son capaces de activar células T CD8+ específicas de HPV. Según se describe en los ejemplos posteriores, la activación de LC se confirma mediante una regulación al alza de CD1a, MHC clase I, MHC clase II, CD40, CD80, CD83, CD86 y CCR7.

Existen varios beneficios de la presente invención. Puesto que las lesiones están provocadas principalmente por la persistencia de HPV, las intervenciones que inducen la depuración inmunológica de infecciones y evitan la transmisión de HPV pueden tener un enorme impacto sobre la salud pública. La eliminación de la persistencia de HPV contribuye a reducir el gasto sanitario para cada cáncer relacionado con HPV que se hubiera producido. Este enfoque es una alternativa económica al cribado repetido o una intervención quirúrgica costosa con una expectativa de éxito muy razonable, debido a que se dirige a la causa del desarrollo de lesiones inducidas por HPV, a saber la persistencia de HPV y su escape inmunitario relacionado.

Para cualquiera de las realizaciones anteriores, se usan los siguientes detalles de administración y/o protocolos de tratamiento:

Preferiblemente, la composición de citocinas se aplica localmente mediante inyección al epitelio infectado con HPV. Alternativamente, la composición de citocinas de la presente invención se puede inyectar alrededor de vasos linfáticos que drenan en nódulos linfáticos regionales a una lesión u otra área infectada con virus que se trate. Más específicamente, se administran inyecciones perilinfáticas locales u otras inyecciones que son conocidas por los expertos en la técnica para proporcionar suficiente localización de la preparación inmunoterapéutica.

En la realización en la que se va a utilizar un antígeno exógeno, antígenos sintéticos o extraídos proporcionados exógenamente tales como un antígeno y péptidos tumorales (véase Bellone, 1998) se pueden administrar al nódulo linfático regional o distal precebado o cocebado, bien en una preparación separada o bien como parte de la composición de citocinas de la invención.

La supresión endógena de células T, que puede estar provocada, p. ej., por cáncer u otras enfermedades inmunosupresoras, se puede bloquear mediante la coadministración de una dosis baja de ciclofosfamida (CY) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) (es decir, en combinación con las composiciones de citocinas de la invención). El NSAID es preferiblemente indometacina (INDO), pero también se pueden usar ibuprofeno o inhibidores de Coxll tales como celecoxib (CELEBREX®) o rofecoxib (VIOXX®) o combinaciones de los mismos. Los efectos secundarios de los NSAIDS se pueden tratar agresivamente con inhibidores de la bomba de protones y análogos de prostaglandina E. También se pueden añadir cinc y preparados multivitamínicos, posiblemente incluyendo la adición de selenio, como agentes para ayudar a restaurar la inmunidad de células T. Preferiblemente, la dosis de cinc es de 15 a 75 mg. Se puede administrar un preparado multivitamínico estándar. El cinc puede ser un gluconato disponible.

Las composiciones de citocinas de la invención se pueden administrar antes o después de cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. Las composiciones de la invención se pueden administrar durante la recaída de tumores, es decir, durante el período en el que se está produciendo de nuevo crecimiento tumoral después de un período en el que se creía que los tumores habían desaparecido o estaban en remisión.

El mecanismo de acción de IRX-2.

Según se define anteriormente, el agente biológico primario derivado de células de la invención actúa como un adyuvante, es decir, estimula o mejora la respuesta inmunitaria de un paciente a un antígeno particular. Por otra parte, las composiciones de IRX-2 de la invención son particularmente adecuadas para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células T. Respuestas inmunitarias promovidas por las composiciones de la invención incluyen la inducción o la generación de células T vírgenes, la diferenciación y la maduración de células dendríticas, que permiten la presentación apropiada de antígeno a células T (p. ej., en los nódulos linfáticos), y la activación de monocitos y macrófagos. Específicamente, en pacientes con cáncer, respuestas inmunitarias promovidas por las

composiciones de la invención incluyen infiltración tumoral por linfocitos, fragmentación y regresión tumoral así como una reducción en la histiocitosis sinusal (cuando esté presente). Esencialmente, el agente biológico primario derivado de células induce la producción inmunitaria y bloquea la destrucción inmunitaria. El mecanismo de acción del agente biológico primario derivado de células se describe adicionalmente en la Solicitud de Patente de EE. UU. Nº 12/323.595 de los Solicitantes.

Más específicamente, las composiciones de la presente invención ayudan a vencer la depresión/supresión inmunitaria en pacientes al inducir la producción de células T vírgenes. El término células T "vírgenes", según se define en la presente, indica células T recientemente producidas, células T que todavía no se han expuesto a antígeno. Así, las composiciones de la invención reponen o regeneran nuevas células T.

Debido a que se sabe que las células dendríticas representan este papel clave en la presentación antigénica en la producción de una respuesta inmunitaria apropiada *in vivo,* un agente que tenga un efecto estimulante sobre la maduración de células dendríticas actuará como un adyuvante para provocar una buena respuesta inmunitaria a un antígeno. Las composiciones de citocinas de la presente invención promueven la maduración de células dendríticas. Las composiciones de citocinas de la invención también proporcionan un efecto adyuvante adicional al actuar como potentes activadores de monocitos/macrófagos. Los monocitos son precursores tanto para DCs como para macrófagos en el cuerpo y así un agente que promueva la activación de monocitos/macrófagos tiene un efecto adyuvante sobre respuestas inmunitarias *in vivo.*

El agente biológico primario derivado de células también bloquea la destrucción inmunitaria al proteger las células T activadas de la apoptosis. Los datos clínicos y experimentales muestran que ciertas citocinas, especialmente citocinas de supervivencia que usan el receptor y la comunes, son capaces de proteger a las células T activadas de la muerte inducida por tumores y potenciar su actividad antitumoral.

Más específicamente, existen varios modos en los que el agente biológico primario derivado de células protege a las células T de la apoptosis. La expresión de moléculas de señalización antiapoptóticas (es decir, JAK-3 y Akt fosforilada) se regula al alza y la expresión de moléculas proapoptóticas (es decir SOCS-2) se regula a la baja. La activación de caspasas en linfocitos T CD8+ y CD4+ se disminuye y la expresión de cFLIP se incrementa. La inhibición de la ruta de supervivencia PI3K/Akt es contrarrestada por IRX-2. Las células T son protegidas tanto de la apoptosis extrínseca (apoptosis inducida por MV e inducida por FasL) como de la apoptosis mitocondrial intrínseca. La protección de la apoptosis extrínseca inducida por MV se efectúa adicionalmente al prevenir la regulación a la baja de JAK3, CD3-ζ y STAT5; inhibir la desfosforilación de Akt-1/2 y mantener relaciones equilibradas de Bax/Bcl-2, Bax-Bcl-xL y Bim/Mcl-1. La protección de la apoptosis inducida por MV también se efectúa al prevenir la inducción de la actividad de caspasa-3 y caspasa-7. Más específicamente, la inducción de la forma escindida activa de caspasa-3 se bloquea, como también la pérdida. de potencial de la membrana mitocondrial. Se inhibe la fragmentación de ADN nuclear. La protección de la apoptosis intrínseca por el agente biológico primario derivado de células se muestra por su protección de células T activadas de la apoptosis inducida por estaurosporina.

De forma importante, las citocinas del agente biológico primario derivado de células protegen a las células T activadas de la apoptosis de un modo sinérgico. En otras palabras, la combinación de las citocinas en el agente biológico primario derivado de células produce un mayor efecto que el que se observa al administrar las citocinas individuales solas.

