

Inmunoterapia celular adoptiva con linfocitos de sangre de cordón umbilical en infecciones virales postrasplante hematopoyético

Adoptive cell immunotherapy with blood cord lymphocytes in viral infections post hematopoietic transplant

René A. Rivero Jiménez

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Las reactivaciones de infecciones virales ocurren como complicación en los primeros 3-6 meses después del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y se deben, fundamentalmente, a virus herpes de importancia clínica, como el citomegalovirus, el virus de Epstein Barr y el virus del herpes humano tipo 6; los poliomavirus BK y JC y el adenovirus. La inmunoterapia celular adoptiva es un tratamiento que ayuda al sistema inmunológico a combatir estas enfermedades. Su principio se basa en obtener linfocitos T específicos de un individuo, cultivarlos y expandirlos en el laboratorio, lo que aumenta el número de células T capaces de destruir dianas virales. Estas células T se devuelven al paciente para ayudar a su sistema inmunológico. Los datos experimentales *in vitro* sugieren el alto potencial, quizás único, de las células de sangre de cordón umbilical para conseguir productos biológicamente activos como herramientas terapéuticas de este nuevo tipo en la facilitación del injerto, la inmunoterapia y la medicina regenerativa. Un fenotipo de células T vírgen derivada de la sangre de cordón, se han empleado para reducir la enfermedad injerto contra huésped después del trasplante y la inmunoterapia celular adoptiva con linfocitos T citotóxicos virus-específicos para prevenir de forma efectiva estas infecciones virales.

Palabras clave: trasplante, infecciones virales, inmunoterapia celular adoptiva, linfocitos T, sangre de cordón.

ABSTRACT

Viral reactivation predominantly occurs in the first 3 - 6 months after stem cell transplantation. The most clinically important are the herpes viruses; cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and human herpes virus 6; the polyoma viruses BK and JC and adenovirus. Cellular adoptive immunotherapy is a treatment used to help immune system to fight against this kind of diseases. It is based on the extraction of specific T lymphocytes from an individual and its culture at the laboratory, to increase the number of T cells able to destroy viral targets, and these T cells are infused to the patient in order to help his immune system. In vitro experimental data suggest the high and perhaps unique potential of cord blood cells to generate biologically active products as therapeutic tools of this new type in order to facilitate graft, immunotherapy and regenerative medicine. A naive T cell phenotype derived from cord blood has been employed to reduce graft versus host disease after stem cell transplantation and as adoptive cellular immunotherapy with virus-specific cytotoxic T lymphocytes to prevent, in an effective way, this kind of viral infections.

Keywords: transplantation, viral infections, adoptive cellular immunotherapy, T lymphocytes, cord blood.

INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia celular adoptiva es un tratamiento que se utiliza para ayudar al sistema inmunológico a combatir enfermedades tales como el cáncer e infecciones por ciertos virus. Su principio se basa en obtener linfocitos T específicos de un individuo, cultivarlos y expandirlos en el laboratorio. Este procedimiento aumenta el número de células T capaces de destruir células cancerosas o combatir infecciones y estas células T se reinfunden al paciente para influir sobre el sistema inmunológico en el combate contra estas enfermedades.¹

El éxito o el fracaso en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) alogénicas para la curación de varias enfermedades hematológicas, depende en gran medida de la calidad de la recuperación inmunológica procedentes de las células del donante.

Se conoce que los linfocitos T del donante son responsables del efecto "injerto contra leucemia" y además ejercen un papel protector contra los llamados virus latentes que pueden reactivarse durante el período de inmunosupresión profunda que acompaña al trasplante.

Sin embargo, estos linfocitos T alorreactivos del donante son también responsables de la llamada "enfermedad injerto contra huésped" (EICH) que puede dar al traste con la vida del receptor.

La prevención y el tratamiento de la EICH con medicamentos inmunosupresores, retrasan la recuperación inmunológica y adicionan más tiempo a la etapa postrasplante, durante la cual el receptor está bajo el riesgo de las complicaciones derivadas de enfermedades infecciosas virales.²

A pesar de los progresos en el trasplante de CPH alogénicas en los últimos 50 años, su éxito continúa dependiendo en lograr un balance adecuado entre la rápida recuperación inmunológica de las células del donante y las complicaciones.

