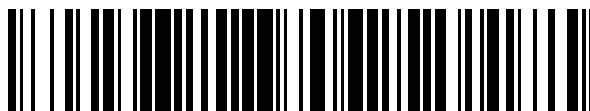


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 854**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007** **E 07797158 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012** **EP 1998811**

54 Título: **Inmunoterapia para pacientes con inmunosupresión**

30 Prioridad:

14.03.2006 US 374783

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**IRX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
140 WEST 57TH STREET, SUITE 9C
NEW YORK, NY 10019, US**

72 Inventor/es:

**HADDEN, JOHN, W. y
NAYLOR, PAUL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 854 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

Inmunoterapia para pacientes con inmunosupresión.

La invención se refiere al tratamiento de la inmunodeficiencia celular caracterizada por linfocitopenia T, uno o más defectos funcionales de las células dendríticas (v.g. los asociados con histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos) y/o uno o más defectos funcionales de los monocitos (v.g. los asociados con un test de piel de CMI (inmunidad mediada por las células) negativo).

La inmunodeficiencia celular es una deficiencia de la respuesta inmune en la cual el cuerpo no puede protegerse eficazmente por sí mismo contra los antígenos perniciosos. El sistema inmunitario en esta condición está de hecho desactivado. Tal deficiencia puede ser inducida por fármacos, es decir, por tratamiento con fármacos, inducida por virus (v.g. en el SIDA), o inducida por un estado de enfermedad tal como el cáncer. La inmunodeficiencia celular es común entre los pacientes de cáncer; el cuerpo no puede protegerse contra los antígenos tumorales, permitiendo que un tumor se desarrolle y produzca metástasis.

La inmunodeficiencia celular, esté relacionada o no con el cáncer, puede ser debida a defectos funcionales de las células T, células dendríticas y/o monocitos. Por ejemplo, uno o más defectos funcionales de las células T se cree que subyacen en la linfocitopenia T, una inmunodeficiencia celular caracterizada por niveles bajos de las células T de la sangre, y función deteriorada de los linfocitos existentes. Hasta la fecha, no existe ninguna vía aceptada generalmente (aprobada clínicamente) para tratar la linfocitopenia T. Los trasplantes de médula ósea (con o sin trasplantes de timo) se han utilizado para la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), tanto si la condición es congénita, como si está inducida por irradiación o quimioterapia. Se ha administrado IL-2 recombinante (rIL-2) a pacientes de SIDA con algún efecto, pero con mucha toxicidad. En general, la eficacia limitada y la importante toxicidad asociada con dosis altas de rIL-2, rIFN- γ , rTNF- α , y otras monoterapias, sugiere la reconsideración del uso de combinaciones naturales de citoquinas en estrategias terapéuticas.

Idealmente, para tratar o resolver una inmunodeficiencia celular tal como la linfocitopenia T, se desea el aumento del desarrollo y la proliferación de las células T, es decir, la regeneración de las células T. Sin embargo, se cree generalmente que no pueden ser generadas células T nuevas en el humano adulto. Por ejemplo, Mackall et al. en New England Journal of Medicine, Vol. 332, pp. 143-149 (1995) observaron la incapacidad de los adultos para generar células T nuevas, mientras que los niños retienen generalmente la capacidad de generar tales células. Dado que la linfocitopenia T se observa a menudo en pacientes de cáncer, Mackall et al. debaten el problema de intentar restablecer las células T después de la quimioterapia y/o radioterapia del cáncer en adultos. Existen pruebas, sin embargo, de que a continuación del trasplante de médula ósea después de quimioterapia intensa, pueden generarse células T nuevas en los adultos.

Se han utilizado dos enfoques a fin de generar células T nuevas en un intento de corregir la linfocitopenia T, como por ejemplo, en pacientes de cáncer. Un enfoque, la terapia con rIL-2, trata de expandir las células T ya en la periferia, es decir, las células T de memoria que son CD45 RO+, por ejemplo, en la sangre, los ganglios linfáticos, y el bazo. El otro enfoque implica aumentar la producción en el timo de células T nuevas a partir de precursores derivados de médula ósea. Esto sucede naturalmente en los niños, pero no en los adultos. Estas células nuevas se denominan "emigrados tímicos" recientes y tienen el marcador superficial de las células T "naïf", es decir, CD45 RA. El término "células T naïf", como se define en esta memoria, hace referencia a células T de nueva producción, incluso en adultos, en donde estas células T no han sido expuestas todavía a un antígeno. Dichas células T son por consiguiente inespecíficas de antígeno, pero son capaces de convertirse en específicas de antígeno después de la presentación de antígeno por una célula dendrítica madura que tenga un antígeno, tal como péptidos tumorales, expuesto en ella.

Si bien se cree que la linfocitopenia T es debida a defectos funcionales de las células T, otras inmunodeficiencias celulares pueden atribuirse a uno o más defectos funcionales de los monocitos o las células dendríticas. Los monocitos se definen en esta memoria como esencialmente sinónimos de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) adherentes y son precursores de los macrófagos y células dendríticas de origen mieloide.

Los defectos en la función de los monocitos pueden tener efectos de amplio alcance sobre la función inmune. Por ejemplo, dado que los monocitos/macrófagos juegan un papel importante en la generación de la inmunidad mediada por las células y la inflamación, los defectos funcionales de los monocitos pueden correlacionarse con respuestas inmunes negativas o reducidas mediadas por las células, tales como las detectadas por los tests estándar CMI o DTH. La corrección de los defectos funcionales de los monocitos podría promover por tanto respuestas inmunes mediadas por las células en los pacientes, v.g., por mejora de las respuestas proliferativas y citotóxicas de las células Th1.

Adicionalmente, las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno (APCs) altamente especializadas, capaces de establecer y controlar respuestas inmunes primarias (Hart, 1997; Matzinger, 1994; Steinman, 1991). Las DCs inmaduras residen en tejidos periféricos, donde aquéllas capturan y procesan el antígeno para presentación subsiguiente dentro del contexto de las moléculas del MHC I/II (Banchereau, 2000). En las DCs ocurren cambios fenotípicos y funcionales después del encuentro con estímulos microbianos, proinflamatorios o

derivados de las células T, un proceso al que se hace referencia como maduración. Generalmente, las DCs maduras están asociadas con la inducción de inmunidad comparada con las propiedades tolerogénicas de las DCs inmaduras (Steinman, 2002). Las características funcionales de las DCs maduras en comparación con las DCs inmaduras incluyen actividad fagocítica/endocítica reducida y aumento subsiguiente en la presentación de antígeno, una pérdida de expresión del antígeno CD1a y ganancia de expresión del antígeno CD83, expresión incrementada de antígenos MHC II, y expresión incrementada de moléculas co-estimuladoras y de adhesión tales como CD86, CD40, y CD54 (Celia, 1996; Cella, 1997; Schnurr, 2000; Berchtold, 1999). El efecto acumulativo de estos cambios da como resultado que las DC maduras tengan capacidad para migrar a las áreas de células T de los órganos linfoides de drenaje, donde aquéllas encuentran células T naif y presentan antígeno y moléculas co-estimuladoras a las células T, lo cual inicia una respuesta inmune adaptativa eficaz (Randolph, 2001; Sozzani, 1998).

La función deteriorada de las DCs en los hospedadores que padecen cáncer ha sido establecida para varios tipos de cánceres, que incluyen cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (al que se hace referencia en lo sucesivo como "H&NSCC"), de pulmón, de células renales, de mama y colorrectal (Gabrilovich, 1997; Chaux, 1996; Almand, 2000; Nestle, 1997; Tas, 1993; Thurnher, 1996; Hoffmann, 2002). Defectos caracterizados de las células DC dan como resultado un fallo en la presentación eficaz y exitosa de los antígenos tumorales a las células T, y tales defectos pueden caracterizarse de diversas maneras que incluyen regulación decreciente de componentes de la maquinaria procesadora de antígenos, expresión reducida de moléculas coestimuladoras y una reducción en el número de DCs que infiltran el tumor (Whiteside, 2004; Gabrilovich, 1997; Choux, 1997). Los pacientes de cáncer exhiben también una disminución de los números absolutos de DCs maduras en los ganglios periféricos sanguíneos y linfáticos (Hoffmann, 2002; Almand, 2000). Se ha demostrado que VEGF, un factor soluble secretado comúnmente por los tumores, aumenta la inducción de apoptosis en las DCs y está correlacionado negativamente con los números de DC en el tejido tumoral y la sangre periférica de pacientes con tipos de cáncer muy diferentes, con inclusión de H&NSCC (Lissoni, 2001; Saito, 1998; Smith, 2000). Globalmente, una falta de función DC impacta negativamente en las estrategias inmunoterapéuticas actuales y está correlacionada con resultados clínicos insatisfactorios. La corrección de los defectos funcionales de las células dendríticas podría aumentar el número de células dendríticas maduras que puedan interaccionar luego con los antígenos, v.g., los antígenos tumorales, para presentar tales antígenos a las células T para activación de la inmunidad mediada por las células y mediada por anticuerpos en un paciente.

Por ejemplo, la histiocitosis sinusal (SH) es una patología de los ganglios linfáticos observada en pacientes de cáncer, que se caracteriza por la acumulación en los ganglios linfáticos de grandes histiocitos que contienen células dendríticas inmaduras que han ingerido y procesado antígenos tumorales pero son incapaces de madurar completamente y presentar estos péptidos tumorales a las células T naif. Se cree que la SH está causada por un efecto en la producción de células dendríticas. Sin la presentación apropiada del antígeno a las células T, estas células T son incapaces de estimular las células efectoras Th1 y Th2, cuya estimulación conduce normalmente a inmunidad mediada por las células y mediada por anticuerpos, respectivamente, en el cuerpo.

Ha sido demostrado previamente por la solicitante en la Patente de Estados Unidos No. 5.698.194, que una mixtura de citoquinas naturales, NCM (a la que se hace referencia también en esta memoria como IRX-2), es eficaz en la promoción del desarrollo y la función de las células T en ratones viejos inmunodeficientes. Específicamente, se demostró que la NCM reduce la proporción de células T inmaduras y aumenta la proporción de células T maduras en el timo. La NCM incluía IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF, e IL-3, IL-4 e IL-7 en cantidades traza.

Ha sido demostrado también recientemente por la solicitante que pueden generarse células T naif en humanos adultos. Un método para inducir la producción de células T naif y exponer las células T naif a antígenos endógenos o exógenos en un sitio apropiado puede llevarse a cabo por administración de una NCM junto con ciclofosfamida (CY) en dosis bajas, indometacina (INDO), y cinc, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.977.072 otorgada a Hadden. Específicamente, se da a conocer un método para desbloquear la inmunización en un ganglio linfático regional de un paciente por la administración de una NCM. El desbloqueo de la inmunización ocurre por promoción de la diferenciación y maduración de células dendríticas inmaduras en un ganglio linfático regional, haciendo posible así la presentación por las células dendríticas maduras resultantes de péptidos pequeños a las células T a fin de promover la producción de células T. La NCM administrada incluye IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, y GM-CSF.

Los datos de la solicitante en la Patente de Estados Unidos No. 6.977.072 demostraron que la NCM de la invención más CY e INDO en dosis bajas puede aumentar el número de precursores de células T y los recuentos de linfocitos T en pacientes con H&NSCC. Los ganglios linfáticos de los pacientes con H&NSCC se distinguen a menudo por empobrecimiento en células T e histiocitosis sinusal. Más del 90% de los pacientes respondían al tratamiento y una mayoría tenía una reducción del tumor mayor que 50%. Datos preliminares sugerían que la inmunoterapia con la NCM en los pacientes de H&NSCC convierte las DCs en los ganglios linfáticos de un fenotipo CD86-/83+ inmaduro a DCs CD86+/83+ activadas y maduras (Hadden 2004). Adicionalmente, el tratamiento de estos pacientes de cáncer linfocitopénico con el régimen de combinación de NCM, CY e INDO daba como resultado una movilización notable de los linfocitos; en los casos analizados, estos pacientes exhibían aumentos en células T CD45RA+ (es decir, células T naif). Si bien se ha demostrado que este régimen de combinación desbloquea la inmunización en un ganglio linfático regional, no había pruebas suficientes a partir de los datos que indicaran si la NCM sola, es decir,

sin el tratamiento acompañante con CY e INDO, fuese capaz de tratar una inmunodeficiencia celular caracterizada por linfocitopenia T y/o los efectos funcionales de las células dendríticas asociados con la histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos.

Adicionalmente, en la Solicitud de Patente US No. 10/637869 (que fue publicada como Patente US 7.182.942 y WO 2005/025494), la solicitante aportó datos que indicaban que los pacientes de cáncer que tienen una reacción de test de piel intradérmico negativa a la NCM tienen una prognosis clínica mala. Sin embargo, cierto número de pacientes se convirtieron de una respuesta negativa del test de piel a respuesta positiva después de tratamiento con NCM, y estos pacientes convertidos exhibían respuestas clínicas y patológicas mejoradas. Se sugirió que un test de piel negativo a NCM refleja un defecto de los monocitos en el paciente, por lo cual las respuestas inmunes mediadas por las células eran deficientes, y el tratamiento con NCM puede remediar este defecto funcional.

La presente invención proporciona por tanto, para uso en el tratamiento de la inmunodeficiencia celular caracterizada por linfocitopenia T, por uno o más defectos de las células dendríticas (tales como los asociados con la histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos), y/o por uno o más defectos funcionales de los monocitos (tales como los asociados con un test de piel NCM negativo), una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una mezcla de citoquinas naturales como se define más adelante, sin administración acompañante de ciclofosfamida o indometacina.

La mezcla de citoquinas naturales se prepara en presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y en presencia continua o pulsada de un mitógeno, conteniendo la mezcla de citoquinas como componentes activos de citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α ; la IL-1 se halla a una concentración de 60 a 6.000 pcg por ml, la IL-2 se halla a una concentración 600 a 60.000 pcg por ml, la IL-6 se halla a una concentración de 60 a 6.000 pcg por ml, la IL-8 se halla a una concentración de 6.000 a 600.000 pcg por ml y el IFN- γ y TNF- α se hallan a una concentración de 200 a 20.000 pcg por ml. La mezcla de citoquinas puede comprender adicionalmente IL-12, GM-CSF, y G-CSF.

La composición utilizada de acuerdo con la invención causa una generación incrementada de células T naif, activación y maduración incrementadas de células dendríticas y activación y maduración incrementadas de monocitos/macrófagos.

Los tests inmunológicos en pacientes con cáncer han tenido utilidad limitada en la predicción de los resultados del tratamiento. Muchos tipos de estudios inmunológicos han contribuido a delinear defectos inmunológicos en pacientes con cáncer sobre una base experimental, pero pocos tests han sido aplicados prácticamente en clínica para diagnosticar y monitorizar estos pacientes. Dos tests han demostrado ser útiles, a saber: 1) los recuentos de linfocitos, específicamente células T y subconjuntos; y 2) la reactividad de la piel al dinitroclorobenceno (DNCB) como test de inmunidad mediada por las células (CMI, denominada también hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). El último test es engorroso y requiere inmunización y exposición días más tarde, por lo que ya no se utiliza clínicamente. El primero se utiliza aunque sin énfasis, como medio de predicción de resultado. Así pues, hay una gran necesidad de tests que reflejen el estado de inmunidad celular de los pacientes de cáncer.