En vista de lo anterior, las composiciones de la presente invención estimula el sistema inmunitario a través de múltiples efectos, incluyendo la maduración *in vivo* de células dendríticas que da como resultado una presentación eficaz de antígeno peptídico así como una activación de monocitos y macrófagos y la producción de células T vírgenes no comprometidas. La presentación apropiada de antígeno conduce a la expansión clonal de células T y B, creando inmunidad en el paciente. En el caso de pacientes con cáncer, los efectos apuntados anteriormente dan como resultado la infiltración, p. ej., de linfocitos, en tumores (p. ej., a través de extensión hematógena) y reducción y/o destrucción tumoral. El resultado es un incremento de la supervivencia debida a la memoria inmunológica.

Las composiciones de citocinas de la presente invención se administran y dosifican para promover la inmunización óptima a antígeno bien exógeno o bien endógeno, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente individual, la zona y el método de administración, la programación de la administración, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los propósitos de la presente se determina así mediante consideraciones tales como las que se conocen en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para promover la inmunización, conduciendo, p. ej., a reducción del tumor, fragmentación del tumor e infiltración leucocitaria, retardo en la recaída o mejora de la tasa de supervivencia, o mejora o eliminación de síntomas, incluyendo un incremento de los números de células T.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar de diversos modos. Se debe apuntar que las citocinas o los antígenos exógenos usados en las composiciones de la invención se pueden administrar en sus formas estándar o como derivados farmacéuticamente aceptables y se pueden administrar solos o como ingredientes activos en combinación con portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Por otra parte, las composiciones de la invención se pueden administrar intra- o subcutáneamente, o

peri- o intralinfáticamente, intranodalmente o intraesplénicamente o intramuscularmente, intraperitonealmente e intratorácicamente. Las composiciones de la invención también se pueden aplicar tópicamente a epitelio infectado con HPV, por ejemplo mediante infusión en el cuello uterino de un paciente. El paciente que se trata es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo el hombre. Los portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables así como los portadores de implantes se refieren generalmente a cargas sólidas o líquidas, diluentes o material encapsulante atóxicos inertes que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención.

La dosis puede ser una sola dosis o múltiples dosis a lo largo de un período de varios días. Cuando se administran las composiciones de la presente invención, generalmente se formulan en una forma inyectable de dosificación unitaria (p. ej., solución, suspensión o emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El portador puede ser un disolvente o medio dispersante que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos o aceites vegetales.

Una fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Vehículos no acuosos tales como aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, también se pueden usar como sistemas disolventes para las composiciones de la invención. Adicionalmente, se pueden añadir diversos aditivos que potencian la estabilidad, la esterilidad y la isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede efectuar mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, según la presente invención, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendrá que ser compatible con las citocinas o los antígenos exógenos de la invención.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar las citocinas o los antígenos exógenos utilizados para poner en práctica la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes, según se desee.

Una formulación farmacológica de la presente invención se puede administrar al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, aditivos y diluyentes; o las citocinas y/o los antígenos exógenos utilizados en la presente invención se pueden administrar parenteralmente al paciente en la forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de aporte dirigido tales como anticuerpos monoclonales, aporte con vectores, matrices poliméricas iontoforéticas, liposomas y microesferas. Ejemplos de sistemas de aporte útiles en la presente invención incluyen los divulgados en las Pat. EE. UU. Nº 5.225.182, 5.169.383, 5.167.616, 4.959.217, 4.925.678, 4.487.603, 4.486.194, 4.447.233, 4.447.224, 4.439.196 y 4.475.196. Muchos otros de estos implantes, sistemas de aporte y módulos son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Debe ser evidente que las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades productoras de antígenos tales como el cáncer, enfermedades infecciosas o lesiones persistentes, según se analiza anteriormente. Las composiciones promueven la inmunización contra los antígenos producidos por estas enfermedades al estimular respuestas inmunitarias en pacientes in vivo, respuestas inmunitarias que ayudan a aliviar o eliminar los síntomas y los efectos de la enfermedad en el paciente.

La invención se describe adicionalmente con detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solamente con propósitos de ilustración, y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique otra cosa. Así, no se debe considerar de ningún modo que la presente invención esté limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Generación de LC humanas

Como el HPV sólo infecta a los seres humanos, se usaron células inmunitarias humanas para estudiar la interacción de HPV con LC. LC primarias que se aislaban de piel humana se activaban a través del proceso de migración y expresan altos niveles de MHC y moléculas coestimulantes. Por lo tanto, no es factible aislar LC derivadas de piel inactivadas primarias de donantes humanos con los que efectuar estudios funcionales significativos a largo plazo *in vitro* y reproducibles. Para los experimentos, se generaron LC primarias a partir de monocitos de sangre periférica aislados de donantes sanos usando citocinas diferenciadoras *ex vivo.* Los monocitos circulatorios eran precursores

directos de LC epidérmicas *in vivo.* Los Solicitantes y otros han mostrado que las LC derivadas *ex vivo* expresan los mismos marcadores superficiales que las LC epidérmicas (langerina, cadherina E, CD11c, CD1a, alto contenido de MHC clase II y gránulos de Birbeck intracelulares) (FIGURA 1) y se pueden usar coherentemente para estudios de LC *in vitro*.

La FIGURA 1 muestra que las células de Langerhans derivadas de monocitos humanos expresan marcadores fenotípicos similares que las células de Langerhans derivadas de piel. Las células de Langerhans inmaduras se diferenciaron de los monocitos adherentes en 1000 UI/ml de GM-CSF, 1000 UI/ml de IL-4 y 10 ng/ml de TGFβ durante 7 días. Las células se analizaron mediante citometría de flujo con respecto a la expresión de MHC clase II (HLA-DP,DQ,DR), CD1a, CD11c, langerina o cadherina E (histogramas sombreados en gris). Los controles isotípicos se muestran como histogramas no sombreados negros. Los datos son representativos de LC derivadas de varios donantes sanos.

Inversión del escape inmunitario de HPV

Los Solicitantes se han embarcado previamente en estrategias para invertir el escape inmunitario de HPV al elegir como diana LC. Las LC expresan una variedad de TLRs, incluyendo TLR3, 7, 8 y 9, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y al acoplarse sus ligandos activan la célula. Sorprendentemente, se encontró que un agonista de TLR 7, ALDARA® (Imiquimod, Graceway Pharmaceuticals, LLC), aprobado por la FDA para verrugas genitales externas, no tenía absolutamente ningún efecto sobre la activación de LC, según se medía mediante la expresión de CD86 (Figura 2). Esto podría explicar las observaciones todavía no publicadas de que el uso de Imiquimod para tratar lesiones cervicouterinas no es eficaz. De forma interesante, un activador de TLR 8 (3M-002) y un agonista de TLR7/8 (resiquimod) activaban totalmente LC infectadas con HPV de modo que empezaban a inducir respuestas de células T específicas para HPV *in vitro.* Estos datos indican que la supresión de la función de LC por HPV se puede invertir al activar ciertas rutas de "señal de peligro".