Aún con los mejores resultados en la histocompatibilidad entre el donante y el receptor, las complicaciones derivadas de las infecciones virales, la EICH y las recaídas hematológicas, son las responsables del 50 % de las muertes después del trasplante en pacientes con hemopatías malignas.²

REACTIVACIONES VIRALES POSTRASPLANTE

Las reactivaciones de infecciones virales ocurren en los primeros 3 - 6 meses después del trasplante de CPH, causadas, fundamentalmente, por virus herpes de importancia clínica, como el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein Barr (VEB), y el virus del herpes humano tipo 6 (HHV6); los poliomavirus BK y JC, y el adenovirus (Adv).

En dependencia de la competencia inmunológica del receptor, la reactivación viral puede provocar, desde una viremia asintomática, hasta una enfermedad completa, como neumonías fatales (CMV, HHV6, Adv); citopenias y encefalitis (HHV6); hepatitis fatales (Adv); enfermedad linfoproliferativa postrasplante (*PTLD*, siglas en inglés) con amenaza para la vida (por reactivación del VEB en los linfocitos B del donante); y cistitis hemorrágica y leucoencefalopatía multifocal, por los virus BK y JC, respectivamente.²

El tratamiento de las complicaciones virales ha mejorado en los últimos años debido, en parte, a la introducción de nuevos medicamentos antivirales y al uso preventivo de estos agentes al debut de la viremia, con reducción notable de la mortalidad causada por el CMV, ya que este es susceptible a *aciclovir*, y más aún, a otros productos como *foscarnet*, *ganciclovir* y *valganciclovir*; mientras que *cidofovir* puede controlar al Adv y a los poliomavirus, y el *Rituximab* (anticuerpo monoclonal anti CD20) es usualmente efectivo en el control de la PTLD).

No obstante, los resultados no siempre son los esperados y la prolongación de los días de hospitalización provocan, junto a la elevación del costo económico de la terapia antiviral, efectos negativos al paciente y al sistema hospitalario.³ Por estas razones, se impuso la necesidad de mejorar el manejo de las reactivaciones virales, tanto para disminuir la morbilidad como la mortalidad y reducir los costos del trasplante.

INMUNOTERAPIA CELULAR ADOPTIVA

De esta manera, surgió una variante lógica, la infusión de linfocitos T virus-específicos anti-CMV y anti-VEB, procedentes del donante, expandidos y clonados, primero en modelos animales y la transferencia adoptiva de linfocitos T antígeno-específicos; y luego, su aplicación en humanos, cuando se logró el aislamiento y la clonación de células T citotóxicas CD8+ anti-CMV específicas derivadas de la médula ósea de donantes, que una vez propagadas *in vitro* y luego transferidas de forma adoptiva a un receptor inmunodeprimido, fueron capaces de restablecer la respuesta de células T específicas contra el CMV y en otros casos frente al VEB,⁴⁻⁶ pero estos logros eran solo aplicables en instalaciones de investigación científica con alta tecnología y no están exentos de contratiempos, por ser procedimientos lentos y complicados en su realización práctica.

Estos estudios abrieron el camino a la inmunoterapia celular adoptiva con células T para CMV y VEB,^{7,8} y al importante paso que constituye la generación de células para infusión libres de células alorreactivas del donante, que se logra con el aislamiento de células T específicas para CMV, de hemocomponentes del donante, con la selección de

células T activadas con el γ -interferón mediante la captura por el péptido pp65 del CMV,⁹ o por la estimulación de células T virus específicas con mayores posibilidades de aplicación clínica para los centros de trasplante.^{8,10-12}

LA SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

La sangre de cordón umbilical (SCU) posee un número de ventajas y algunas limitaciones cuando se trata de los trasplantes de CPH alogénicas. Entre sus principales ventajas están el gran potencial proliferativo y la inmadurez inmunológica, lo que ha motivado la realización de trasplantes de CPH procedentes de SCU y ha superado las barreras de la compatibilidad HLA. Su inmediata disponibilidad en los bancos de SCU, gran diversidad de combinaciones HLA, ausencia de riesgos para el donante, disminución y menor severidad de la EICH en el receptor del trasplante y el riesgo prácticamente nulo de transmisión de enfermedades virales, lleva a un incremento progresivo de los trasplantes de SCU a nivel mundial, que se cifra en más de 600 al año.^{13,14}

TERAPIA CELULAR ADOPTIVA ANTI-VIRAL CON EMPLEO DE SCU

Investigaciones recientes *in vitro* sugieren el alto potencial, quizás único, de estas células, para generar productos biológicamente activos como herramientas terapéuticas que favorecen la adquisición del injerto, la inmunoterapia y, en el futuro, la medicina regenerativa.