Existen dos ramas diferentes del sistema inmunitario que suscitan una respuesta del test de piel DTH o CMI: la20ramaafere (de entrada) y la20ramaefere (de salida). La rama afere implica la proliferación de células T desencadenada por antígenos o mitógenos y la producción de citoquinas. La rama efere implica la afluencia de monocitos inducida por citoquinas, y la producción de monoquinas que conduce a inflamación medida por eritema e induración.

Durante los años 1970, varios grupos utilizaron un test de piel con el mitógeno de las células T fitohemaglutinina (PHA). El test de piel PHA parecía proporcionar el mismo tipo de información que el test de piel DNCB, es decir, los pacientes sensibles respondían de modo clínicamente satisfactorio y los pacientes insensibles respondían deficientemente. Sin embargo, PHA estimula ambas ramas de la respuesta y por consiguiente un test de piel PHA negativo puede reflejar varios defectos: células T insuficientes, función deprimida de las células T, o un defecto en la función de los monocitos. Otros mitógenos de las células T que pueden utilizarse para tests de piel predictivos incluyen anticuerpos monoclonales anti-CD3, v.g., OKT3 (OrthoClone®).

La invención proporciona un tratamiento siguiendo un test de piel que refleja la respuesta dla20ramaefere, es decir, el componente de la respuesta inmune dependiente de los monocitos. La composición NCM puede utilizarse como test diagnóstico de piel para predicción del resultado del tratamiento, v.g., en pacientes de cáncer.

Además de las inmunodeficiencias celulares arriba indicadas, en algunos casos, las células T están suprimidas endógenamente por lesiones de cáncer. Sería ventajoso bloquear esta supresión a fin de que las células T puedan funcionar normalmente para ayudar al sistema inmunitario. A este respecto, se ha observado que el agente antineoplástico ciclofosfamida (CY), si bien es inmunosupresor en dosis altas, actúa para inhibir las células supresoras T, y por consiguiente mejora las respuestas inmunes, cuando se administra en dosis bajas (Berd et al.; Ehrke MJ, 2003). Como tal, CY actúa como inhibidor químico de la inmunosupresión. Si bien CY se ha empleado en inmunoterapia eficaz de pacientes de cáncer (Weber J., 2000; Murphy 1999; Hadden, 1994), ningún dato ha demostrado hasta ahora una respuesta clínica aceptable combinada con toxicidad baja o nula. Adicionalmente, dado que se sabe que las prostaglandinas son inmunosupresoras, podría pensarse que un compuesto que bloquee la

síntesis de prostaglandinas, tal como un agente anti-inflamatorio no esteroide, fuese útil para inhibir esta inmunosupresión.

El uso de acuerdo con la invención puede ser el tratamiento del cáncer, en el cual los pacientes sufren de inmunodeficiencias celulares, sea debido a las terapias del cáncer o debido al efecto inmunosupresor del propio cáncer. El uso puede ser también tratamiento de otros estados de enfermedad caracterizados por inmunodeficiencias celulares tales como la linfocitopenia T u otras inmunodeficiencias secundarias, tales como las caracterizadas por uno o más defectos funcionales de los monocitos o las células dendríticas.

Se hará referencia ahora a los dibujos acompañantes, en los cuales:

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el tamaño de los ganglios linfáticos en controles normales, controles de cáncer o poblaciones con H&NSCC tratadas con NCM;

La Figura 2A es un gráfico de barras que muestra el área de las células T;

La Figura 2B muestra la densidad en controles normales, controles de H&NSCC y pacientes de H&NSCC tratados con NCM;

La Figura 3A es un gráfico de barras que compara el área de las células B y la Figura 3B es un gráfico de barras que compara los folículos en los 3 grupos de tratamiento;

La Figura 4A muestra una comparación de otras células y la Figura 4B muestra una comparación de la histiocitosis sinusal en los 3 grupos de tratamiento;

La Figura 5 es un gráfico que muestra un diagrama de ajuste Ganglio B&T (células B y células T) y Tumor B&T;

La Figura 6A es un gráfico de barras que ilustra la acumulación de DCs CD83+ parcialmente inmaduras en los ganglios linfáticos de pacientes de cáncer SH+;

La Figura 6B es un gráfico de barras que muestra un aumento en el número de DCs CD86+ activadas después de tratamiento con NCM (IRX-2);

La Figura 7 es un gráfico que muestra que NCM (IRX-2) induce maduración de las células DC tal como se detecta por una expresión incrementada de CD83 en las DCs;

La Figura 8 representa el efecto de NCM sobre la morfología de las DCs derivadas de monocitos en preparaciones Cytospin. Las células tratadas con NCM (Figura 8B) exhibían las características morfológicas de las DCs maduras, tales como proyecciones celulares y grandes núcleos de forma irregular;

La Figura 9 contiene histogramas que muestran la regulación decreciente de la expresión del antígeno CD1a y la regulación al alza de la expresión de los antígenos MHC II, CD86, CD40, y CD54 (ICAM-1) por PBMCs incubados con NCM (IRX-2). Estos cambios indican que NCM estimula la maduración de DCs.

La Figura 10 es un gráfico que muestra que NCM (IRX-2) reduce la actividad endocítica de las DCs inmaduras, actividad reducida que es indicativa de la maduración de DC.

La Figura 11 es un gráfico que muestra que NCM (IRX-2) aumenta la capacidad estimuladora de las células T de DCs, aumento que es indicativo de maduración y activación de DC;

La Figura 12A es un gráfico de barras que muestra que NCM (IRX-2) aumenta el número de DCs que producen IL-12 intracelularmente. IL-12 es una citoquina producida por las DCs maduras activadas;

La Figura 12B es un gráfico de barras que muestra que NCM (IRX-2) aumenta la cantidad total de IL-12 bioactiva secretada por DCs;

La Figura 13 es un gráfico de barras que muestra que NCM (IRX-2) disminuye la apoptosis mediada por VEGF en DCs, que indica un efecto protector de NCM sobre la supervivencia de DC;

La Figura 14A contiene dos gráficos de barras que representan el aumento en porcentaje de la tinción positiva de monocitos/macrófagos para la combinación de marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, después de tratamiento de PBMCs adherentes con NCM, como se determina por citometría de flujo.

La Figura 14B es una serie de gráficos de barras que representa el aumento en la intensidad media de fluorescencia (MFI) para los marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, después de tratamiento de PBMCs adherentes con NCM, como se determina por citometría de flujo.

La Figura 15 contiene gráficos de barras que demuestran que la NCM de la invención activa los monocitos/macrófagos, es decir, induce la expresión de marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, en mayor grado que TNF- α .

La Figura 16 contiene gráficos de barras que demuestran que la NCM de la invención activa los monocitos/macrófagos, es decir, induce los marcadores de activación, HLA-DR, CD86 y CD40, incluso en presencia de la citoquina inmunosupresora IL-10. La NCM es mejor en cuanto a la activación de monocitos/macrófagos que LPS, tanto en presencia como en ausencia de IL-10.

- 5 La Figura 17 es un gráfico de barras que demuestra que la NCM de la invención estimula la producción de TNF- α por los monocitos/macrófagos activados y contrarresta los efectos inmunosupresores de IL-10. La NCM estimulaba la producción de TNF- α en mayor proporción que LPS.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "inhibidor químico" denota un agente quimioterapéutico que no es inmunosupresor (utilizado preferiblemente a dosis bajas) y que tiene efectos inmunomoduladores tales como

- 10 aumento de inmunidad y/o respuesta inmune, v.g., por inhibición de la inmunosupresión y los mecanismos supresores.

Como se utiliza en esta memoria, el término "adyuvante" denota una composición que tiene capacidad para aumentar la respuesta inmune a un antígeno particular. Dicha capacidad se manifiesta por un aumento significativo en la protección mediada por el sistema inmunitario. Para ser eficaz, un adyuvante debe suministrarse en o cerca del

- 15 sitio del antígeno. El aumento de la inmunidad se manifiesta típicamente por un aumento significativo (usualmente mayor que 10 veces) en el título de anticuerpos generado contra el antígeno. La mejora de la inmunidad celular puede medirse por un test de piel positivo, ensayo de células T citotóxicas, ensayo ELISPOT para IFN- γ o IL-2, o infiltración de células T en el tumor (como se describe más adelante).

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "antígeno asociado al tumor" denota una proteína o un péptido u otra molécula capaz de inducir una respuesta inmune a un tumor. Esta puede incluir, pero sin carácter limitante, péptidos PSMA, péptidos MAGE (Sahin, 1997; Wang, 1999), los péptidos del virus del papiloma (E6 y E7), fragmentos MAGE, NY ESO-1 u otros antígenos similares. Previamente, estos antígenos no se consideraban eficaces para el

- 20 tratamiento de pacientes basándose en su tamaño, es decir, que se consideraba que eran demasiado pequeños, o se pensaba anteriormente que carecían de propiedades inmunógenas (es decir, se consideraban como autoantígenos).

Como se utiliza en esta memoria, "NCM" denota una mixtura de citoquinas naturales, como se define y se expone en las Patentes de Estados Unidos Núms. 5.632.983 y 5.698.194. La NCM puede incluir citoquinas recombinantes. Resumidamente, la NCM se prepara en presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y en presencia

- 30 continua o pulsada de un mitógeno, que en la realización preferida es PHA.
- Un objetivo de la invención consiste en promover la producción de células T naíf. Las células T "naíf" son células T de nueva producción, incluso en adultos, que no se han expuesto todavía a un antígeno. Tales células T son inespecíficas pero capaces de volverse específicas después de presentación por una célula dendrítica madura que posee antígeno, tal como péptidos tumorales, expuesto en ella. En la Patente US 6.977.072 se demostró que la administración de una NCM, junto con ciclofosfamida e indometacina en dosis bajas a pacientes con
- 35 inmunosupresión que padecían cáncer de cabeza y cuello conducía a un aumento de células T naíf inmaduras (portadoras de los antígenos CD3 y CD45RA) en la sangre de estos pacientes (véase el Ejemplo 1 más adelante). Esta fue una de las primeras demostraciones de que los adultos humanos pueden generar células T naíf. Sin embargo, con anterioridad se desconocía si una NCM *sola* (es decir, sin la administración acompañante de CY e INDO) puede producir los efectos de la combinación de NCM, CY, e INDO a que se ha hecho referencia arriba.

- 40 Así pues, la presente invención proporciona el uso de una NCM de este tipo sin administración acompañante de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos. Como muestran los datos del Ejemplo 2 siguiente, la administración de NCM sola a pacientes de cáncer causa un aumento significativo en los recuentos de linfocitos, y específicamente, causa un aumento en las células T tanto CD3+ como CD4+. Así pues, la administración de acuerdo con la invención de una NCM sola puede conseguir los efectos deseados obtenidos previamente por la administración de una NCM
- 45 en asociación con ciclofosfamida e indometacina en dosis bajas.

La NCM contiene preferiblemente una concentración de IL-1 de 150-1200 pcg/ml; una concentración de IL-2 de 3000 a 12000 pcg/ml; una concentración de IL-6 de 300 a 2000 pcg/ml; una concentración de IL-8 de 20.000 a 180.000 pcg/ml; y concentraciones de IFN- γ y TNF- α , respectivamente, de 1000 a 4000 pcg/ml.

- 50 Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno altamente especializadas que pueden establecer y controlar respuestas inmunes primarias. Las mismas capturan el antígeno, v.g., en los tejidos periféricos, y migran a las áreas de las células T de los órganos linfoides secundarios de drenaje, donde aquéllas encuentran células T naíf y presentan el antígeno a las células T, iniciando así una respuesta inmune al antígeno. Uno o más defectos en la función de las células dendríticas podrían tener un efecto deletéreo sobre el sistema inmunitario.

- 55 El uso de acuerdo con la invención puede ser para histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos, una patología de los ganglios linfáticos observada en pacientes de cáncer, que se cree está asociada con un defecto funcional de las células dendríticas, con acumulación de DCs CD83+, CD86- parcialmente inmaduras. Como se ha indicado, las células dendríticas normales capturan antígenos en el sitio de infección o inmunización y migran a un ganglio linfático situado aguas abajo donde los antígenos son presentados a las células T naíf para promover inmunidad.

Las células dendríticas inmaduras en los ganglios linfáticos de los pacientes con SH no pueden presentar eficazmente los antígenos a las células T naíf. Por tanto, un objetivo de la presente invención es invertir la histiocitosis sinusal, es decir, por promoción de la maduración de las células dendríticas, v.g., en pacientes de cáncer que padecen SH.

- 5 Los datos presentados en el Ejemplo 3 siguiente demuestran que la NCM constituida por las 6 citoquinas críticas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α induce la maduración de las células DC. Por ejemplo, se demostró que la NCM de la invención aumenta la expresión de CD83, un marcador fundamental de la maduración de DC, en DCs. Más específicamente, los datos contenidos en el Ejemplo 3 demuestran que la NCM de la invención es un potente activador de las células dendríticas como se mide por criterios morfológicos, fenotípicos y funcionales. Así, se
- 10 demostró que NCM promueve cambios morfológicos en las DCs indicativos de maduración. Se demostró también que NCM regula en sentido decreciente la expresión del antígeno CD1a en la superficie de las células DC, regula en sentido creciente la expresión de antígeno CD83 y MHC II en la superficie de las células DC, y aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión de las células T, v.g., CD86, CD40, y CD54 (ICAM-1), en la superficie de las células DC. Adicionalmente, se demostró que NCM regula en sentido decreciente la actividad endocítica de
- 15 las DCs (lo que es consistente con la maduración de las DCs), aumenta la actividad estimuladora de las células T de las DCs (como se demuestra por actividad MLR incrementada) y aumenta la producción de IL-12 por las DCs, siendo IL-12 en sí misma un factor esencial en la diferenciación de las células T naíf adyuvantes de las CD4+ (en células Th1) y la activación y proliferación de los componentes celulares y fagocíticos del sistema inmunitario. Por último, se demostró que NCM reduce la apoptosis de las DCs inducida por VEGF. Este efecto anti-apoptótico de
- 20 NCM podría jugar un papel fundamental en el mantenimiento de la supervivencia de las DCs maduras en un escenario de tumor, permitiendo una presentación de antígeno prolongada y activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno tumoral.

Así pues, la NCM puede utilizarse sola, es decir, sin tratamiento acompañante con CY e INDO como se ha sugerido previamente, para alcanzar el resultado deseado de aumento de la producción de DCs maduras.