Activación de células de Langerhans humanas con IRX-2

La capacidad de las LC para estimular eficazmente células T después de la migración desde la epidermis hacia los nódulos linfáticos drenantes después de la exposición a patógenos u otras "señales de peligro" requiere la expresión de moléculas coestimulantes y receptores de quimiocinas sobre su superficie celular. Se examinó el efecto de IRX-2 sobre la maduración fenotípica de LC humanas derivadas de monocitos *in vitro.* Se encontró que el tratamiento con IRX-2 inducía la regulación al alza tanto de MHC clase I como de MHC clase II, y las moléculas coestimulantes CD40, CD80 y CD86, el marcador de maduración CD83, y la activación de LC se realizó como se describe previamente. Brevemente, las LC se recogieron, se lavaron y bien se dejaron sin tratar o bien se trataron con VLP de HPV16L1L2 en una concentración de 10 µg/106 células durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células se pusieron a 37°C durante 6 horas en medio completo. Posteriormente, las células se dejaron sin tratar o se trataron con IRX-2 (dilución 1:2) o con 1 µg/ml de LPS como un control positivo. Las células se incubaron durante 48 horas adicionales después del tratamiento con IRX-2. Las células se recogieron, se lavaron y se tiñeron para la tinción para el análisis de citometría de flujo con respecto a CD1a, MHC clase I, MHC clase II, CD40, CD80, CD83, CD86 o controles isotípicos. Se calculó el cambio en número de veces de los marcadores superficiales entre los grupos de tratamiento a partir de los valores de MFI. Un incremento de la MFI indica la regulación al alza de marcadores y la activación de LC. Los datos son representativos de tres donantes individuales.

La fuente de IRX-2 se recogió como sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica humanas estimuladas mediante fitohemaglutinina (PHA) durante un período de 24 horas. Se uso la prueba QC para probar los niveles de citocinas en la mezcla y estandarizar según los niveles de cuatro citocinas clave. El procedimiento de medida de cGMP daba un producto muy constante con concentraciones de citocinas muy similares de lota a lote. Para asegurar la coherencia en la activación de LC por IRX-2, se usaron dos lotes diferentes de IRX-2 para activar LC.

Como se muestra en la FIGURA 6, la expresión de los seis marcadores de LC se elevaba mucho mediante el tratamiento con IRX_2, independientemente de si las LC se habían expuesto a VLP de HPV16 L1L2. De forma interesante, la elevación de la molécula coestimulante CD86 era aún más eficaz en LC expuestas a VLP de HPV16 LIL2 que en los controles. Más de 95% de las células expresaban CD86 y más de 80% de LC expresaban el marcador de maduración CD83 (no mostrado).

Los resultados indican que esa IRX-2 es un potente inductor de la activación y la maduración de LC, y que su eficacia no se deteriora por la exposición previa de LC a HPV.

Ejemplo 2

Es necesario establecer si IRX-2, que está disponible actualmente para uso clínico, puede activar LC previamente expuestas a HPV16. El efecto de IRX-2 sobre la expresión en LC de marcadores de activación se presentó en el

Ejemplo 1, En los siguientes experimentos, se probó la intensidad de IRX-2 al medir la secreción, la migración y la activación por citocinas de células T aloantigénicamente específicas.

La activación de APC, como LC, se requiere para unas satisfactorias interacción con y activación de linfocitos T primarios. Las citocinas inflamatorias tienen la capacidad de activar APC, dando como resultado una maduración y un incremento en la función de presentación de antígenos. IRX-2 es un modulador inmunitario prometedor que tiene el potencial de influir en la capacidad inmunoestimulante de LC cuando se aplica localmente a epitelio infectado con HPV. A fin de determinar si IRX-2 activa fenotípicamente y funcionalmente LC expuestas a HPV, se interpretó la secreción y la migración de citocinas/quimiocinas así como la capacidad para estimular respuestas de células T aloantigénicamente específicas. Estos estudios definían IRX-2 como capaz de invertir la supresión inmunitaria por HPV, de forma similar a los agonistas de TLR8.

Diseño experimental:

Los niveles de expresión en LC de marcadores coestimulantes de células T se determinaron cuando las LC se exponían a HPV16 y a continuación a IRX-2. Las LC se diferenciaron de monocitos de sangre periférica aislados de donantes sanos. Las LC se expusieron a partículas viroides de HPV16 (VLP) durante 6 horas y a continuación se añadió IRX-2 durante 48 horas adicionales, como se muestra en la FIGURA 5. Las moléculas de la superficie celular se midieron mediante citometría de flujo usando anticuerpos fluorescentes. Los sobrenadantes de cultivo celular se probaron con respecto a la presencia de citocinas y quimiocinas inmunoestimulantes para determinar si las LC se han activado y están secretando citocinas activadoras de células T u otras citocinas inmunomoduladoras. La migración de LC después de la exposición a VLP de HPV e IRX-2 se midió mediante migración *in vitro* a través de una membrana Transwell. La capacidad para estimular células T se evaluó al cultivar LC con células T alogeneicas en una reacción de linfocitos mixtos (MLR). Las LC sin reaccionar, las LC expuestas a VLP de HPV solas y las LC tratadas con IRX-2 sola sirven como controles en cada experimento. Cada experimento se repitió al menos 3 veces usando LC derivadas de donantes sanos individuales. Se eligieron sujetos que son positivos a HLA-A*0201, de modo que se medían respuestas inmunitarias de células T bien definidas contra antígenos peptídicos derivados de HPV conocidos. Estos datos muestran que IRX-2 permite que las LC expuestas a HPV recuperen su capacidad para estimular células T y para migrar - ambas funciones necesarias para una respuesta inmunitaria antiviral productiva.

Generación de células de Langerhans humanas:

Se generaron LC primarias a partir de monocitos de sangre periférica disponibles comercialmente aislados mediante leucaféresis de donantes sanos anónimos usando citocinas diferenciadoras *ex vivo.* Las LC derivadas de monocitos se generaron en primer lugar a través de adherencia plástica de PBMC crioconservadas a matraces de cultivo. Las células adherentes se cultivaron durante 7 días en medio que contenía 1000 U/ml de GM-CSF humano recombinante (rhu), 1000 U/ml de rhu-IL-4 y 10 ng/ml de rhu-TGF-β1, repuesto dos veces durante el período de cultivo.

Migración de LC:

La migración de LC dirigida por quimiocinas se llevó a cabo usando placas Transwell de 24 pocillos con filtros de policarbonato de 5 µm de tamaño de poro (Corning Costar). Los medios se añadieron a la cámara inferior que contenía bien 250 ng/ml de rhu CCL21 (R&D Systems) o bien medio solo para controlar la migración espontánea. LC no tratadas o tratadas como se describe anteriormente se añadieron a la cámara superior y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Las células que migraban a la cámara inferior se contaban usando un hemacitómetro o un contador de células automatizado, y la migración dependiente de CCL21 se calculó como la relación de células que migraban con CCL21 a células que migraban sin CCL21, denominada índice de migración. Un incremento en el índice de migración indicaba una activación funcional de las LC para moverse desde el tejido hacia los nódulos linfáticos drenantes (FIGURA 7).

El tratamiento con IRX-2 producía un incremento de tres a cuatro veces en la migración tanto en el control como en VLP de HPV L1L2. Los resultados indican que IRX-2 puede promover la migración de LC a nódulos linfáticos regionales, incluso cuando las LC se habían expuesto a HPV.

Ensayo de reacción de linfocitos mixtos:

Las LC se trataron con VLP HPV16 L1 L2 e IRX-2 según se describe anteriormente. Las LC se cocultivaron con células T alogeneicas inalteradas usando un estuche de aislamiento de todas las células T humanas de selección negativa MACS. Las células T sensibles y las LC estimuladoras se cultivaron en relaciones R:S de 10:1 y 5:1 durante 5 días. Las células T cultivadas solas, las LC cultivadas solas, las células T cultivadas con PBMC autólogas y las células T cultivadas con el mitógeno de células T PHA servían como controles para el ensayo. Células sometidas a pulsos de ^{3}H-timidina radiactiva se recogieron y la radiactividad se contó en un contador de placas de centelleo. Los cpm radiactivos se determinaron y se compararon entre tratamientos. El incremento en la incorporación de timidina era indicativo de mayor proliferación de células T. El incremento en la proliferación de

células T después de la exposición a VLP de HPV16 L1L2 y la estimulación con IRX-2 confirmaba que las LC expuestas a VLP de HPV16 L1L2 estaban recuperando su capacidad inmunoestimulante en presencia de HPV (FIGURA 8).