Se han hecho intentos de infundir productos derivados de linfocitos T, para lo que se han tomado como fuente a donantes vírgenes a infecciones virales, que van a permitir una más rápida reconstitución inmunológica anti-viral, y varios autores han conseguido aislar células T virus-específicas, procedentes de SCU, y de adultos seronegativos.^{15,16}

Con esto, podría ser efectiva la transferencia adoptiva de células T del donante generadas *in vitro* con actividad específica antileucemia o antiviral. No obstante, esto requiere de la estimulación inmunorretadora *in vitro* y la expansión de células T precursoras del repertorio del donante de células T vírgenes, y de hecho, se ha conseguido la generación de linfocitos T CD8+ antígeno-específicos mediante el cocultivo de células mononucleares de sangre periférica depletadas de células T reguladoras (CD45RO-depletadas), con células dendríticas autólogas recubiertas con péptidos, seguido de dos estimulaciones con monocitos autólogos recubiertos con péptidos. Así, las células T respondedoras se aislaron sobre la base de su expresión de CD137 y la subsiguiente purificación, para lo que se utilizó el complejo tetramérico péptido/HLA, para generar células T de alta avidéz funcionalmente activas contra antígenos virales y se crea un método robusto para la inducción y el aislamiento *in vitro* de linfocitos T antígeno - específicos en donantes con un repertorio de células T vírgenes.¹⁷

Trabajar con un fenotipo de células T vírgenes derivadas de la SCU, podría reducir la EICH después del trasplante de CPH. Como estas células están en número absoluto muy reducidas, también retardan la reconstitución inmunológica, y esto provocaría una alta mortalidad por infecciones, con predominio del CMV, Adv y VEB. En esos casos, la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T citotóxicos virus-específicos (LTCs) podría prevenir de forma efectiva estas infecciones virales.

Gracias al empleo de células B infectadas con VEB transducidas por el vector adenoviral *Ad5f35CMVpp65* (aprobado para uso clínico como fuente de antígenos de VEB, Adv, y CMV), ya se han generado líneas de LTCs en cultivo derivadas de SCU que son específicas contra múltiples virus y se logró su expansión *in vitro*; y estas

LTCs, que contenían tanto subpoblaciones de células T CD4+ como CD8+, con un fenotipo predominante, el de célula efectora de memoria y con efecto citotóxico virus-específico restringido por el sistema HLA, contra dianas que expresan los antígenos de CMV, Adv y VEB, que demostraron ser de gran ayuda en la prevención y el tratamiento de las infecciones virales en los receptores de trasplantes de CMH alogénicos.¹⁸

De esta forma, se ha conseguido con éxito la expansión policlonal de células de SCU, tanto en medios de cultivo que contienen suero, como en medios de cultivo libres de suero fetal bovino estándar (aplicables clínicamente). Utilizando diferentes metodologías se han alcanzado expansiones en el rango de las 100 veces o más, basadas en el uso de moléculas coestimuladoras anti-CD3 anti-CD28 y la adición de interleucina 2 (IL2) *in vitro*.

La principal limitación en estos procedimientos resulta la sensibilidad de los linfocitos de SCU a la criopreservación, lo que reduce el rendimiento del proceso.¹⁹ Un paso intermedio para la producción de LTCs, es la generación de células presentadoras de antígenos (CPA), y son las células dendríticas, las CPA por excelencia. Existe sólida evidencia de la eficiencia en generar células dendríticas a partir de células mononucleares de SCU, tanto en medios que contienen suero fetal bovino estándar, como en libres de este (aplicables clínicamente). Los pasos clásicamente consisten en un cultivo con factor estimulante de colonias granulocíticas macrófágicas e IL4, y luego la maduración con el factor de necrosis tumoral (FNT), la prostaglandina PGE2 e IL6.¹⁹