- 25 El uso de acuerdo con la invención puede ser para el tratamiento de una inmunodeficiencia celular caracterizada por uno o más defectos funcionales de los monocitos, v.g., que conducen a un test de piel negativo para NCM en un paciente. Los monocitos son precursores tanto de células dendríticas como de macrófagos y por tanto cualquier defecto funcional de los monocitos puede afectar negativamente a diversos procesos inmunológicos en el cuerpo. En el pasado, un test de piel negativo para NCM ha predicho una respuesta clínica mala para el tratamiento en
- 30 pacientes de cáncer. Como se ha indicado arriba, se cree que un test de piel negativo de este tipo indica uno o más defectos en la función de los monocitos. Previamente, se demostró que cierto número de pacientes negativos en el test de piel NCM tratados con NCM, CY, e INDO en combinación se convertían a una condición positiva del test de piel NCM, lo que sugería que este tratamiento de combinación corregía un defecto funcional de los monocitos. Nuevos datos, tales como los que se proporcionan en el Ejemplo 9 de esta memoria, demuestran que la NCM que
- 35 incluye las 6 citoquinas críticas, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α , por sí sola, es decir, sin tratamiento acompañante con CY e INDO, es responsable en la corrección de este defecto funcional de los monocitos. Más específicamente, los datos de esta memoria demuestran que NCM sola es un activador potente de monocitos/macrófagos. Por ejemplo, NCM aumenta significativamente los marcadores de activación de monocitos/macrófagos, es decir, HTA-DR, CD86, CD40 y CD80. Adicionalmente, se ha demostrado que NCM es un
- 40 activador más potente de monocitos/macrófagos que TNF- α o LPS, y la NCM era capaz de continuar activando las células incluso en presencia de la citoquina inmunosupresora IL-10.

- La invención es por consiguiente útil en el tratamiento de inmunodeficiencias celulares caracterizadas por defectos funcionales de los monocitos, tales como aquellas inmunodeficiencias que se caracterizan por un test de piel negativo a NCM. La NCM administrada para tratar un defecto funcional de los monocitos de acuerdo con la presente
- 45 invención contiene preferiblemente las 6 citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α en los intervalos de concentración arriba descritos.

- La NCM puede utilizarse en un test de piel para predecir el resultado del tratamiento. Este test de piel refleja únicamente la respuesta de la rama eferente, es decir, el componente dependiente de los monocitos. La Solicitud de Patente US 10/637869 (publicada como WO 2005/025494) y el Ejemplo 5 siguiente exponen la utilización de la NCM
- 50 como test de piel de diagnóstico para predecir el resultado del tratamiento por administración de una NCM por vía intracutánea y determinación de una respuesta a la NCM dentro de 24 horas. Un test de piel negativo indica insensibilidad a la NCM y la inmunoterapia y predice la falta de respuesta de los pacientes de cáncer a la cirugía con o sin radioterapia. Los Ejemplos 6 y 7 siguientes demuestran que el test de piel NCM no sólo predice la respuesta al tratamiento con NCM y a la inmunoterapia más cirugía $\pm$ radioterapia, sino que predice también la supervivencia
- 55 global, el tiempo hasta la recurrencia, y la esperanza de vida.

Así pues, la NCM puede utilizarse para predecir el resultado del tratamiento en pacientes de cáncer, con inclusión de la respuesta a la cirugía (con o sin tratamientos acompañantes tales como radioterapia o quimioterapia), supervivencia global, el tiempo hasta la recurrencia y esperanza de vida.

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

Preferiblemente, la NCM se inyecta alrededor de los vasos linfáticos que drenan en ganglios linfáticos regionales para una lesión, tal como un tumor u otras lesiones persistentes que se estén tratando. La administración perilinfática en los vasos linfáticos que drenan en los ganglios linfáticos regionales para la lesión, tal como un cáncer, es crítica. La inyección peritumoral ha sido asociada con respuesta escasa, incluso progresión, y está por tanto

5 contraindicada. Un esquema de inyección en diez (10) días es óptimo y un protocolo de inyección de veinte (20) días, si bien es eficiente clínicamente, tiende a reducir la respuesta Th1 y cambiar hacia una respuesta Th2 menos deseable como se mide por infiltración linfocítica en el cáncer. Las inyecciones bilaterales son eficaces. En los casos en que se ha producido una disección radical de cuello, es eficaz la inyección contralateral.

La administración puede ser anterior o posterior a cirugía, radioterapia, quimioterapia, o combinaciones de las mismas; durante la recurrencia de los tumores, es decir, durante un periodo en el cual está produciéndose

10 nuevamente crecimiento del tumor después de un periodo en el cual se creía que los tumores habían desaparecido o se hallaban en remisión.

La NCM puede administrarse y dosificarse para promover la inmunización óptima a un antígeno sea exógeno o endógeno, teniendo en cuenta la afección clínica del paciente individual, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente. La "cantidad eficaz" en términos

15 farmacéuticos para los propósitos de esta invención se determina así por consideraciones tales como las conocidas en la técnica. La cantidad tiene que ser eficaz para promover inmunización, conduciendo a, v.g., reducción del tumor, fragmentación del tumor e infiltración de leucocitos, recurrencia retardada o tasa de supervivencia mejorada, o mejora o eliminación de los síntomas.

En los métodos de la presente invención, los compuestos de la presente invención pueden administrarse de diversas maneras. Debe indicarse que los mismos se pueden administrar como el compuesto o como un derivado farmacéuticamente aceptable, y pueden administrarse solos o como un ingrediente activo en combinación con

20 portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos se pueden administrar intra- o subcutáneamente, o peri- o intralinfáticamente, intraganglionariamente o intraesplénicamente o por vía intramuscular, intraperitoneal, e intratorácica. También pueden ser útiles implantes de los compuestos. El

25 paciente a tratar es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos con inclusión del hombre. Los portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los portadores de implantes se refieren generalmente a cargas inertes no tóxicas sólidas o líquidas, diluyentes o material de encapsulación que no reacciona con los ingredientes activos de la invención.

Las dosis pueden ser dosis simples o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días. En el momento de la administración del compuesto de la presente invención, el mismo se formula generalmente en forma unitaria de

30 dosis inyectable (v.g. 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 estériles inyectables. El portador puede ser un medio disolvente o dispersante que contenga, por

35 ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y análogos), mixturas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos. Vehículos no acuosos tales como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja,

40 aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete, y ésteres, tales como miristato de isopropilo, pueden utilizarse también como sistemas disolventes para composiciones compuestas. Adicionalmente, pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad, e isotonicidad de las composiciones, con inclusión de conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y tampones. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes,

45 clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y análogos. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y análogos. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo por el uso de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, cualquier vehículo, diluyente, o aditivo utilizado tendría que ser compatible con los compuestos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles por incorporación de los compuestos utilizados en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes, según se desee.

50

Una formulación farmacológica utilizada en la presente invención puede administrarse al paciente en una formulación inyectable que contenga cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, líquidos, y

55 diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención se pueden administrar por vía parenteral al paciente en la forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de suministro direccionado tales como anticuerpos monoclonales, suministro vectorizado, sistemas iontoforéticos, matrices de polímero, liposomas, y microesferas. Ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen los descritos en las Patentes U.S. Núms. 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 implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

- 5 Todos los pasos relativos a cultivo de células se realizan en condiciones estériles. Los métodos generales de inmunología celular descritos en esta memoria se realizan como se describe en referencias generales para técnicas de inmunología celular tales como Mishell y Shiigi (Selected Methods in Cellular Immunology, 1981) y son bien conocidos por quienes poseen experiencia en la técnica.

Preparación de la Mixtura de Citoquinas Naturales (NCM)

- 10 La NCM (a la que se hace referencia también en esta memoria como IRX-2) es una mixtura definida de citoquinas producida en condiciones GMP a lo largo de un periodo de 24 horas después de estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) por fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacino. La fuente de los PBMCs está constituida por capas superficiales de plasma coagulado cribadas y testadas, adquiridas de bancos de sangre autorizados por la FDA. Después de la estimulación con PHA, el mitógeno se elimina por centrifugación y lavado. Todos los elementos celulares se eliminan por centrifugación, y el DNA se separa por cromatografía de intercambio aniónico. El sobrenadante exento de células se esteriliza por filtración y se somete a nanofiltración para permitir la eliminación del virus, designándose IRX-2. Un test QC severo que incluye a la vez bioensayo y determinación por ELISA de los niveles de citoquinas asegura la consistencia del IRX-2. Tests de seguridad con respecto a esterilidad, DNA, micoplasmas, endotoxinas y tests de virus para CMV y EBV forman parte también del proceso GMP. Se ha administrado IRX-2 en condiciones de seguridad a más de 150 pacientes en diversas pruebas clínicas, y se encuentra actualmente en tests de Fase I/II bajo una IND aprobada por la FDA.

Más específicamente, la NCM puede prepararse como sigue:

- 25 Se recogen los glóbulos blancos de capas superficiales de plasma coagulado de sangre humana procedente de donantes múltiples negativos al HIV y negativos al virus de la hepatitis. En una realización alternativa, la fuente de células para usos veterinarios podrían ser animales. Las células de los donantes se agrupan y se estratifican en gradientes Ficoll-Hypaque (Pharmacia) para producir linfocitos exentos de neutrófilos y eritrocitos. Podrían utilizarse métodos alternativos que darían como resultado la misma población de linfocitos de partida como se conocen en la técnica.

- 30 Los linfocitos se lavan y se distribuyen en medio X-VIVO 10 (Whittaker Bioproducts) en matraces de cultivo de células activadas en superficie para selección de los subconjuntos de células. Los matraces (MICROCELLECTOR™ T-25 Cell Culture Flasks) contienen estimulantes inmovilizados, es decir mitógenos, tales como PHA. El proceso de inmovilización para los estimulantes es como se describe por el fabricante para inmovilización de diversas sustancias para procedimientos de lavado en batea, es decir, separación de células, en los matraces. Alternativamente, los linfocitos se exponen a estimulantes, v.g., PHA, durante 2-4 horas y se lavan luego 3 veces.

- 35 Las células se incuban durante 24-48 horas en medio X VIVO-10 con 80 µg/ml de ciprofloxacino (Miles Lab) a 37°C en una incubadora CO₂/aire. Alternativamente, podría utilizarse medio RPMI 1640 (Webb et al. 1973). Puede añadirse HSA (seroalbúmina humana) para estabilizar adicionalmente las interleuquinas si se utiliza medio exento de HSA para generaciones. Generalmente, se utiliza HSA al 0,1 a 0,5% (peso/volumen). Después de la incubación, se vierten y se recogen los sobrenadantes. Los sobrenadantes se guardan a 4°C hasta -70°C.

Ejemplo 1

- 40 Inyecciones perilinfáticas locales en el cuello con NCM además de tratamiento con CY en dosis bajas (a 300 mg/m²), INDO (25 mg por vía oral 3 veces al día), y cinc (65 mg de cinc elemental como sulfato por vía oral una vez al día) han inducido regresiones clínicas en un alto porcentaje de pacientes con cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (H&NSCC) (Hadden, 1994; Meneses, 1998B; Barrera, 2000; Hadden, 2003; Meneses, 2003) con evidencia de supervivencia mejorada exenta de recurrencia. Globalmente, con inclusión de respuestas menores (25%-50%), contracción del tumor y reducción del tumor en especímenes patológicos, más del 90% respondieron y la mayoría tuvieron más de 50% de reducción del tumor.

- 50 Se especula que estas respuestas están mediadas por regresión inmune dado que se observaron tanto linfocitos B como linfocitos T que infiltraban los tumores. La terapia no estaba asociada con toxicidad importante. El tratamiento de pacientes de cáncer linfocitopénico con la combinación de NCM ha dado como resultado una movilización notable de los linfocitos; en los casos analizados, estos pacientes exhibían aumentos de células T positivas a CD45RA (es decir, células T naíf (véase la Tabla I siguiente)). Adicionalmente, la inyección intratumoral o peritumoral de NCM en pacientes con H&NSCC dio como resultado regresión del tumor inducida por inmunoterapia de inversión o progresión del tumor. Por tanto, el tumor no es el sitio de inmunización. En lugar de ello, el análisis de ganglios linfáticos regionales reveló que el ganglio linfático regional es el sitio de inmunización para los antígenos tumorales supuestos (Meneses, 2003; véase Figuras 1-5). Ninguno de estos pacientes tratados con NCM desarrolló metástasis, que podrían haberse esperado en el 15% de los pacientes clínicamente y hasta 50% patológicamente. Estos resultados indican que se había inducido inmunidad sistémica más bien que inmunidad meramente local. Los

pacientes se testaron previamente con un test de piel para 0,1 ml de NCM antes del tratamiento, y más del 90% de los que presentaban un test de piel positivo ($> 0,3$ mm a las 24 horas) tenían respuestas clínicas y patológicas fuertes. Los pacientes con test de piel negativos tenían respuestas débiles o nulas. Así pues, el test de piel selecciona pacientes que responden satisfactoriamente.

- 5 Se observaron luego aumentos mayores en los recuentos de linfocitos T (CD3) 752 $\rightarrow$ 1020 para estos pacientes de linfocitopenia T (recuentos de células T 752 frente a 1600 (normal)). Merece destacarse que había un aumento correspondiente en células T "naif" CD45RA positivas (532 $\rightarrow$ 782). Como se ha mencionado anteriormente, generalmente no se cree que estos aumentos ocurran en adultos, particularmente con una farmacoterapia como NCM. Estas células son supuestamente emigrados tímicos recientes y podrían considerarse como una capacidad
- 10 nueva importante para responder a nuevos antígenos como los antígenos tumorales. Las células CD45RA-positivas preexistentes no respondían a los antígenos tumorales, y pueden haber sido incapaces de hacerlo así debido a inmunosupresión inducida por el tumor (anergia).

Tabla I: Tratamiento de Pacientes Linfocitopénicos con H&NSCC con Aumentos de NCM en Células T Naif T en Sangre (#/mm)

PACIENTE #	MARCADOR DE CÉLULAS T NAIF			MARCADOR DE CÉLULAS PAN T		
	PRE	POST	AUMENTO	PRE	POST	AUMENTO
1	479	778	+299	704	1171	+467
2	938	1309	+371	1364	1249	-115
3	98	139	+41	146	178	+32
4	341	438	+97	655	590	-65
5	567	652	+97	453	643	+190
6	658	1058	+400	1118	1714	+569
7	642	1101	+459	822	1601	+779
VALOR MEDIO	532	782	+250	752	1020	+269

- 15 La bibliografía (Hadden JW, Int'l J Immunopharmacol 11/12:629-644, 1997; Hadden JW, Int'l J Immunopharmacol 21:79-101, 1999) indica que tanto para SCC como para LOS adenocarcinomas, los dos tipos principales de cáncer, los ganglios linfáticos regionales reflejan anomalías relacionadas con el tumor, que incluyen histiocitosis sinusal, agotamiento de linfoides y a menudo la presencia de linfocitos asociados con tumores capaces de reaccionar a las células tumorales (con IL-2). En caso de metástasis, ocurren agotamiento de linfoides y
- 20 función deprimida. Un análisis no publicado de ganglios linfáticos cervicales no implicados en 10 pacientes de H&NSCC y 10 controles normales demostró una reducción en el tamaño medio de los ganglios linfáticos y un aumento en la histiocitosis sinusal asociado con H&NSCC (véanse las Figuras 1-4A y B de la presente solicitud).