Análisis de citocinas y quimiocinas:

Se recogieron sobrenadantes de LC estimuladas con IRX-2 y se probaron con respecto a citocina y quimiocinas secretadas. Las LC se trataron como se describe anteriormente. Las LC se lavaron 36 horas después del tratamiento con IRX-2 y se cultivaron durante 36 horas adicionales, antes de la recogida de los sobrenadantes. Esto eliminaba la medida de citocinas presentes en la mezcla de IRX-2. Los ensayos se completaron usando el Bio-Plex Suspension Array System que permitía que se ensayaran a la vez varios analitos de inflamación y estimulantes y quimioatrayentes de células T. Las citocinas y quimiocinas ensayadas incluían IL-8, IFN-γ proteína inducible 10 (IP-10),), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1α, MIP-1β y RANTES. Los datos se analizaron al comparar las concentraciones de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes de los grupos de tratamiento. El incremento en la secreción de citocinas y quimiocinas asociadas a Th1 indica la activación funcional de LC que apoyaría la inducción de respuestas de células T CD8+, mientras que el incremento de citocinas supresoras sugiere una función tolerizante o supresora de LC.

El tratamiento de LC con IRX-2 incrementaba significativamente la secreción de dos quimiocinas asociadas a Th1, IP-10 e IP10 (FIGURA 9). Ambas quimiocinas son proinflamatorias, y se sabe que IP-10 atrae células T, células NK y monocitos a zonas de inflamación. Los resultados muestran que, bajo la estimulación con IRX-2, las LC expuestas a VLP de L1L2 estaban recuperando su capacidad inmunoestimulante en presencia de HPV.

Conclusión:

IRX-2 activaba fenotípicamente y funcionalmente LC humanas procedentes de donantes sanos, incluso después de que se expusieran a VLP de HPV L1L2.. El incremento en los niveles de MHC y moléculas de activación superficial, el incremento en la secreción de citocinas y quimiocinas activadoras de células T y un incremento en la capacidad para realizar la migración dirigida por quimiocinas después del tratamiento con HPV e IRX-2 (FIGURAS 6-9), Estos resultados apoyan todos la eficacia de la presente invención para vencer la tolerización inducida por HPV de LC y proporcionar un tratamiento para infecciones por HPV.

REIVINDICACIONES

1. Un agente biológico primario derivado de células que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-gamma y TNF-alfa, para el uso en el tratamiento inmunoterapéutico de HPV al inducir una respuesta inmunitaria a HPV en un paciente infectado con HPV.

2. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según la reivindicación 1, que incluye una concentración de IL-1β de 60-6.000 pcg/ml, una concentración de IL-2 de 600-60.000 pcg/ml, una concentración de IL-6 de 60-6.000 pcg/ml, una concentración de IL-8 de 6.000-600.000 pcg/ml, una concentración de TNF-α de 200-20.000 pcg/ml y una concentración de IFN-γ de 200-20.000 pcg/ml.

3. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según la reivindicación 1 o 2, que incluye además IL-7, IL-12, IL-15, GM-CSF y G-CSF.

4. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en un régimen de dosificación que incluye administrar un agente que inhibe células T reguladoras, en donde el agente es un inhibidor químico seleccionado de un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico y un agente inmunomodulador.

5. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según la reivindicación 4, en el que el agente alquilante es ciclofosfamida.

6. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un régimen de dosificación que comprende administrar un NSAID seleccionado de ibuprofeno, celecoxib, rofecoxib y combinaciones de los mismos.

7. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un régimen de dosificación que comprende administrar un NSAID que es indometacina.

8. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en un régimen de dosificación que comprende la administración de cinc para proporcionar nutrientes para la función de las células T.

9. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, formulado en una forma de dosificación unitaria inyectable.

10. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según la reivindicación 9, que se administra al epitelio del paciente mediante inyección.

11. Un agente biológico primario derivado de células para el uso según la reivindicación 1, que se aplica tópicamente al epitelio del paciente.