OTRAS APLICACIONES DE LAS CÉLULAS DE SCU

Existen algunas experiencias que demuestran que la SCU puede generar LTCs específicos contra diferentes blancos: subtipos de HLA, antígenos tumorales como Her2/neu, y más recientemente, contra células leucémicas HA-1. También existe evidencia de que, mediante el empleo de productos para la expansión de células T, (Ej.: cuentas inmunomagnéticas anti-CD3 y CD28) se alcanza una expansión policlonal de células seleccionadas, tanto de médula ósea de adultos, como de SCU, según se muestran en estudios preliminares.²⁰

Estos progresos serán la base de nuevas terapias cada vez más efectivas en los trasplantes de CPH y permitirán incrementar la supervivencia y curación de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional del Cáncer. Diccionario del Cáncer. 2015. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=285915>. [Accedido: 12 de julio de 2015].
2. Barrett AJ, Bollard CM: The coming of age of adoptive T-cell therapy for viral infection after stem cell transplantation. *Ann Transl Med* 2015;3(5):62.
3. Jain NA, Lu K, Ito S, Muranski P, Hourigan CS, Haggerty J, et al. The clinical and financial burden of pre-emptive management of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation-implications for preventative treatment approaches. *Cytotherapy*. 2014;16:927-33.

4. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238-41.
5. Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med*. 1994;331:679-80.
6. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010;115:925-35.
7. Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, Kernan NA, Abramson S, Teruya-Feldstein J, et al. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;119:2644-56.
8. Sellar RS, Peggs KS. Therapeutic strategies for cytomegalovirus infection in haematopoietic transplant recipients: a focused update. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14:1121-6.
9. Odendahl M, Grigoleit GU, Bönig H, Neuenhahn M, Albrecht J, Anderl F, et al. Clinical-scale isolation of "minimally manipulated" cytomegalovirus-specific donor lymphocytes for the treatment of refractory cytomegalovirus disease. *Cytotherapy*. 2014;16:1245-56.
10. Ramírez N, Olavarría E. Viral-specific adoptive immunotherapy after allo-SCT: the role of multimer-based selection strategies. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:1265-70.
11. Gerdemann U, Katari UL, Papadopoulou A, Keirnan JM, Craddock JA, Liu H, et al. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol Ther*. 2013;21:2113-21.
12. Meij P, Jedema I, Zandvliet ML, van der Heiden PL, van de Meent M, van Egmond HM, et al. Effective treatment of refractory CMV reactivation after allogeneic stem cell transplantation with in vitro-generated CMV pp65-specific CD8+ T-cell lines. *J Immunother*. 2012;35:621-8.
13. Garcia Lopez J. Situación actual de los bancos de sangre de cordón umbilical y su utilidad terapéutica. *Acta Científica Tecnológica*. 2005(9):37-39.
14. Rivero-Jiménez R. Razones para un banco de sangre de cordón umbilical en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2014;31(1):1-4.
15. Sun Q, Burton RL, Pollok KE, Emanuel DJ, Lucas KG. CD4(+) Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes from human umbilical cord blood. *Cell Immunol*. 1999;195:81-8.
16. Park KD, Marti L, Kurtzberg J, Szabolcs P. In vitro priming and expansion of cytomegalovirus-specific Th1 and Tc1 T cells from naive cord blood lymphocytes. *Blood*. 2006;108:1770-3.
17. Jedema I, van de Meent M, Pots J, Kester MG, van der Beek MT, Falkenburg JH. Successful generation of primary virus-specific and anti-tumor T-cell responses from

the naive donor T-cell repertoire is determined by the balance between antigen-specific precursor T cells and regulatory T cells. *Haematologica*. 2011;96:1204-12.

18. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, Leen AM, Stanojevic M, Khalil M, et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood*. 2009;114:1958-67.

19. Breier DV, Querol S, García J. Alternativas terapéuticas en el post trasplante: Inmunoterapia adoptiva específica de sangre de cordón (SCU) umbilical en el post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. *Acta Científica y Tecnológica*. 2006;(11):30-32. (Accedido 15/07/2015). Disponible en: <http://www.aecientificos.es/escaparate/listarproductos.cgi?idcategoria=2631&refcompra=NULO>

20. Einsele H, Hebart H. CMV-specific immunotherapy. *Hum Immunol*. 2004;65(5):558-64.

Recibido: julio 15, 2015.

Aceptado: agosto 31, 2015.

René A. Rivero Jiménez. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268
Email: rhematologia@infomed.sld.cu