- Después del tratamiento con un solo ciclo del protocolo NCM (Hadden, 1994; Meneses, 1998; Barrera, 2000), los ganglios linfáticos cervicales no implicados exhibían los cambios indicados en las Figuras 1-4. Comparados con los
- 25 ganglios linfáticos regionales de pacientes con H&NSCC no tratados con NCM, estos ganglios exhibían un aumento importante de tamaño, área de células T y densidad, y disminuciones en número de centros germinales, histiocitosis sinusal y congestión. Los ganglios linfáticos de los pacientes tratados estaban estimulados todos ellos y eran mayores que los ganglios de control, con área de células T y densidad incrementadas. Por tanto, estos ganglios no sólo se restablecían a los valores normales, sino que exhibían evidencia de predominio de células T, una correlación
- 30 positiva con la supervivencia conocida en H&NSCC (Hadden, 1997).

- Merece destacarse que, cuando los cambios de ganglios linfáticos relacionados con las áreas de las células B y T se correlacionaron con los cambios en sus tumores que reflejaban infiltración de células T y B, se obtuvo un alto grado de correlación para las células T ($p < 0,01$) y células B ($< 0,01$) y presencia global de linfoides ($p < 0,001$) (Figura 5). A su vez, estos cambios se correlacionaban con reducción del tumor por criterios patológicos y clínicos. Estos
- 35 descubrimientos indican que las reacciones tumorales están correlacionadas directa y positivamente con cambios de los ganglios linfáticos y que la reacción tumoral refleja los cambios de los ganglios linfáticos como la variable dependiente. Estos descubrimientos, tomados en asociación con el conocimiento acerca del modo en que en general el sistema inmunitario (Roitt I, 1989), y transfección tumoral subsiguiente con un gen de citoquina (Maass G, 1995), indican que el protocolo NCM inmuniza estos pacientes para antígenos tumorales todavía sin identificar al
- 40 nivel de los ganglios linfáticos. Nadie ha presentado con anterioridad pruebas de cambios de los ganglios linfáticos que reflejen inmunización con antígenos tumorales autólogos. Esto confirma que la presente invención puede inducir inmunización con antígenos tumorales anteriormente ineficaces o poco eficaces en un efecto para producir la regresión de metástasis distantes.

Ejemplo 2

- 45 Corrección por NCM de la Linfocitopenia T

El objetivo del experimento siguiente fue evaluar el efecto de un tratamiento por inyección durante 10 días de NCM que contenía las 6 citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α (115 unidades de equivalencia de IL-2/día) sobre los recuentos de linfocitos (LC) de pacientes linfocitopénicos. Estos pacientes se habían recuperado de cirugía y radioterapia previas para cáncer de cabeza y cuello, y sufrían linfocitopenia persistente con recuentos medios de 441 células/mm³. Los niveles normales de LC son 2000 células/mm³. Los pacientes estaban exentos de cáncer en el momento del tratamiento. Se obtuvieron LC el día 0 y el día 13. Los linfocitos T (CD3+) y subconjuntos de células T (CD4+ o CD8+) se evaluaron por citofluorometría. La Tabla II presenta los datos para 5 pacientes que respondían. Se observaron aumentos importantes para LC y células T CD3+ y CD4+.

Tabla II

Pt. Número	TLC*	CD3*	CD4*	CD8*
1	100	83	28	40
2	136	62	52	55
3	100	63	24	3
4	100	74	331	-20
5	100	166	173	-16
Media $\pm$ SEM	107 $\pm$ 7	90 $\pm$ 19	122 $\pm$ 59	12 $\pm$ 15

*Cambios en número de células por mm³ desde el día 0 al día 13.

Estos cambios se comparan favorablemente con los encontrados para dosis mucho mayores de interleuquina 2 pegilada (3 x 10⁶ viales de IL-2 recombinante) en pacientes de SIDA linfocitopénicos (T. Merigan, comunicación personal) pero con menos toxicidad. Los mismos son menores que los alcanzados con infusiones durante 8 días de > 10 x 10⁶ unidades/día de IL-2 en pacientes de SIDA; sin embargo, los últimos requerían gasto elevado e incomodidad, e implicaban una toxicidad importante (Kovaks, et al. 1997). Estos resultados con NCM se obtuvieron en ausencia de INDO y CY, e indican por tanto que el efecto del régimen sobre LC es el de NCM y no un efecto de INDO y CY.

Ejemplo 3

Corrección por NCM del o los Defectos de Células Dendríticas en el Cáncer:

En experimentos previos, se aislaron ganglios linfáticos de 5 pacientes de H&NSCC tratados con NCM y 5 pacientes de H&NSCC de control sin tratar y se analizaron los constituyentes celulares por citometría de flujo utilizando un panel de marcadores de la superficie celular para células dendríticas (es decir, CD83+, CD86+ y CD68+). Como se ha indicado arriba, la histiocitosis sinusal es una patología de los ganglios linfáticos observada en algunos pacientes de cáncer que se caracteriza por la acumulación en los ganglios linfáticos de histiocitos de gran tamaño que contienen células dendríticas inmaduras. Como se demuestra en la Figura 6A, los pacientes con SH (SH+) tienen una acumulación de CD68+, CD83+, CD86-DCs en sus ganglios linfáticos, mientras que aquéllos sin SH apreciable tienen menos células CD83+. Sin embargo, el tratamiento con NCM dio como resultado un aumento de 5 veces en el número de CD86+ (concomitante con CD68+, CD83+) DCs comparado con los controles de cáncer sin tratar, lo que indica una conversión en un fenotipo DC "activado". Los controles son pacientes H&NSCC sin tratar comparados con pacientes de cáncer tratados con NCM (véase la Figura 6B).

Dado que la histiocitosis sinusal representa una acumulación de DCs parcialmente maduras que se supone son péptidos tumorales endógenos portadores, la maduración y activación plenas con expresión del receptor CD86 co-estimulador refleja el uso de la NCM de la presente invención para corregir este defecto en la maduración y para permitir una presentación eficaz del antígeno a las células T. La NCM de la presente invención invierte por tanto la histiocitosis sinusal y conduce a una inmunización eficaz de las células T "naïf".

Los datos arriba descritos y datos subsiguientes contenidos en Meneses et al. (2003) demostraron que el tratamiento de pacientes con H&NSCC utilizando NCM perilinfática, CY en dosis baja, e INDO invertía la histiocitosis sinusal frecuentemente evidente en los ganglios linfáticos en este y otros cánceres. Sin embargo, a partir de estos datos no era evidente cuál de los agentes arriba indicados, NCM, CY, y/o INDO, corregía este defecto.

Los datos siguientes presentan la evidencia de que la NCM que contiene las 6 citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α induce la maduración de las células DC en ausencia de CY y/o INDO. La NCM (IRX-2) utilizada en estos experimentos contiene varias citoquinas, preferiblemente las 6 citoquinas críticas expuestas anteriormente o que se muestran en la Tabla III a continuación. Para los propósitos de estos experimentos, las concentraciones de NCM (IRX-2) se expresan como la concentración de TNF- α contenida en IRX-2. La concentración de citoquinas en IRX-2, con inclusión de TNF- α , se midió por ELISA y la pureza de TNF- α recombinante es > 95%. Para todos los experimentos, excepto las titulaciones, se utilizó NCM a una concentración de 1 ng/ml.

Tabla III: Niveles de Citoquinas en la Formulación de IRX-2, Lote 041304 (ng/ml)

IL-1 β	IL-2	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-6	IL-10	G-CSF	GM-CSF
0,3	4,2	2,2	1,0	25,2	0,7	0,03	0,06	0,4

El medio utilizado fue RPMI 1640, complementado con L-glutamina 2 mM, 50 μ g/ml de estreptomycin, 50 U/ml de penicilina y 10% de FBS (todos los reactivos fueron suministrados por Cellgro, Herndon, VA). GM-CSF, TNF- α , y VEGF₁₆₅ se adquirieron de Peprotech (Rocky Hill, NJ). X-VIVO 10 se adquirió de BioWhittaker (Walkersville, MD). LPS se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). Todos los reactivos se testaron respecto a contaminación de endotoxinas con el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (ensayo LAL; BioWhittaker) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se encontró que eran negativos. Se encontró que todas las soluciones contenían menos de 0,06 EU/ml, el límite mínimo de detección. Adicionalmente, todo el material plástico estaba exento de pirógenos.

Los PBMCs utilizados en estos experimentos se obtuvieron de 30 ml de capa superficial de plasma coagulado enriquecido en leucocitos de donantes sanos por centrifugación con Ficoll-Hypaque (Cellgro, Herndon, VA), y se recuperó la fracción de baja densidad procedente de la interfase 42,5-50%. Las células se resuspendieron en medio de cultivo y se dejó que se adhirieran a placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA). Después de 2 horas a 37°C, las células no adherentes se eliminaron por lavado y las células adherentes (~90% células CD14⁺, es decir, monocitos) se cultivaron en 3 ml de medio suplementado con 50 ng/ml (en GM-CSF (500 U/ml) y 50 ng/ml de IL-4 (500 U/ml).

Para el análisis de los marcadores de superficie, se utilizaron los siguientes mAbs conjugados con fluorocromo (todos ellos de BD Pharmingen, San Diego, CA): CD86-PE, CD80-FITC, CD54-APC, CD83-PE, HLA-DR-FITC, CD1a-APC, CD40-FITC y controles isotipo apropiados. El análisis inmunofenotípico se realizó utilizando FACS. Las células (0,25 x 10⁶) se lavaron en PBS complementado con 2% de FBS y 0,1% de NaN₃ (tampón de lavado FACS) y se incubaron durante 30 min a la temperatura ambiente con mAbs conjugados con APC, PE o FITC, o con el mAb correspondiente coincidente en isotipo. El exceso de mAb se eliminó por lavado en tampón de lavado FACS. Los resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia o porcentaje de células que expresaban el antígeno especificado. El análisis de fluorescencia se realizó sobre un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Rockville, MD) después de adquisición de 10.000 eventos y se analizó con el software BD Biosciences CellQuest (Rockville, MD).

Como se muestra en la Figura 7, NCM sola (sin la presencia de CY y/o INDO) aumentaba el número de DCs portadoras del antígeno CD83, un marcador fundamental de la maduración de DC. Más específicamente, los PBMCs adherentes (células mononucleares de sangre periférica) se cultivaron durante 7 días en presencia de GM-CSF e IL-4 como se ha descrito arriba y se estimularon después con cantidades crecientes de TNF- α recombinante (PeproTech) o NCM (IRX-2). Después de 48 horas, las células se lavaron y se analizaron respecto a expresión de CD83 por citometría de flujo. La Figura 7 indica que NCM es activa para inducir la maduración de DC, como se evidencia por un aumento en las células CD83⁺. Además, NCM era más activa para inducir la maduración de DC que en una dosis equivalente de TNF- α solo. Los datos de la Figura 7 se representan como el valor medio de 5 experimentos individuales $\pm$ SEM ($p < 0,0001$, por ANOVA).

Este dato indica que NCM por sí sola promueve la maduración de DCs y lo hace de un modo que no puede ser explicado por ninguna citoquina individual contenida en la mixtura de NCM que se sabe actúa en la maduración de DC. Por ejemplo, la diferenciación normal *in vitro* de PBMCs requiere la presencia de 100-500 U/ml de GM-CSF (aproximadamente 10-50 ng/ml) y 500-1000 U/ml de IL-4 (50-100 ng/ml). Esto genera una población de células relacionadas con el linaje DC pero en un estado relativamente inmaduro (expresión baja/moderada de CD86, CD40 y HLA-DR, nula para CD83). La NCM sin diluir tiene cantidades indetectables de IL-4, y contiene concentraciones de 10 a 50 veces menores de GM-CSF (aproximadamente 1,1 ng/ml) que la requerida para diferenciación *in vitro* de DCs. Así pues, las citoquinas IL-4 y GM-CSF individuales en la NCM no pueden justificar las células CD83⁺ producidas en los cultivos de la Figura 7.

TNF- α puede inducir dichas células, pero a concentraciones muy superiores a las contenidas en la NCM de la invención (véase Figura 7). Por ejemplo, después de compromiso inicial con el linaje de células dendríticas (durante varios días de GM-CSF+IL-4 *in vitro*), la adición subsiguiente de una "señal de peligro" tal como la derivada de un patógeno (v.g., LPS) induce un fenotipo de células dendríticas totalmente maduras que incluye expresión elevada/intensa de CD86, CD40, HLA-DR, y la presencia de CD83. TNF- α en el intervalo de 20-50 ng/ml puede mimetizar en gran parte una señal de peligro de este tipo derivada de un patógeno, dando como resultado una regulación al alza de los mismos marcadores. Sin embargo, la mixtura NCM sin diluir tiene únicamente 2,8 ng/ml de TNF- α como promedio, muy por debajo de las concentraciones de TNF- α requeridas para la maduración completa de DC. Así pues, los resultados representados en la Figura 7 demuestran claramente que, para las concentraciones equivalentes de TNF- α utilizadas en este experimento, la inducción del marcador CD83 por NCM no podría ser debida a la presencia del TNF- α en la mixtura NCM.

Dado que se sabe que las células DC sufren cambios morfológicos claros a medida que progresan desde células inmaduras a células maduras, se trataron DCs inmaduras con NCM para determinar si el tratamiento con NCM cambiaba la morfología de las células. Más específicamente, se dejaron crecer PBMCs adherentes en presencia de GM-CSF (500 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) durante 4 días como se ha descrito arriba (tratamiento que se sabe produce DCs inmaduras) y se trataron luego, o bien con NCM (IRX-2) o se dejaron sin tratar como controles. Al cabo de 3 días, las células se visualizaron por tinción Wright y microscopía. Como se muestra en la Figura 8, las células tratadas con NCM (Figura 8B) exhibían las proyecciones y motilidad celulares características de las DCs maduras, y se extendían y replegaban continuamente sus procesos y halos celulares. Estas células tenían grandes núcleos de forma irregular, numerosas vesículas, relativamente pocos gránulos citoplásmicos, y proyecciones celulares notables y abundantes en comparación con los controles sin tratar (Figura 8A). Así pues, el tratamiento con NCM daba como resultado DCs que poseían morfología típica de DC maduras.