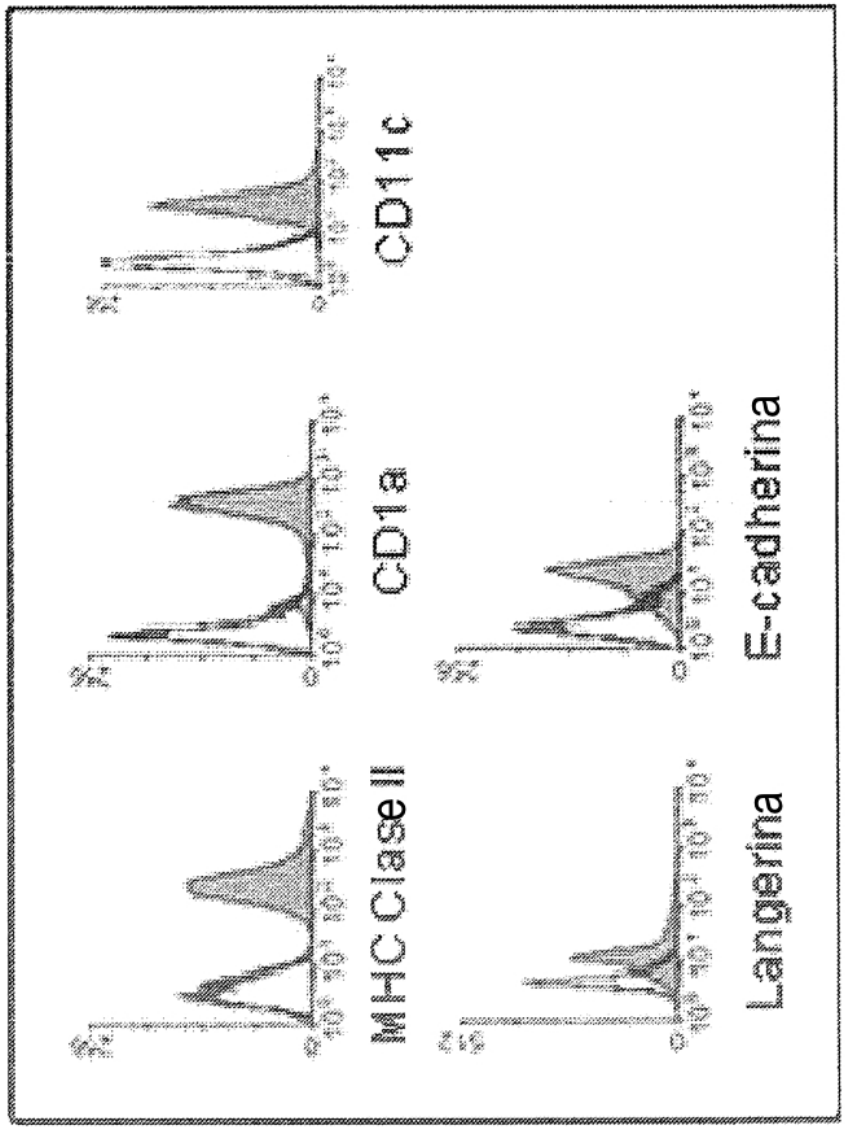

Figura 1 - Técnica anterior

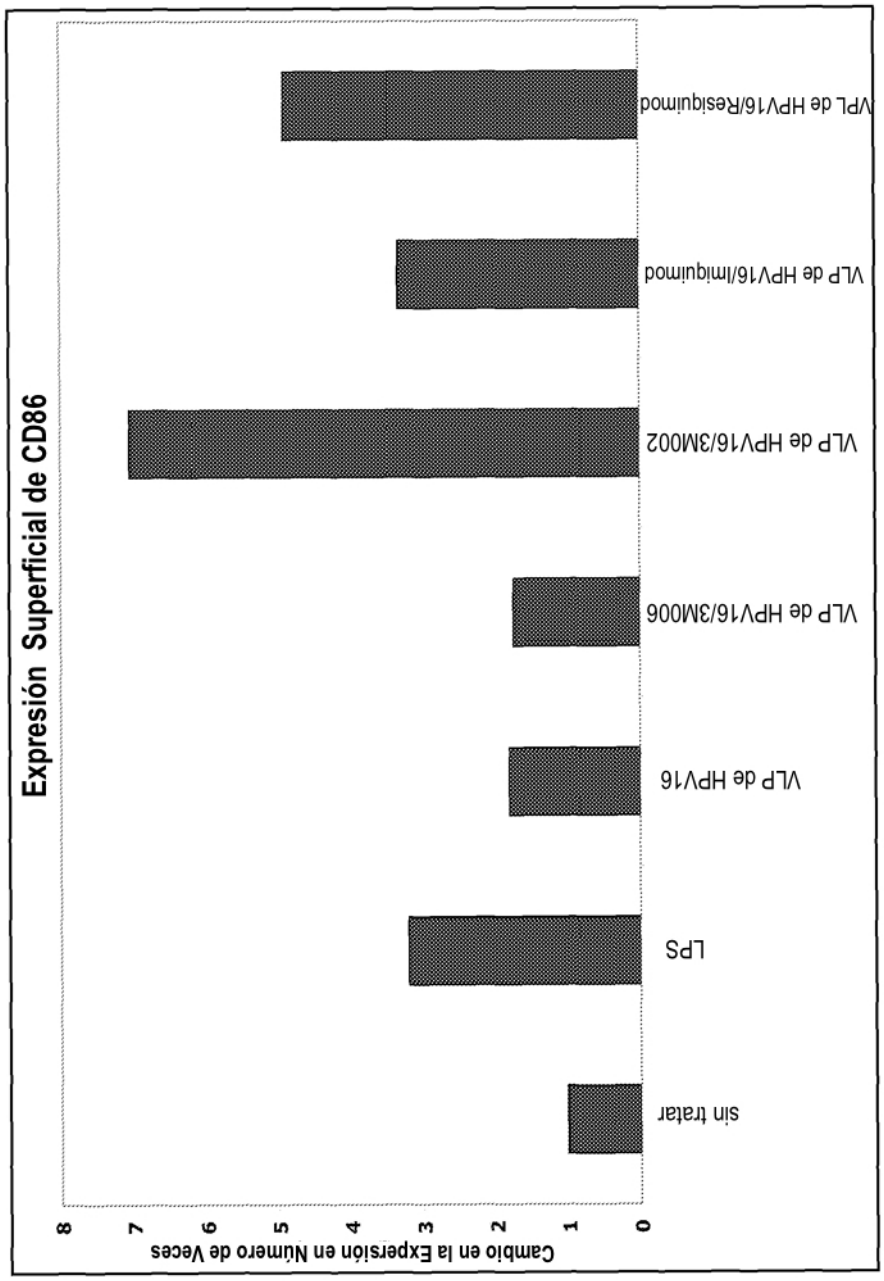

Figura 2 – Técnica anterior

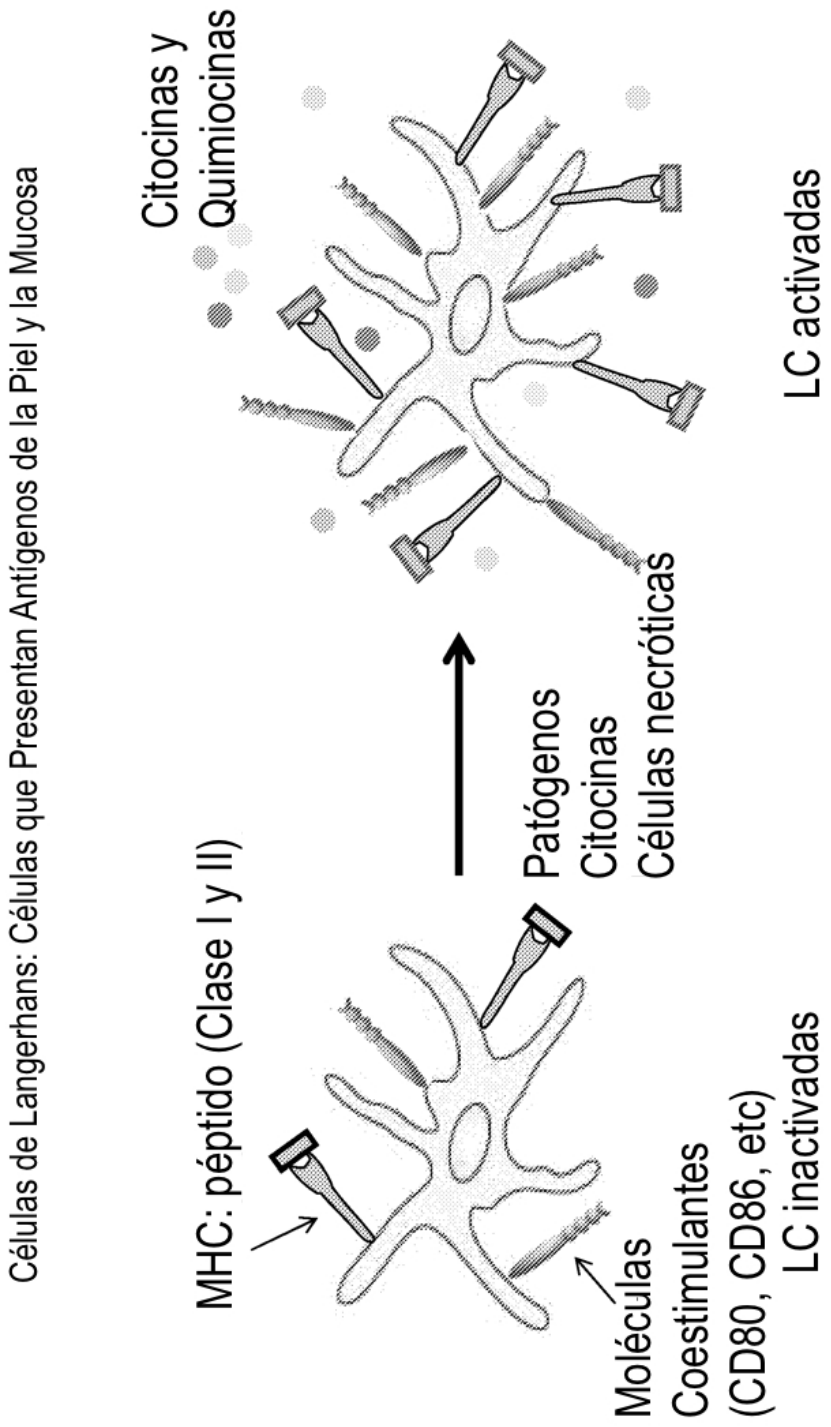
Células de Langerhans: Células que Presentan Antígenos de la Piel y la Mucosa
MHC: péptido (Clase I y II)
Moléculas
Coestimulantes
(CD80, CD86, etc)
LC inactivadas
Patógenos
Citocinas
Células necróticas
Citocinas y
Quimiocinas
LC activadas

Figura 3

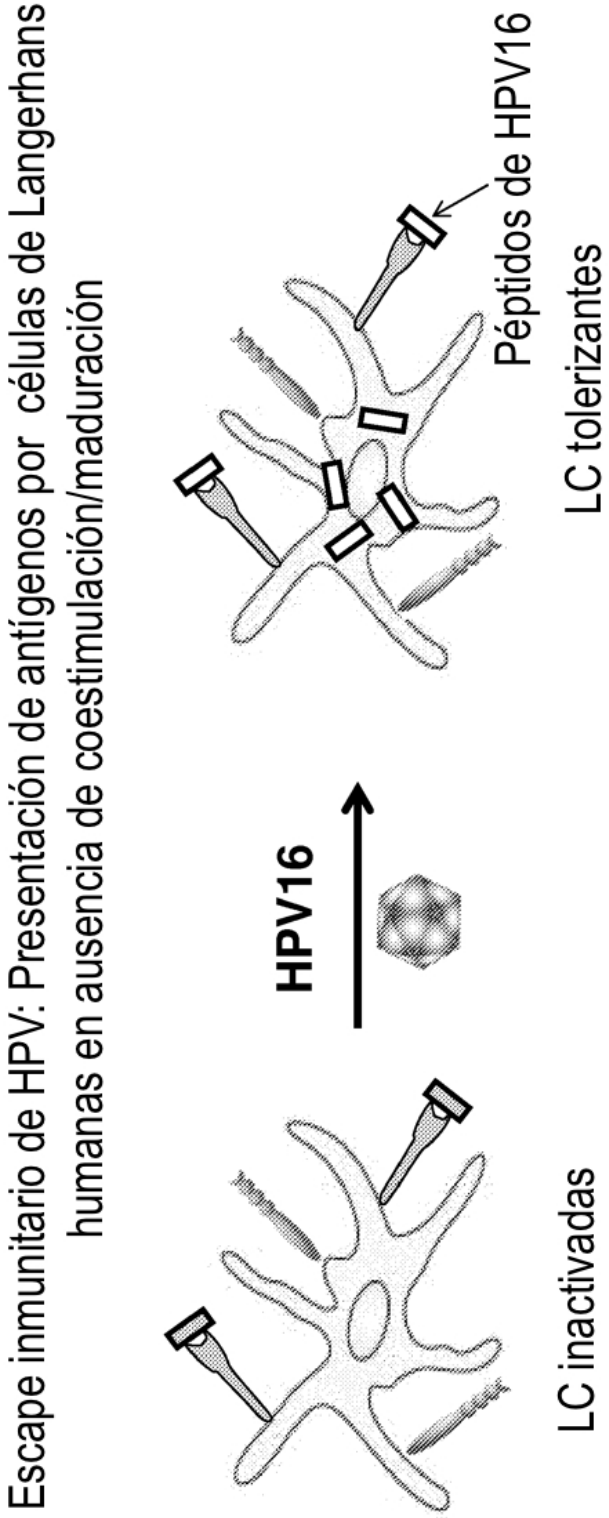
Escape inmunitario de HPV: Presentación de antígenos por células de Langerhans humanas en ausencia de coestimulación/maduración
LC inactivadas
HPV16
LC tolerizantes
Péptidos de HPV16

Figura 4

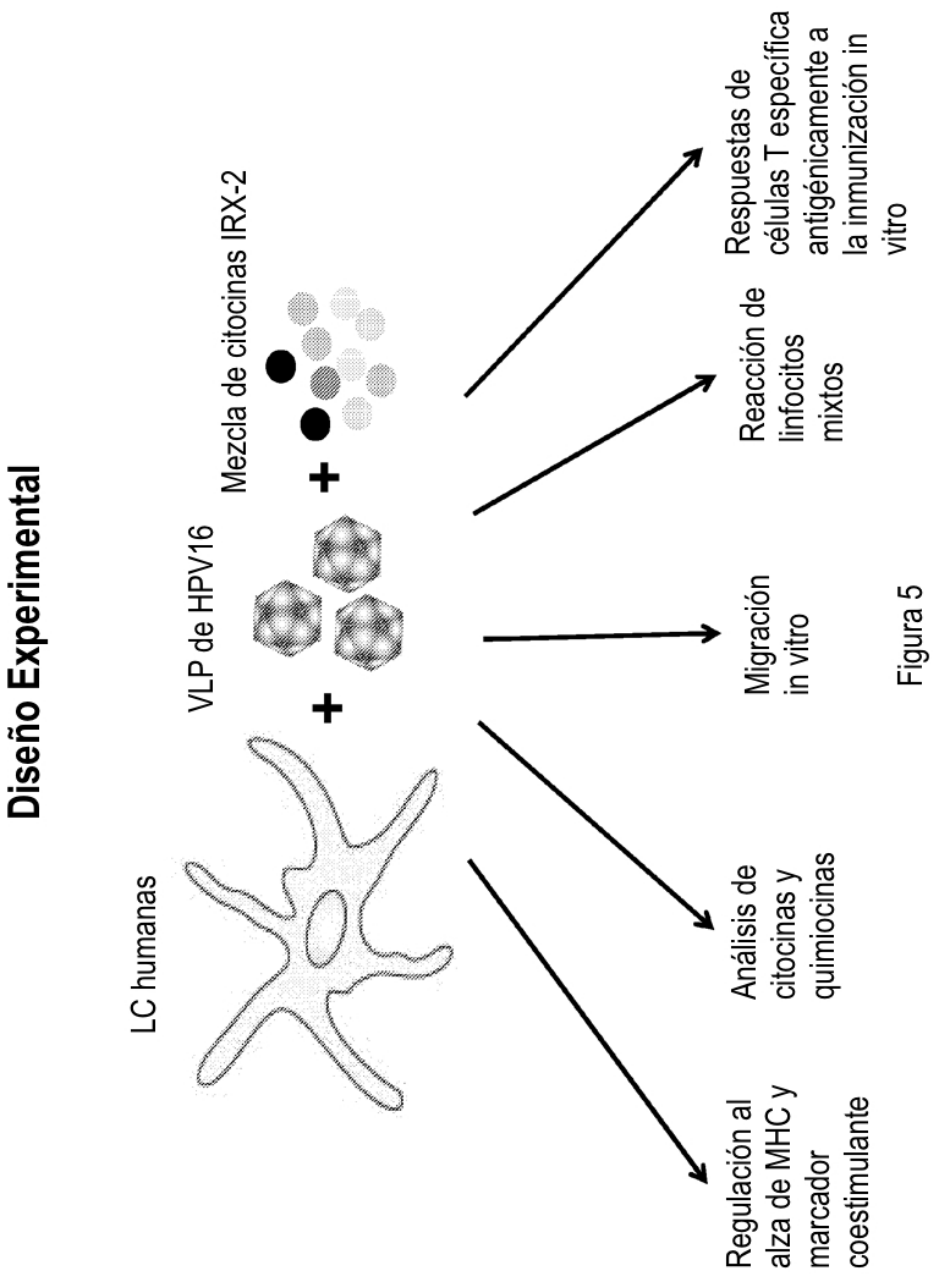
Diseño Experimental
LC humanas
VLP de HPV16
Mezcla de citocinas IRX-2
Regulación al alza de MHC y marcador coestimulante
Análisis de citocinas y quimiocinas
Migración in vitro
Reacción de linfocitos mixtos
Respuestas de células T específica antigénicamente a la inmunización in vitro