Adicionalmente, es sabido que la transición prototípica de DCs inmaduras a maduras da como resultado aumentos y disminuciones bien caracterizados en ciertos antígenos de la superficie celular. Por ejemplo, las DCs inmaduras expresan niveles altos de CD1a, y al encontrarse con estímulos tales como citoquinas o productos bacterianos, este marcador se regula en sentido decreciente. Así pues, para determinar si el tratamiento con NCM daba como resultado ganancia o pérdida de marcadores de la superficie celular asociados con la activación y maduración de DCs, se dejaron crecer GM-CSF y PBMCs (monocitos) adherentes tratados con IL-4 (como se ha descrito arriba) durante 7 días y se incubaron luego durante 48 horas con o sin NCM (IRX-2). Se examinó la expresión de CD1a, HLA-DR, CD86, CD40 y CD54 por citometría de flujo y se expresó como intensidad media de fluorescencia.

Como se muestra por los histogramas de la Figura 9, el tratamiento con NCM (IRX-2) de DCs inmaduras (indicadas por líneas continuas en los histogramas) daba como resultado la regulación decreciente de la expresión de CD1a (147 frente a 62) así como la regulación al alza de la expresión de MFC II (455 frente a 662). Adicionalmente, el tratamiento con NCM conducía a un aumento en el tamaño celular y una disminución en la granularidad (datos no presentados). Los controles sin tratar se indican por líneas de trazos en cada histograma. Los valores medios para las DCs sin tratar se muestran en la esquina superior izquierda de los paneles; los valores respectivos para DCs tratadas con NCM se muestran en la esquina superior derecha. Los histogramas representados proceden de un experimento representativo y los valores representan resultados medios de al menos 10 experimentos individuales (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,002$, *** = $p < 0,0005$, test t de Student apareado). Como se indica adicionalmente en la Figura 9, el tratamiento con NCM (IRX-2) mejoraba la expresión de las moléculas coestimulantes de la superficie CD86 (conocidas también como B7-2) (193 frente a 390), CD40 (46 frente a 75), y CD54 (conocidas también como molécula de adhesión intercelular 1 o ICAM-1) (1840 frente a 3779). Todos estos cambios en la expresión de marcadores de superficie indican que la NCM de la invención es un efector potente de activación de las células DC.

Consistentemente con su papel como células presentadoras de antígeno, las DCs inmaduras tienen una actividad endocítica alta y capturan activamente los antígenos. Después de la maduración, esta actividad se regula decrecientemente, como resultado de lo cual las DCs se comprometen en el procesamiento y la presentación de antígeno. En condiciones fisiológicas, la regulación decreciente de la endocitosis por las APC se asocia con un aumento de complejos péptido/MHC en la superficie que conducen a una estimulación incrementada de las células T. Para testar la influencia de NCM (IRX-2) en la endocitosis, se incubaron DCs con cantidades crecientes de NCM (IRX-2) y se determinó la capacidad para internalizar FITC-dextrano. De modo más específico, se trataron PBMCs (monocitos) adherentes con GM-CSF e IL-4 (como se ha descrito arriba) durante 4 días y se estimularon luego con TNF- α (a 1 $\mu\text{g/ml}$) o con concentraciones crecientes de NCM (IRX-2) hasta el equivalente de 1 ng/ml de TNF- α . Después de 18 horas, las células se incubaron con FITC-dextrano (Sigma, St. Louis, MO), que se añadió a una concentración final de 1 mg/ml . Las células se cultivaron durante 30 min a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron 4 veces con PBS enfriada en hielo y se analizaron por citometría de flujo como se ha descrito arriba.

Como se muestra en la Figura 10, las DCs inmaduras incubadas con NCM (IRX-2) (círculos llenos) regulaban en sentido decreciente la endocitosis de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con TNF- α (círculos vacíos) a la dosis correspondiente encontrada en la NCM tenía efectos mínimos. El tratamiento de DCs inmaduras con cantidades mayores de TNF- α (10-25 ng/ml) daba de hecho como resultado la regulación decreciente de la actividad endocítica como era de esperar (datos no presentados). Los datos de la Figura 10 se muestran como el porcentaje de la intensidad media de fluorescencia de las DCs estimuladas frente a las no estimuladas, y son el valor medio de 4 experimentos independientes $\pm$ SEM ($p < 0,00001$, por ANOVA). Estos experimentos indican que la NCM de la invención regula en sentido decreciente la actividad endocítica de las DCs, una indicación de maduración de las DC.

A continuación, se evaluó la aptitud de NCM para mejorar la capacidad estimuladora de las células T de DCs. Las DCs maduras activadas son estimuladores potentes de las células T naíf. Con objeto de demostrar que el tratamiento con NCM (IRX-2) se traducía en efectos funcionales así como en los cambios fenotípicos y morfológicos arriba indicados, se evaluó la influencia de NCM (IRX-2) sobre la capacidad estimuladora de células T de las DCs en un ensayo de proliferación de la reacción de linfocitos mixtos (MLR).

Más específicamente, se trataron PBMCs (monocitos) adherentes en primer lugar con GM-CSF e IL-4 (como se ha descrito arriba) durante 7 días y se estimularon luego con o sin NCM (IRX-2). Después de 48 horas, las DCs

tratadas o sin tratar con NCM (IRX-2) se recogieron y se ensayaron en una MLR como sigue: se co-cultivaron DCs purificadas con 1×10^5 células T procedentes de un donante no afín en ratios de 1:5, 1:10, 1:30, y 1:100 DC:células T. Se prepararon células T alogénicas haciendo pasar PBMCs purificados procedentes de capas superficiales de plasma coagulado por centrifugación en gradiente (Ficoll-Hypaque) a través de una columna de lana de nailon. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos con fondo redondo. No estaba presente cantidad alguna de NCM (IRX-2) durante el ensayo MLR. Después de 5 días de co-cultivo células DC-células T, se pulsaron los pocillos durante 18 horas con BrDU. La incorporación de BrDU se midió utilizando un ensayo colorimétrico de incorporación de BrDU (RocheDiagnostics, Indianapolis, IN).

Como se muestra en la Figura 11, las DCs expuestas a NCM (IRX-2) (cuadrados llenos) dos días antes del co-cultivo eran más potentes en la inducción de una respuesta de proliferación de células T que las DCs sin tratar (círculos vacíos), confirmando que las DCs tratadas con NCM son funcionalmente competentes. Los datos de la Figura 11 se expresan como índice de estimulación, que se define como ((d.o. células T estimuladas con DC - d.o. DC solas)/d.o. células T restantes) $\pm$ SEM, y son el resultado medio de cuatro experimentos individuales ($p < 0,05$, por ANOVA).

Es importante observar que no había cantidad alguna de NCM en los co-cultivos y que el aumento observado en la estimulación de las células T era debido a los efectos estimuladores de NCM sobre DCs, más bien que un efecto directo de la NCM sobre las células T. Así pues, la NCM de la invención mejora la actividad estimuladora de células T de las DCs como se muestra por la proliferación incrementada en las reacciones MLR alogénicas. Además, se demostró anteriormente que NCM aumentaba la expresión de ICAM-1 (CD54). Se ha demostrado que este ligando accesorio de la superficie celular está implicado en la señalización a través de LFA-1 y da como resultado un sesgo hacia un fenotipo Th1 (Rogers, 2000). En un escenario de cáncer, la consecuencia funcional de estos efectos es que las DCs tratadas con NCM polarizarían la respuesta de las células T hacia un fenotipo Th1, y favorecerían la activación de la actividad de CTL específica del tumor, promoviendo así rechazo del tumor.

Los datos de los autores de la invención demuestran también que NCM estimula la producción de IL-12 por DCs. IL-12 es una citoquina polarizadora potente de Th1 secretada por DCs en respuesta a patógenos durante una infección. Sin embargo, uno de los papeles más importantes de las DCs en la mediación del rechazo de tumores es estimular eficaz y eficientemente las respuestas de las células T antitumorales sesgadas a Th1, y una de las citoquinas críticas en la dirección de esta respuesta es IL-12. IL-12 es producida por las DCs activadas y es un factor esencial implicado en la diferenciación de las células T adyuvantes $CD4^+$ naif en células Th1. Las células Th1 secretan IFN- γ e IL-2, y estas citoquinas, junto con IL-12, median la activación y proliferación de componentes celulares y fagocíticos del sistema inmunitario, tales como los linfocitos T citotóxicos (CTL) $CD8^+$.

Para determinar si NCM puede inducir la producción de IL-12 en DCs, se estimularon monocitos cultivados GM-CSF/IL-4 con NCM (IRX-2) durante 18 horas y se ensayaron respecto a producción intracelular de IL-12 p70. Más específicamente, se dejaron crecer PBMCs adherentes durante 4 días en GM-CSF e IL-4 (como se ha descrito arriba) y se trataron luego con o sin NCM (IRX-2) o LPS durante 18 horas. Se añadió Brefeldina A (BFA; 10 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO) durante las últimas 4 horas para acumular la mayor parte de la citoquina en el complejo Golgi. Las células se fijaron y permeabilizaron utilizando Fix y Perm (Caltag, Burlingame, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se etiquetaron luego con mAb marcado con FITC contra IL-12 p70 (BD Pharmingen, San Diego, CA) o el control isotipo apropiado (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las células se analizaron por citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 12A, NCM (IRX-2) aumentaba el porcentaje de DCs que producían IL-12 desde 4,5% positivo a 22,5% por término medio. Se utilizó como control positivo LPS, un estimulador de la producción de IL-12 en DCs, y dio niveles similares de inducción con relación a NCM ($27\% \pm 11$). El dato de la Figura 12A es la media de 4 experimentos independientes y se expresa como el porcentaje de células que se tiñen positivamente para IL-12 $\pm$ SEM ($p < 0,05$, test t de Student). Para confirmar que la producción intracelular incrementada de IL-12 correspondía a la secreción incrementada de IL-12 bioactiva, se midió la concentración de IL-12 bioactiva en el sobrenadante de las DCs tratadas con NCM (cultivadas inicialmente durante 4 días con GM-CSF e IL-4 como se ha descrito arriba e incubadas con NCM durante 48 horas) utilizando un kit ELISA comercial (R&D Systems, Minneapolis, MN) que detecta el heterodímero p70 bioactivo. Así pues, como se muestra en la Figura 12B, 48 horas después de la exposición a NCM, los sobrenadantes de DC contenían significativamente más IL-12 que las DCs tratadas de control. El dato de la Figura 12B es el valor medio ($\pm$ SEM) de 6 experimentos independientes ($p < 0,05$, test t de Student).

Finalmente, los datos de los inventores indicaban que NCM reduce la apoptosis inducida por VEGF en DCs. VEGF es un inhibidor de la maduración de DC y se ha demostrado que aumenta los niveles de apoptosis en la maduración de las DCs. Para determinar si NCM era capaz de mitigar los efectos de VEGF, se trataron DCs con VEGF con o sin IRX-2, y se determinó el nivel de apoptosis por fijación de Annexina-FITC V. Más específicamente, se trataron PBMCs adherentes con GM-CSF e IL-4 durante 7 días, y se incubaron luego en presencia o ausencia de VEGF (100 ng/ml) con o sin NCM (IRX-2) (1:3) durante 2 días más. Se cosecharon las células y se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo, después de lo cual se resuspendieron en tampón de fijación de Annexina (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadieron Annexina-V FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA) y yoduro de propidio, y las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se analizaron por citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 13, los niveles de apoptosis aumentaban en las células tratadas con VEGF en comparación con los controles; sin embargo, NCM (IRX-2) reducía el nivel de apoptosis en las células tratadas con VEGF. Los datos de la Figura 13 son el resultado de 4 experimentos independientes y se expresan como el porcentaje de células que se teñían positivamente para Annexina-V-FITC ($\pm$ SEM). Los datos sugieren que, además de su capacidad estimuladora, NCM tiene también un efecto protector sobre las DCs maduras. Además, la función y el número deficientes de DC pueden estar mediados en parte por la expresión aberrante de VEGF por el tumor (Gabrilovich, 1996b; Saito, 1999; Takahashi, 2004). Se demostró que la producción de VEGF por los tumores era un predictor para mal pronóstico en varios cánceres que incluían H&NSCC, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, y osteosarcoma (Gallo, 2001; Kaya, 2000; Miyake, 1992; Saito, 1998; Smith, 2000). Los datos contenidos en esta memoria indican que NCM puede invertir la apoptosis de las DCs mediada por VEGF, promoviendo así la supervivencia de DCs maduras dentro de un ambiente tumoral, y permitiendo una presentación de antígeno prolongada y activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno tumoral.

Estudios previos con DCs han empleado mixturas de citoquinas naturales tales como medios acondicionados de monocitos (MCM) o mixturas de citoquinas inflamatorias recombinantes que contienen TNF- α , IL-1 β , IL-6, y PGE₂ para madurar DCs para uso en vacunas contra el cáncer basadas en DC generadas *ex vivo* (Romani, 1996; Bender, 1996; Sorg, 2003). Una diferencia crítica entre NCM y las mixturas de citoquinas utilizadas en otros estudios es que el nivel de citoquinas utilizado en este estudio era 10-100 veces menor, lo que sugiere una sinergia importante entre los componentes singulares de citoquinas de NCM. Adicionalmente, existen problemas importantes implicados en el uso de las DCs maduras por estas otras mixturas. Por ejemplo, las DCs maduras en presencia de TNF- α , IL- β , IL-6, y PEG₂ tienen una producción baja o nula de IL-12 y, si están activadas inadecuadamente, pueden ser tolerogénicas (Steinman, 2002; Langenkamp, 2000). Adicionalmente, existe la preocupación de que las DCs totalmente maduras generadas *ex vivo* podrían estar "agotadas" y ser incapaces de cebar y generar una respuesta eficiente de las células T (Kalinski, 2001). Los bajos niveles de respuestas clínicas observados en pacientes tratados con DCs maduras por el método *ex vivo* dan respaldo a estas preocupaciones (Holtl, 2002; Schuler-Thumer, 2002; Thurner, 1999).

La evidencia presentada en esta memoria confirma que NCM es un activador potente de las células dendríticas. Estos datos, combinados con los efectos conocidos de NCM sobre las células T (Hadden, 1995b) sugieren que NCM es capaz de contrarrestar los defectos de las células APC y T encontrados en pacientes de cáncer, y proporcionan una explicación mecanística para los resultados clínicos exitosos observados en las pruebas clínicas iniciales. Si bien las DCs están reconocidas actualmente como elementos fundamentales en la inmunoterapia dirigida contra el cáncer, está resultando cada vez más claro que la manipulación de elementos aislados del sistema inmunitario individualmente, por ejemplo estrategias de vacunación con células T específicas del tumor o reintroducción de DCs del antígeno tumoral pulsadas solas no logra producir mejoras clínicas importantes en los pacientes (Ridgway, 2003; Rosenberg, 2004). Un plan de tratamiento más beneficioso puede consistir en mejorar las actividades de varios tipos de células coordinantes concomitantemente, por ejemplo células T y DCs, lo que permitirá reforzar las interacciones y una mayor probabilidad de que las cascadas funcionales se perpetúen en lugar de ser bloqueadas por las diversas estrategias inmunosupresoras del tumor. En este escenario, la NCM de la invención puede actuar para estimular tanto DCs endógenas cargadas con antígeno tumoral como células T citotóxicas específicas del antígeno, dando como resultado una respuesta inmune eficaz y el rechazo del tumor. Considerados conjuntamente, estos resultados sugieren que la NCM es un instrumento clínico potencialmente poderoso que podría utilizarse solo para iniciar una respuesta inmune contra antígenos tumorales endógenos, o podría utilizarse en asociación con antígenos tumorales añadidos exógenamente en un modelo de vacuna contra el cáncer.