Figura 5

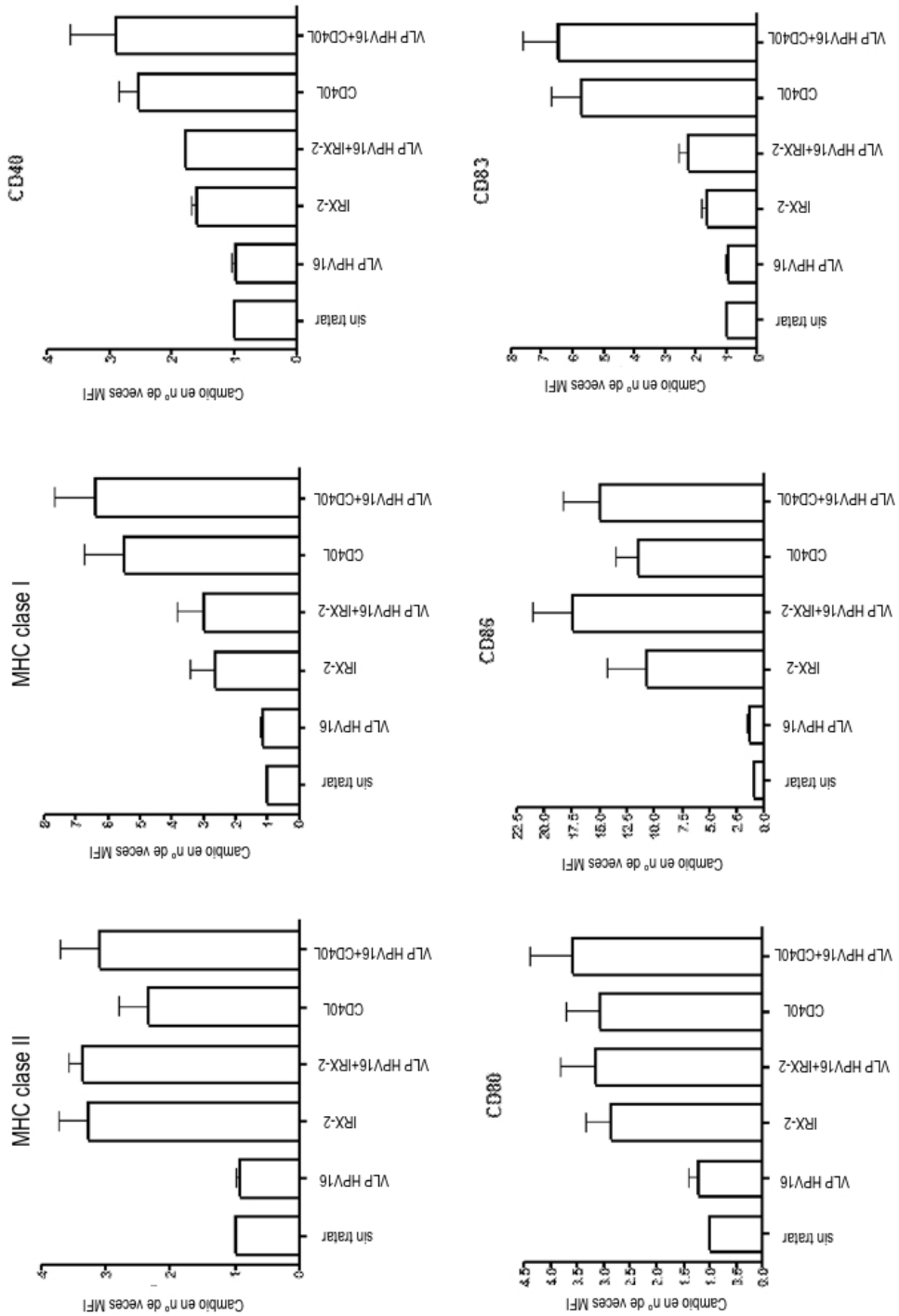
MHC clase II
MHC clase I
CD40
CD80
CD86
CD83
Cambio en nº de veces MFI
sin tratar
VLP HPV16
IRX-2
VLP HPV16+IRX-2
CD40L
VLP HPV16+CD40L

Figura 6

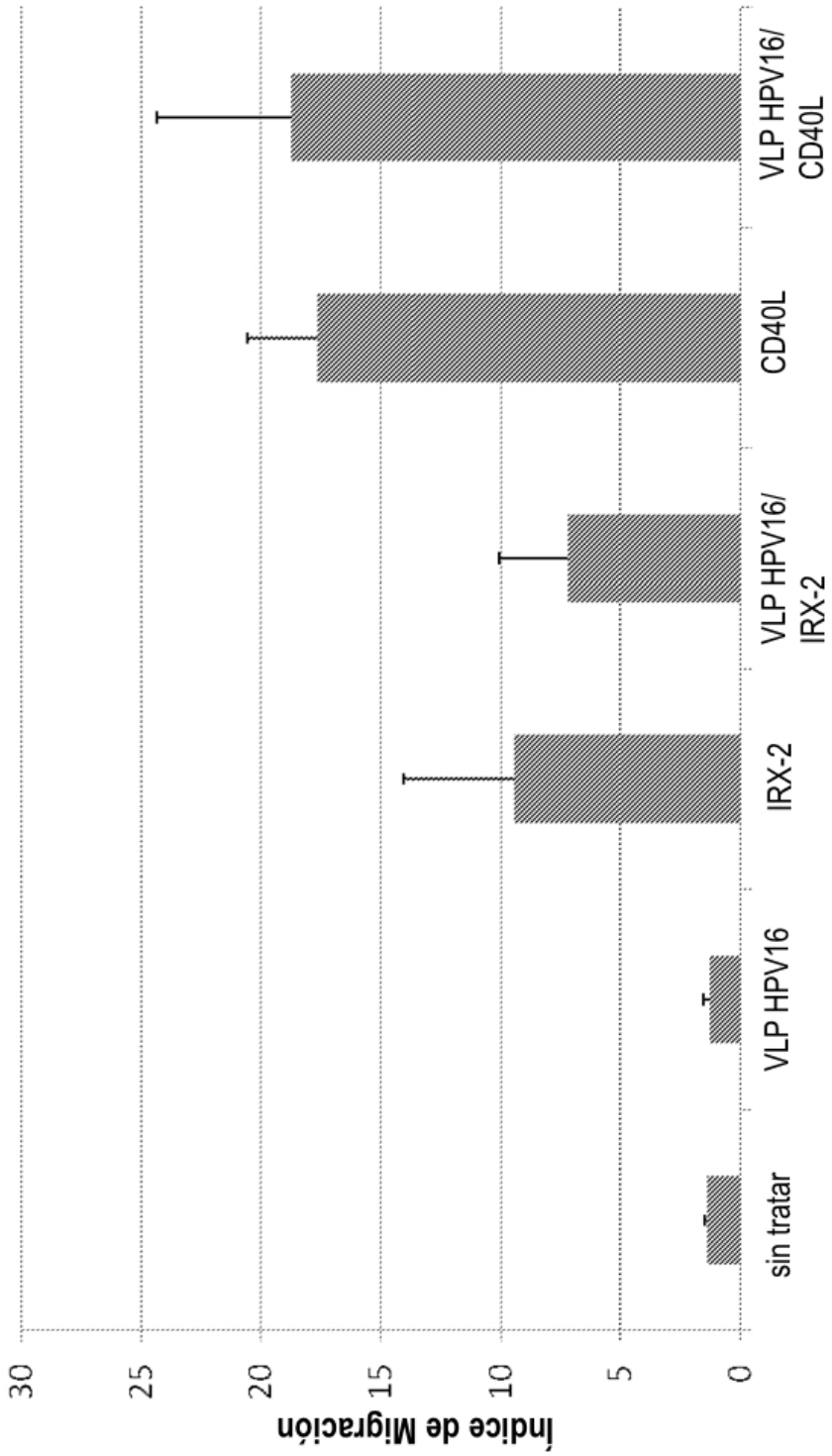
Índice de Migración
30
25
20
15
10
5
0
sin tratar
VLP HPV16
IRX-2
VLP HPV16/
IRX-2
CD40L
VLP HPV16/
CD40L