Otros Usos de la Presente Invención para Prognosis:

Históricamente, se han dado a conocer pocos factores de predicción para el resultado (positivo o negativo) en el H&NSCC; se sugerían recuentos de linfocitos, niveles de 1gE y 1gA o nutrición y, como se ha mencionado, se ha utilizado un test de piel DNCB. Para quimioterapia (5 FU & cisplatino), se producen respuestas clínicas antes de la cirugía en la mayoría de los pacientes, pero el tiempo medio de supervivencia y la supervivencia global se ven esencialmente inafectados. Los datos presentados en los ejemplos que siguen demuestran que el uso de la invención retarda la recurrencia de la metástasis en aquéllos que padecen tumor residual después de la cirugía, y aumenta la supervivencia de un modo que está relacionado con la magnitud de la respuesta clínica y la intensidad del ataque inmune sobre el tumor, como se evalúa por la cuantificación de la reducción, fragmentación e infiltración de linfoides en el tumor. Estas observaciones apuntan a modificaciones importantes de la invención para la supervivencia mejorada ulterior.

En pacientes con inmunodeficiencia grave

En pacientes con recuentos bajos de linfocitos, tests de piel NCM débiles o ausentes, histiocitosis sinusal, y/o respuestas patológicas pobres, estaría indicada la repetición del tratamiento con NCM y la monitorización de las respuestas inmunes.

En pacientes con Respuestas Clínicas Pequeñas o Nulas

Estos pacientes presentan un alto riesgo de recurrencia de metástasis y por consiguiente podrían beneficiarse lógicamente del tratamiento post-quirúrgico con la NCM de la presente invención. En ausencia de tests disponibles actualmente para la respuesta de rechazo del tumor observada en los pacientes, el testado de seguimiento con la tríada de tests descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 6.482.389 podría ayudar a determinar la frecuencia de repetición del tratamiento con la NCM de la presente invención.

En Pacientes con Enfermedad Recurrente:

Se observaron respuestas importantes que incluían dos respuestas completas en pacientes que se trataron de nuevo con la NCM. Esto contrasta con resultados previos con IL-2 natural y recombinante, donde tales pacientes no respondían a la repetición del tratamiento. Así pues, la presente invención es útil para tratamiento de la recurrencia de la enfermedad en los pacientes.

Uso de la Invención con otros Tratamientos como Radioterapia o Quimioterapia:

Los pacientes con cánceres H&NSCC tienen una supervivencia notablemente reducida comparados con pacientes con enfermedad de Fase III (10-20% frente a 30-50%) a pesar del uso de radioterapia. Es bien sabido que la radioterapia deprime los recuentos de linfocitos T durante un periodo prolongado en estos pacientes. A pesar del impacto negativo de la radioterapia sobre el número y la función de las células T, los pacientes tratados con la NCM de la presente invención que padecían enfermedad de Fase IV se comportaban tan bien como los pacientes con enfermedad de Fase III. Así pues, el impacto terapéutico era relativamente mayor en los pacientes de Fase IV, lo que contradice el dogma actual de que la inmunoterapia y la terapia con citoquinas se comporta mejor con tumor mínimo. Ello sugiere también que la NCM de la presente invención potencia el efecto de la radioterapia. Análogamente, en 4 pacientes con cáncer SCC de pene, se utilizó la NCM de la presente invención y fue seguida por quimioterapia con 5FU y cisplatino y un segundo ciclo de NCM. Se observó reducción clínica del tumor con la inmunoterapia y quimioterapia iniciales. El examen del tumor (extraído en la cirugía) indicó la persistencia de regresión inmune. Otro paciente con H&NSCC tratado con la NCM de la presente invención seguida por quimioterapia con 5FU y cisplatino arrojó el mismo resultado. Estas observaciones indican que la NCM de la presente invención puede utilizarse con quimioterapia.

Ejemplo 4

Corrección de un Defecto Funcional de los Monocitos Caracterizado por un Test de Piel NCM Negativo

Los resultados siguientes muestran que la NCM que contiene las 6 citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α es un potente activador de los monocitos/macrófagos, es decir, cuando se administra sola (sin la administración de CY o INDO).

Más específicamente, se dejaron crecer PBMCs adherentes durante una noche en medio X-VIVO 10 (BioWhittaker Bioproducts), se estimularon durante 24 horas con NCM (IRX-2) (a una concentración final 1:3) y se ensayaron en cuanto a la expresión de diversos marcadores de activación encontrados típicamente en macrófagos activados por citometría de flujo. Como control, se incubaron células durante 24 horas en medio que carecía de NCM. Como se demuestra en la figura 14, el tratamiento de las células con NCM frente a la ausencia de citoquinas añadidas producía un aumento estadístico en el porcentaje de células que se teñían positivamente (figura 14 A) y un aumento en el índice de fluorescencia media (MFI) (figura 14B) para HLA-CR, CD86, CD40 y CD80, todos ellos marcadores de activación de monocitos/macrófagos ($p < 0,03$). Los datos presentados en la figura 16 representan el valor medio $\pm$ SEM de 3 experimentos/donantes independientes.

Adicionalmente, se encontró que la NCM de la invención activa los monocitos en mayor grado que TNF- α . Más específicamente, se estimularon PBMCs adherentes con NCM (IRX-2) (a una concentración final 1:3; aproximadamente 1 ng/ml de TNF- α) o TNF- α (10 ng/ml) y se ensayaron respecto a la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 15, NCM inducía una expresión estadísticamente mayor de HLA-DR, CD86, CD40 y CD80 que TNF- α ($p < 0,03$). Los datos presentados en la figura 15 representan el valor medio $\pm$ SEM de 3 experimentos/donantes independientes.

Análogamente, estudios realizados utilizando LPS en dosis moderadas (activadoras pero no máximas) indican también que NCM era una señal de activación comparativamente más fuerte. De un modo más específico, se estimularon PBMCs adherentes en ausencia o presencia de IL-10 (5 ng/ml) con NCM (IRX-2) (a una concentración final 1:3) o LPS (10 ng/ml) y se ensayaron respecto a la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 16, NCM causaba un aumento mayor en la expresión de los marcadores de maduración monocitos/macrófagos HLA-DR, CD86, y CD40 que LPS. Además, en presencia de la citoquina inmunosupresora IL-10, la NCM era todavía capaz de estimular los monocitos, en tanto que LPS no lograba hacerlo ($p < 0,02$). Los datos presentados en la figura 16 representan el valor medio $\pm$ SEM de 3 experimentos/donantes independientes.

Por último, es sabido que los monocitos secretan TNF- α en respuesta a señales de activación, secreción que está asociada con la actividad destructora inespecífica de los monocitos/macrófagos. Los datos presentados en la figura 17 demuestran que la NCM estimula la producción de TNF- α a partir de monocitos y contrarresta los efectos

inmunosupresores de IL-10. Más específicamente, se estimularon PBMCs adherentes en ausencia o presencia de IL-10 (5 ng/ml) con NCM (IRX-2) (a una concentración final 1:3) o LPS (10 ng/ml) y se ensayaron respecto a la producción de TNF- α por tinción intracelular y citometría de flujo. Como se muestra en la figura 17, NCM causaba un aumento mayor en la producción de TNF- α que LPS o los controles. En presencia de IL-10, la NCM era capaz todavía de estimular los monocitos para producir TNF- α , en tanto que LPS ya no era capaz de hacerlo ($p < 0.05$). Los datos presentados en la figura 17 representan el valor medio $\pm$ SEM de 5 experimentos/donantes independientes.

El hecho de que NCM por sí sola ha demostrado ser un activador potente de monocitos/macrófagos respalda el argumento de que el tratamiento con NCM por sí solo es responsable de la corrección de uno o más defectos funcionales de los monocitos característicos de los pacientes de cáncer, tales como aquéllos que tienen un test de piel NCM negativo.

Publicaciones

Albert et al, *Nature*, Vol. 392, pp. 86-89 (1998).

Almand B, Resser J, Lindman B, Nadaf S, Clark J, Kwon E, Carbone DP, and Gabrilovich D. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research*, 6:1755-1766 (2000).

Banchereau et al, *Annual Reviews of Immunology*, Vol. 18, pp. 767-811 (2000).

Barrera J, Verastegui E, Meneses A, de la Garza J, Zinser J & Hadden JW. Neoadjuvant immunological treatment with IRX-2 in patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma of the head and neck induces clinical and histological responses. In *First World Congress on Head and Neck Oncology*. JJ Alvarez Vicent, Ed. Monduzzi, Bologna, Italy; 1998; pp 1017-1019.

Barrera J, Verastegui E, Meneses A, Zinser J, de la Garza J, Hadden JW. Combination immunotherapy of squamous cell head and neck cancer. A phase 19 trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126:345-351 (2000).

Belldegrun A, Kasid A, Uppenkamp M, Topalian SL, and Rosenberg SA. Human tumor infiltrating lymphocytes: analysis of lymphokine mRNA expression and relevance to cancer immunotherapy. *Journal of Immunology*, 42: 4520-4526 (1989).

Bellone, et al, *Immunology Today*, Vol 20, No. 10, p 457-462 (1998).

Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinamn R, and Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells

from nonproliferating progenitors in human blood. *Journal of Immunological Methods*, 196:121-135.

Berd D, Maguire Jr HC, Mastrangelo MJ. Potentiation of human cell-mediated and humoral immunity by low-dose cyclophosphamide. *Cancer Res* 1984; 44:5439-43.

Berd D, Mastrangelo M J. Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reduction of T suppressor function without depletion of the CD8+subset *Cancer Research* 47:3317-3321 (1987).

Berd D. Low doses of chemotherapy to inhibit suppressor T cells. *Progress in Clin Biol Res* 288:449-458 (1989).

Berchtold S, Muhl-Zurbes P, Heufler C, Winklehner P, Schuler G and Steinkasserer. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule, which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Letters*, 461:211-216 (1999).

Borysiewicz L K, Fiander A, Nimako M. A recombinant vaccine virus encoding human papillomavirus type 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347:1524-1527 (1996).

Burke and Olson, "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors" in *Methods in Enzymology*, Vol. 194, "Guide to Yeast 'Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 17, pp. 251-270 (1991).

Capecchi, "Altering the genome by homologous recombination" *Science* 244:1288-1292 (1989).

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, and Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine*, 184:747 (1996).

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, and Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388:782 (1997).

Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, and Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Laboratory Investigations*, 74:975-983 (1996).

Cortesina G, DeStefani A, Galcazzi E. Temporary regression of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck is achieved with a low dose but not a high dose of recombinant interleukin 2 injected perilymphatically. *Br J Cancer* 69:572-577 (1994).

Cortesina G, DeStefani A, Giovarelli M, et al. Treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck with low doses of interleukin-2 injected perilymphatically. *Cancer* 62:2482-2485 (1988).

Cortesina G, Destefani A & Galeazzi E. Temporary regression of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck is achieved with a low but not high dose of recombinant interleukin-2 injected perilymphatically. *Br. J. Cancer*; 1994; 69: 572-577.

Cowens JW, Ozer H, Ehrke MJ, Colvin M, Mihich E. Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4-hydroperoxycyclophosphamide. *J Immunol* 1983; 132:95-100.

Cozzolino F, Torcia M, Carossino AM, Giordani R, Selli C, Talini G, Reali E, Novelli A, Pistole V, and Ferrarini M. Characterization of cells from invaded nodes in patients with solid tumors. Lymphokine requirement for tumor specific lymphoproliferative response. *Journal of Experimental Medicine*, 166:303-318 (1987).

Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *BioTechnology* 11:905-910 (1993).

Cross DS, Platt JL, Juhn SK, et al. Administration of a prostaglandin synthesis inhibitor associated with an increased immune cell infiltrate in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118: 526-8

Culver, Site Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics (1998).

Davies et al., "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer", Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 11, pp. 2693-2698 (1992).

DeLaugh and Lotts, Current Opinion In Immunology, Vol. 12, pp. 583-588 (2000).

DeStefani A, Forni G, Ragona R, et al. Improved survival with perilymphatic interleukin 2 in patients with resectable squamous cell cancer of the inner cavity and oropharynx. Cancer 2002; 95: 90-97

de Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JHS, van Muijen GNP, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJG, Adema GJ, Punt CJA, and Figdor CG. Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State. Cancer Research, 63:12-17 (2003).

Dickinson et al., "High frequency gene targeting using insertional vectors", Human Molecular Genetics, Vol. 2, No. 8, pp.1299-1302 (1993).

Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders (1995).

Ehrke MJ, Immunomodulation in cancer therapies. International Immunopharmacology 2003; 3:1105-19.

Faanes RB, Merluzzi VJ, Ralph P, Williams N, Tarnowski GS. Restoration of tumor and drug-induced immune dysfunction. In: Serrou B, Rosenfeld C, editors. International Symposium on New Trends in Human Immunology and Cancer immunotherapy. Paris: Doin Editeurs; 1980. p. 953-64.

Gabrilovich D, Ciernik F, and Carbone DP. Dendritic cells in anti-tumor immune responses. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. Cellular Immunology, 170:101-110 (1996a).

Gabrilovich D, Chen H, Girgis K, Cunningham T, Meny G, Nadaf S, Kavanaugh D, and Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nature Medicine, 2:1096-1103 (1996b).

Gabrilovich D, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, and Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. Clinical Cancer Research, 3:483 (1997).

Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, and Carbone DP. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. Blood, 92:4150-4156 (1998).

Gallo O Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, and Masini E. Cyclooxygenase-2 Pathway Correlates with VEGF Expression in Head and Neck Cancer. Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis. Neoplasia, 3:53-61 (2001).

Gilboa, E, Eglitis, M A, Kantoff, P W, Anderson, W F: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. BioTechniques 4(6):504-512 (1986). Gillis et al. (1978)

Hadden JW, Endicott J, Baekey P, Skipper P, Hadden E M. Interleukins and contrasuppression induce immune regression of head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 120:395-403 (1994).

Hadden JW, Saha A R, Sosa M, Hadden E M. Immunotherapy with natural interleukins and/or Thymosin α 1 potently augments T lymphocyte responses of hydrocortisone-treated aged mice. Int'l J Immunopharmacol 17:821-828 (1995).

Hadden JW, Verastegui E, Barrera JL, Kurman M, Meneses A, Zinser JW, de la Garza J, and Hadden E. A trial of IRX-2 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. International Journal of Immunopharmacol-

ogy, 3:1073-1081 (2003).

Hadden JW, Verastegui E, Barrera J, Meneses A, and de la Garza J. Lymph Node Histology in Head and Neck Cancer Impact of IRX-2. Immunotherapy. Abstract #294 presented at 2004 Annual Meeting of the American Head and Neck Society, Combined Otolaryngology Spring Meetings (COSM), Washington D.C. (2004).

Hadden JW. The Immunology of head and neck cancer prospects for immunotherapy. *Clinical Immunotherapy*, 3: 362-385 (1995a).

Hadden JW. Immunology and immunotherapy of breast cancer: An update: *Int'l J Immunopharmacol* 21:79-101 (1999).

Hadden JW. The immunopharmacology of head and neck cancer An update. *Int'l J Immunopharmacol* 11/12:629-644 (1997).

Hadden JW. The treatment of zinc deficiency is an immunotherapy. *Int'l J Immunopharmacol* 17:696-701 (1995).

Hadden, J., E. Verastegui, J.L. Barrera, M. Kurman, A. Meneses, J.W. Zinser, J. de la Garza, and E. Hadden, "A trial of IRX-2 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck," *International Immunopharmacology* 3; 1073-1081 (2003).

Hank A J, Albertini M R, Sondel P M. Monoclonal antibodies, cytokines and fusion proteins in the treatment of malignant disease. *Cancer Chemother & Biol Resp Mod* 18:210-222 (1999).

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood*, 90: 3245-3287 (1997).

Hengst JCD, Mokyr MB, Dray S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor bearing mice. *Cancer Res* 1980; 40:2135-41.

Hengst JCD, Mokyr MB, Dray S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res* 1982; 41:2163-7.

Hirsch B, Johnson JT, Rabin BD, et al. Immunostimulation of patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol* 1983; 109: 298-301

Hoffmann T, Muller-Berghaus J, Ferris R, Johnson J, Storkus W, and Whiteside T. Alterations in the Frequency of Dendritic Cell Subsets in the Peripheral Circulation of Patients with Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, 8:1787-1793 (2002).

Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr., and Thumher M. Immunotherapy of Metastatic Renal Cell Carcinoma with Tumor Lysate-pulsed Autologous Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research*, 8:3369-3376 (2002).

Huston et al, "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" in *Methods in Enzymology* (J J Langone, ed.; Academic Press, New York, N.Y.) 203:46-88 (1991).

Huxley et al., "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", *Genomics*, 9:742-750 (1991).

Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", *Nature*, Vol. 362, pp. 255-261 (1993).

Johnson and Bird, 1991 "Construction of single-chain Fv derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli* in *Methods in Enzymology* (J J Langone, ed.; Academic Press, New York, N.Y.) 203:88-99 (1989).

Kavanaugh D Y, Carbone D P. Immunologic dysfunction in cancer. *Hematol-Oncol Clinics of North Amer* 10(4): 927-951 (1996).

- Kalinski P, Schuitemaker J, de Jong E, and Kapsenberg M. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97:3466-3469 (2001).
- Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, Higashino F, Mezawa F, Okada F, and Ishii S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteocarcinoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clinical Cancer Research*, 6:572-578 (2000).
- Kleindienst P and Brocker T. Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo. *Journal of Immunology*, 170:2817-2823 (2003).
- Lamb et al., "Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice", *Nature Genetics*, Vol. 5, pp. 22-29 (1993).
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, and Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunology*, 1:311-316 (2000).
- Lissoni P, Matugani F, Bonfanti A, Bucovec R, Secondino S, Brivio F, Ferrari-Bravo A, Ferrante R, Vigore L, Rovelli F, Mandal M, Viviani S, Fumagalli L, and Gardani G. Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their -relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *Journal of Biological Regulatory and Homeostatic Agents*, 15:140-144 (2001).
- Lou Y, Wang G, Lizée G, Kim GJ, Finkelstein SE, Feng C, Restifo NP, Hwu P. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Research*, 64:6783-6790 (2004).
- Maass G, Schmidt W, Berger M, et al. Priming of tumor-specific T-cells in the draining lymph nodes after immunization with interleukin 2-secreting tumor cells: three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:5540-5542 (1995).
- Mackall. *Stem Cells 2000*, Vol. 18. pp. 10-18.
- Mackall, et al. *New England Journal of Medicine*, Vol. 332, pp. 143-149 (1995).
- Maclean G D, Miles D W, Rubens R D, Reddish M A, Longenecker bone marrow. Enhancing the effect of Theratope STn-KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19(4):309-316 (1996).
- Marshak et al, "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996).
- Mastrangelo M J, Maguire H C Jr., Sato T, Nathan F E, Berd D. Active specific immunization in the treatment of patients with melanoma. (Review) *Seminars in Oncology* 23(6):773-781 (1996).
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12:991-1045 (1994).
- Meneses A, Verastegui E, Barrera J L, Zinser J, de la Garza J, Hadden J W. Histological findings in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving perilympatic natural cytokine mixture prior to surgery. *Arch Pathol Lab Med* 122:447-454 (1998).
- Meneses A, Verastegui E, Barrera J L, de la Garza J, and Hadden J W, "Lymph node histology in head and neck cancer: impact of immunotherapy with IRX-2," *International Immunopharmacology*, 3; 1083-1091 (2003).
- Mernaugh and Mernaugh, "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" in *Molecular Methods In Plant Pathology* (R P Singh and U S Singh, eds.; CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.) pp. 359-365 (1995).
- Middel P, Fayyazi A, Kaboth U, and Radzun HJ. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: evidence for its relationship to macrophages and for a cytokine-related disorder. *Histopathology*, 35:525-533 (1999).
- Mishell and Shiigi. *Selected Methods in Cellular Immunology* (1981).

- Miyake M, Taki T, Hitomi S, and Hakomori S. Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *New England Journal of Medicine*, 327:14-19 (1992).
- Mokyr MB, Hengst JCD, Dray S. The role of antitumor immunity in cyclophosphamide-induced rejection of subcutaneous non-palpable MOPC-315 tumors. *Cancer Res* 1982; 42:974-9.
- Montovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunol* 2002; 23: 549-555
- Murphy GP, Tjoa B A, Simmons SJ. The prostate. 38:43-78 (1999).
- Nestle F, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, and Nickoloff B. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen presenting cells. *American Journal of Pathology*, 150:641-651 (1997).
- Panje WR. Regression of head and neck carcinoma with a prostaglandin-synthesis inhibitor. *Arch Otolaryngol* 1981; 107: 658-63
- Pearson and Choi, Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10578-82 (1993).
- Randolph G. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines and lipid mediators. *Seminars in Immunology*, 13:267 (2001).
- Ridgway D. The First 1000 Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Investigation*, 21:873-886 (2003).
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, JB Lippincott Co, Phila, Pa., (1989).
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, and Schuler G. Generation of mature dendritic cells from blood. An improved method with regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods*, 196:137-151 (1996).
- Rogers P, and Croft M. CD28, Ox-40, LFA-1 and CD-4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of the antigen. *The Journal of Immunology*, 164:2955-2963 (2000).
- Rosenberg SA, Yang JC, and Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Natural Medicine*, 10:909-915 (2004).
- Rothstein, "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" in *Methods in Enzymology*, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 19, pp. 281-301 (1991).
- Saha A, Hadden E M, Hadden J W. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocytes and thymocyte response in vivo. *Int'l J Immunopharmacol* 17:729-734 (1995).
- Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9:709-715 (1997).
- Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, and Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *British Journal of Cancer*, 78: 1573-1579 (1998).
- Saito T, Kuss I, Dworacki G, Gooding W, Johnson J, and Whiteside T. Spontaneous ex Vivo Apoptosis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, 5:1263-1273 (1999).
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, and Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down regulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182:389 (1995).

Sallusto F, and Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor α . *Journal of Experimental Medicine*, 179:1109 (1994).

Sanda M G, Smith D C, Charles L G. Recombinant vaccinia PSA (Prostvac) can include a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. *Urology* 52:2 (1999).

Schedl et al., "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", *Nature*, Vol. 362, pp. 258-261 (1993).

Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, and Eigler A. Extracellular ATP and TNF- α synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *Journal of Immunology*, 165:4704 (2000).

Schuler-Thumer B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, and Schuler G. Rapid Induction of Tumor-specific Type 1 T Helper Cells in Metastatic Melanoma Patients by Vaccination with Mature, Cryopreserved, Peptide-loaded Monocyte-derived Dendritic Cells. *J. Exp. Med.*, 195: 1279-1288 (2002).

Smith B, Smith G, Carter D, Sasaki C, and Haffty B. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein Levels in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 18:2048-2052 (2000).

Sorg R, Ozcan Z, Brefort T, Fischer J, Ackermann R, Muller M, and Wernet P. Clinical-Scale Generation of Dendritic Cells in a Closed System. *Journal of Immunotherapy*, 26:374-384 (2003).

Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, and Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology*, 161, 1083 (1998).

Sprent, et al, *Science*, Vol. 293, 245-248 (2001).

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, 9:271-296 (1991).

Steinman R, and Nussenzweig M. Avoiding horro autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99:351-358 (2002).

Strauss et al., "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine $\alpha 1$ (I) collagen locus", *Science*, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).

Tagawa M. Cytokine therapy for cancer. *Current Pharmaceut Design* 6(6):681-699 (2000).

Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, and Matsumoto Y. Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits Maturation of Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide, but not by Proinflammatory Cytokines. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 53:543-550 (2004).

Tas M, Simons P, Balm F, and Drexhage H. Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 36:108-114 (1993).

Thumher M, Radmayr C, Ramoner R, Ebner S, Bock G, Klocker H, Romani N, and Bartsch G. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *International Journal of Cancer*, 68:1-7 (1996).

Thumher B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brouck EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, and Schuler G. Vaccination with Mage-3A1 Peptide-pulsed Mature, Monocyte-derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 190:1669-1678 (1999).

Valente G, DeStefani A, Jemma C, Giovarelli M, Geuna N, Cortesina G, Fomi G, Palestro G. Infiltrating leukocyte populations and T-lymphocyte subsets in head and neck squamous cell carcinomas from patients receiving perilymphatic injections of recombinant interleukin-2. A pathologic and immunophenotypic study. *Modem Pathol* 3(6): 702-708 (1990).

Valente G, DeStefani A, Jemma C. Infiltrating leukocyte populations and T lymphocyte subsets in H&NSCC from patients receiving perilymphatic injections of rIL-2. *Mod Pathol* 1990; 3:702-708

Van der Eynde B, Van der Bruggen, T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9:684-693 (1997).

Verastegui E, Barrera J L, Zinzer J, del Rio R, Meneses A, de la Garza J, Hadden J W. A natural cytokine mixture (IRX-2) and interference with immune suppression induce immune mobilization and regression of head and neck cancer. *Int'l J Immunopharmacol* 11/12:619-627 (1997).

Verastegui E, Hadden EM, Barrera J, Meneses A, Hadden JW. A natural cytokine mixture (IRX-2) and interference with immune suppression induce immune regression and improved survival in head and neck cancer. *Int'l. Journal of Immunorehabilitation*; 1999; 12: 5-11.

Wang R F, Rosenberg S A. Human tumor antigens for cancer-vaccine development *Immunologic Reviews* 170: 85-100 (1999).

Weber J. Tumor vaccines. *Medscape Anthology* 3:2 (2000).

Whiteside, et al, *Cancer Res.* 53:5654-5662, (1993).

Whiteside T, Stanson J, Shurin M, and Ferrone S. Antigen-Processing Machinery in Human Dendritic Cells: Up-Regulation by Maturation and Down-Regulation by Tumor Cells. *The Journal of Immunology*, 173:1526-1534 (2004).

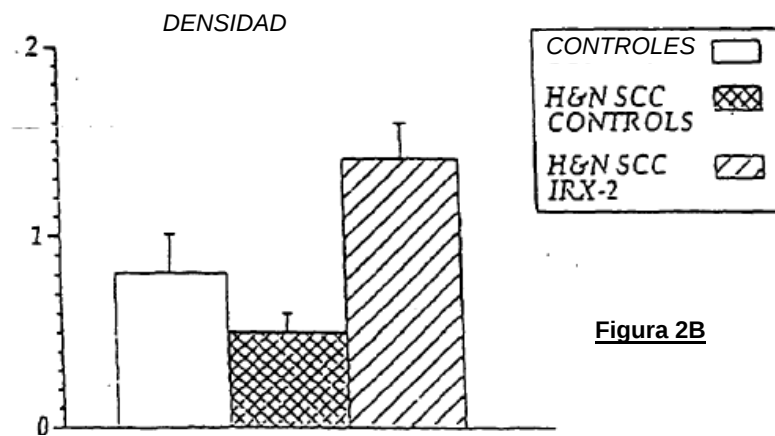
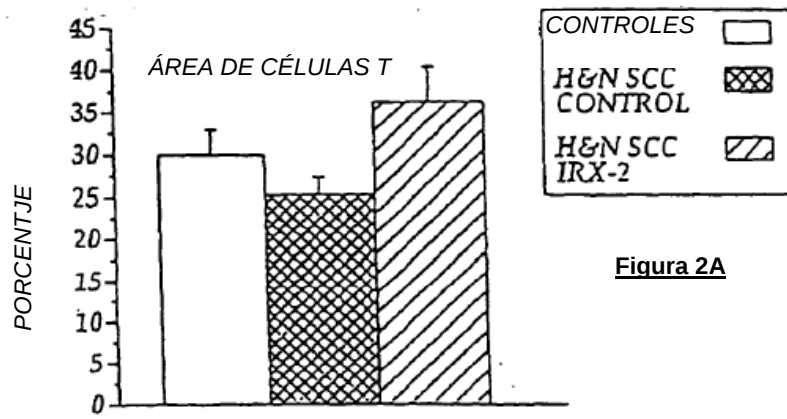
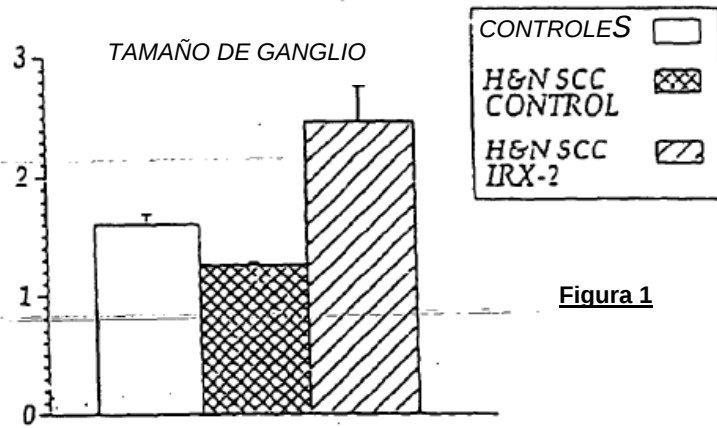
Whiteside T. Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer. *Current Oncology Report*, 2001:346-355 (2001).