Figura 7

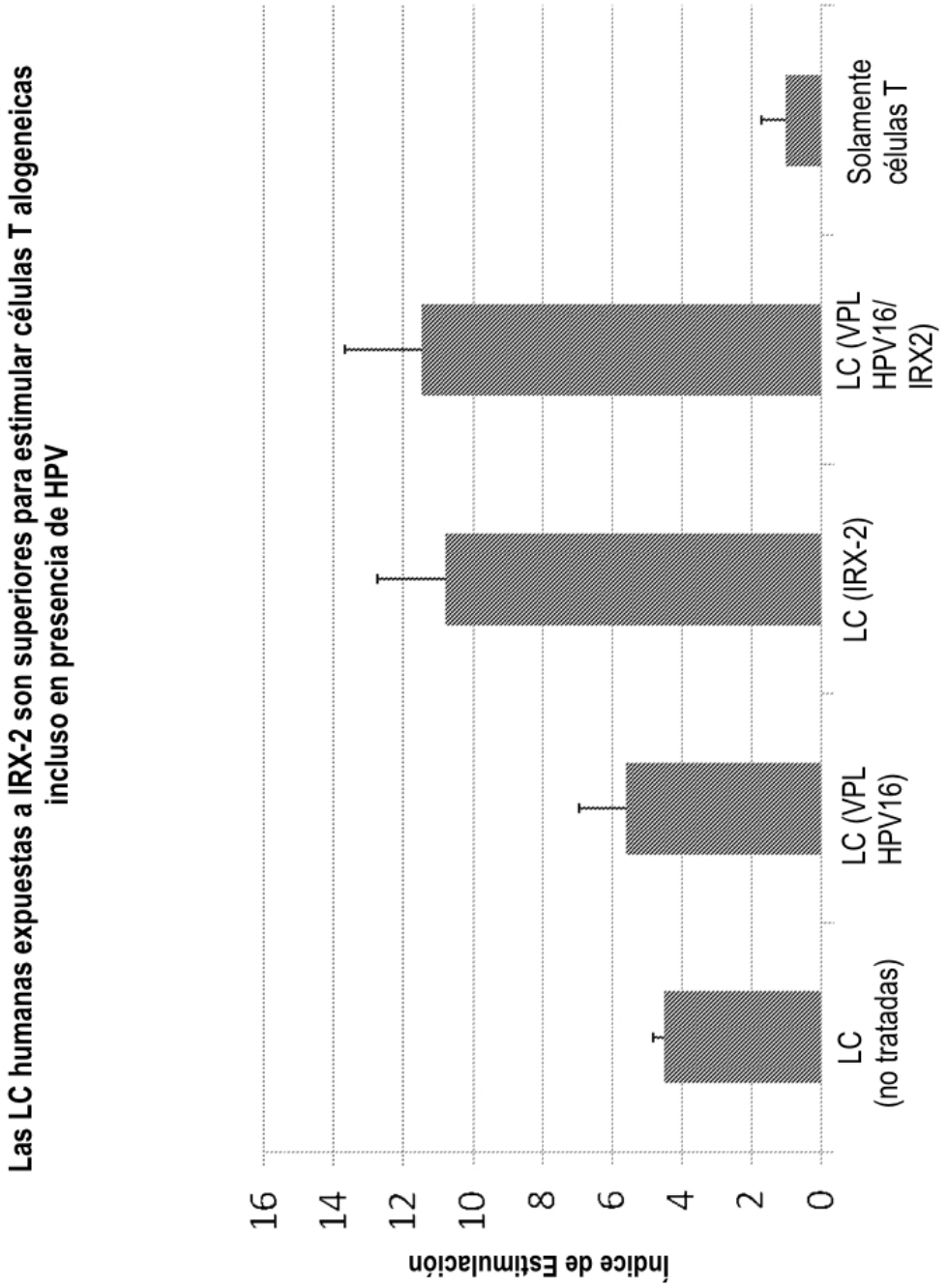
Las LC humanas expuestas a IRX-2 son superiores para estimular células T alogeneicas incluso en presencia de HPV
Índice de Estimulación
16
14
12
10
8
6
4
2
0
LC (no tratadas)
LC (VPL HPV16)
LC (IRX-2)
LC (VPL HPV16/ IRX2)
Solamente células T

Figura 8

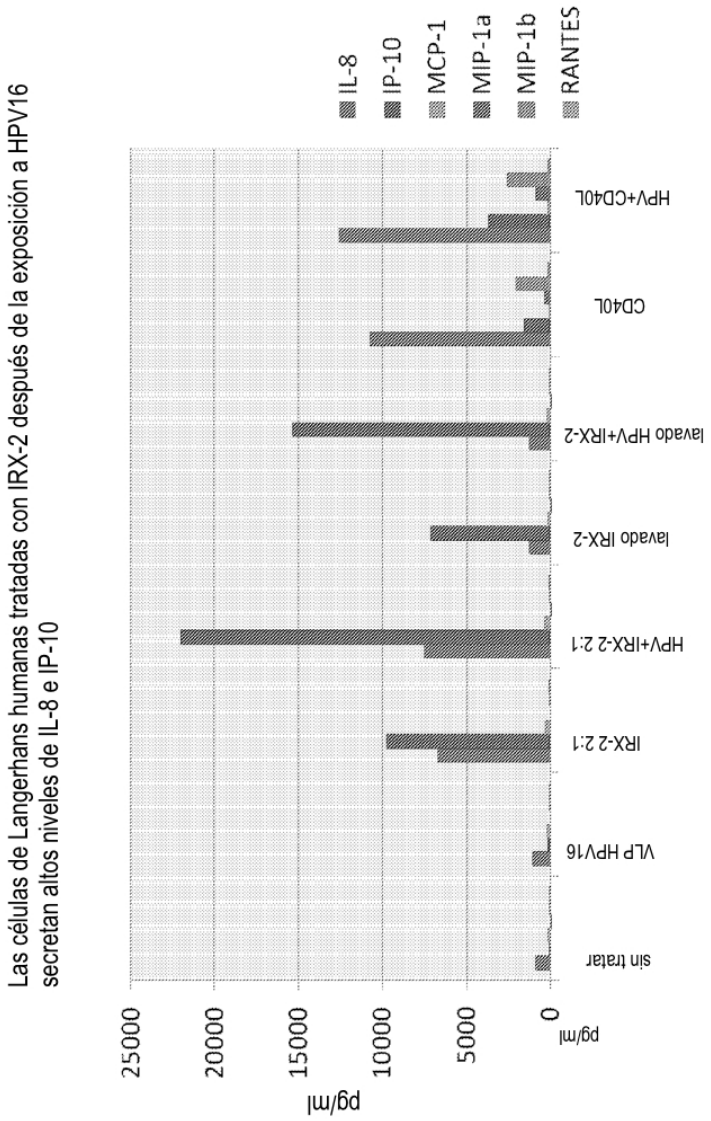
Las células de Langerhans humanas tratadas con IRX-2 después de la exposición a HPV16 secretan altos niveles de IL-8 e IP-10
pg/ml
25000
20000
15000
10000
5000
0
pg/ml
sin tratar
VLP HPV16
IRX-2 2:1
HPV+IRX-2 2:1
lavado IRX-2
lavado HPV+IRX-2
CD40L
HPV+CD40L
IL-8
IP-10
MCP-1
MIP-1a
MIP-1b
RANTES

Figura 9