Wolf et al, *Arch. Oto. Laryngol.* 111:716-725 (1985).

Zhou L, and Tedder T. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93:2588 (1996).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un portador farmacéutico aceptable y una mezcla de citoquinas naturales preparada en presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y en presencia continua o pulsada de un mitógeno, conteniendo la mezcla de citoquinas naturales como componentes activos las citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α , donde la IL-1 se halla a una concentración de 60 a 6.000 pcg por ml, la IL-2 se halla a una concentración 600 a 60.000 pcg por ml, la IL-6 se halla a una concentración de 60 a 6.000 pcg por ml, la IL-8 se halla a una concentración de 6.000 a 600.000 pcg por ml y el IFN- γ y TNF- α se hallan a una concentración de 200 a 20.000 pcg por ml, para uso en el tratamiento de la inmunodeficiencia celular caracterizada por linfocitopenia T, por uno o más defectos funcionales de las células dendríticas, o por uno o más defectos funcionales de los monocitos, en donde el tratamiento comprende administración de dicha mezcla por sin administración acompañante de ciclofosfamida o indometacina.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la IL-1 se halla a una concentración de 150 a 1200 pcg por ml, la IL-2 se halla a una concentración 3000 a 12.000 pcg por ml, la IL-6 se halla a una concentración de 300 a 2.000 pcg por ml, la IL-8 se halla a una concentración de 20.000 a 180.000 pcg por ml y el IFN- γ y TNF- α se hallan a una concentración de 1000 a 4.000 pcg por ml.
3. Una composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la cual la mezcla comprende además y el E-12, GM-CSF, y G-CSF.
4. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la mezcla de citoquinas es para administración a una concentración de 40 a 500 unidades de equivalencia de IL-2.
5. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los defectos funcionales de los monocitos se han determinado por un test de piel negativo para dicha mezcla de citoquinas.
6. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los defectos funcionales de las células dendríticas están asociados con histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos.
7. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento se realiza durante la recurrencia de tumores



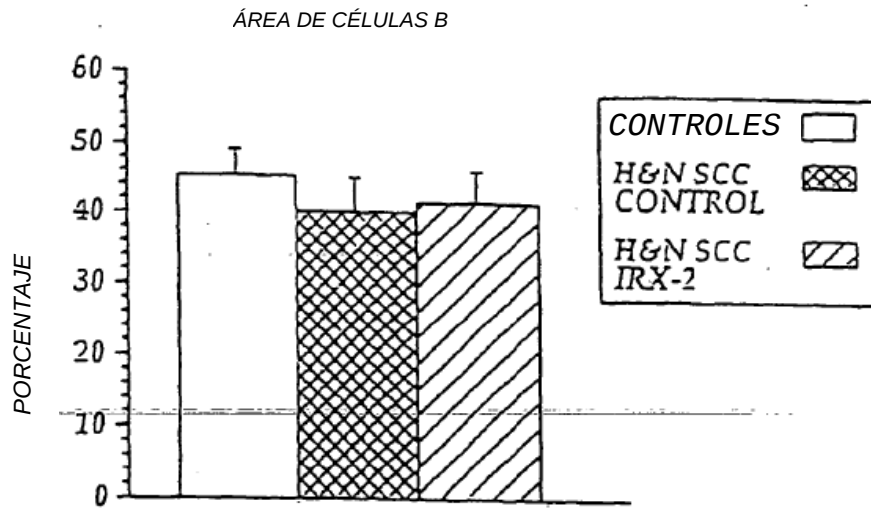


Figura 3A

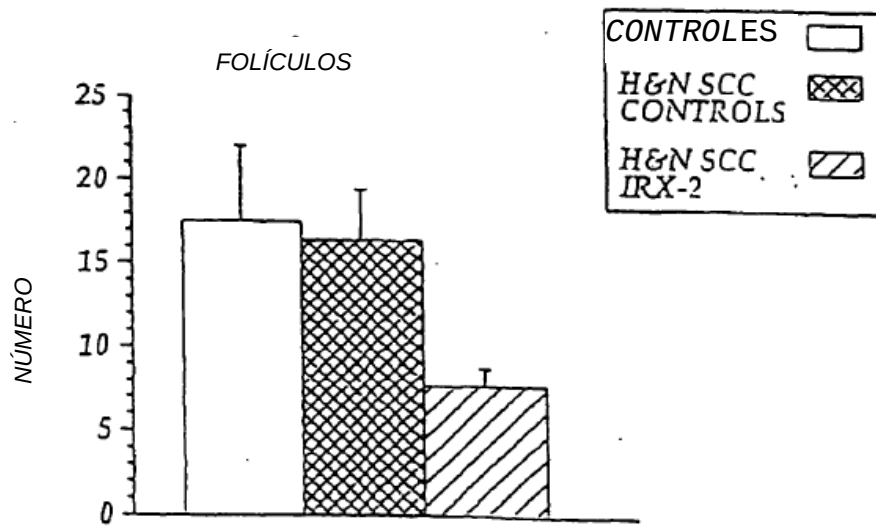


Figura 3B

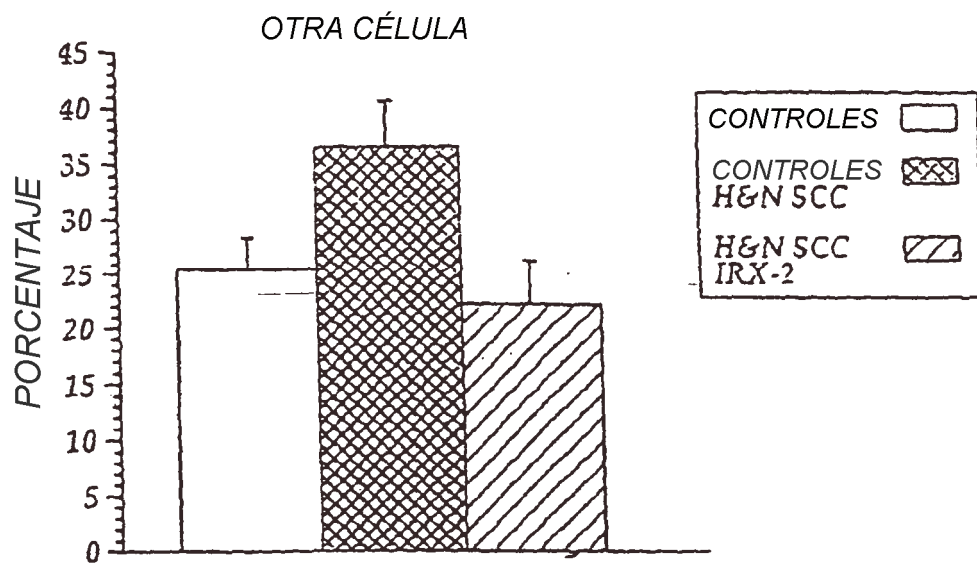


Figura 4A

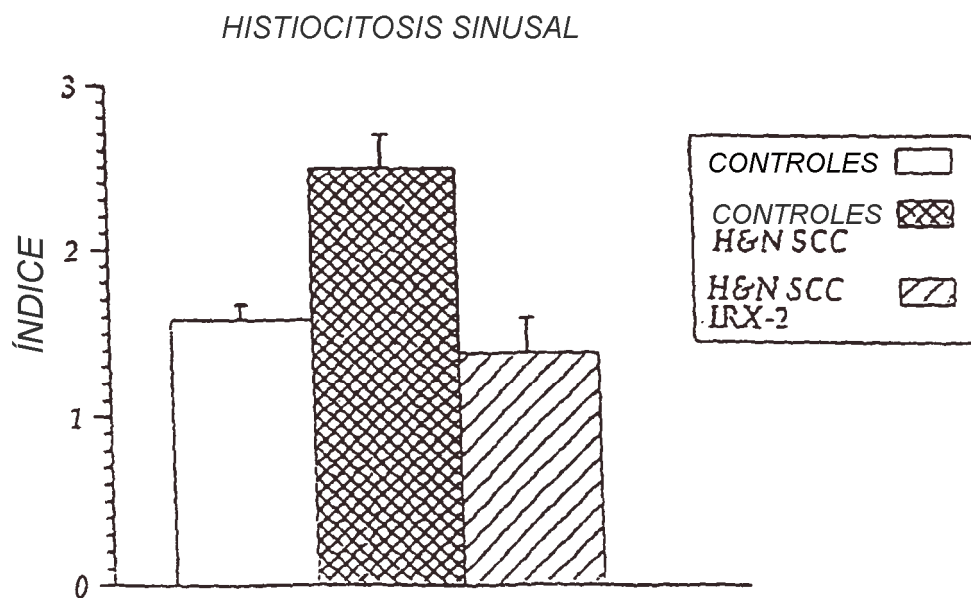


Figura 4B

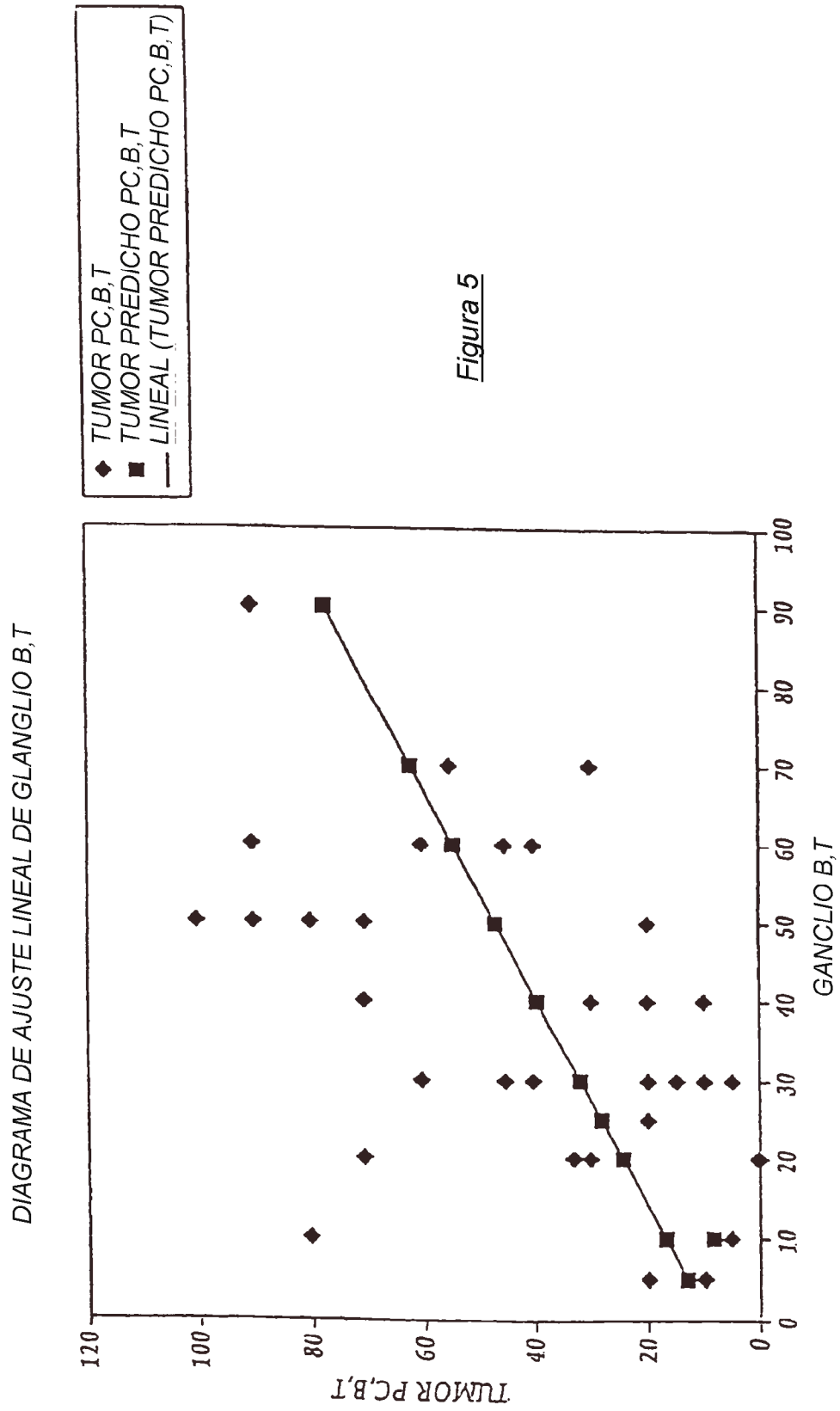


Figura 5

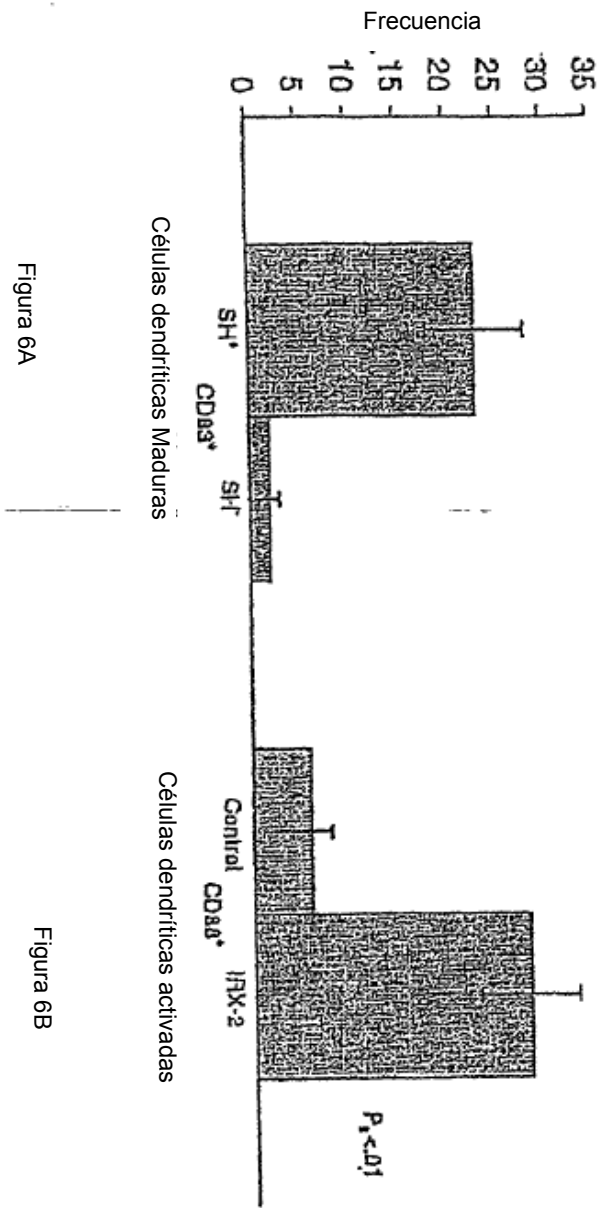


Figura 7

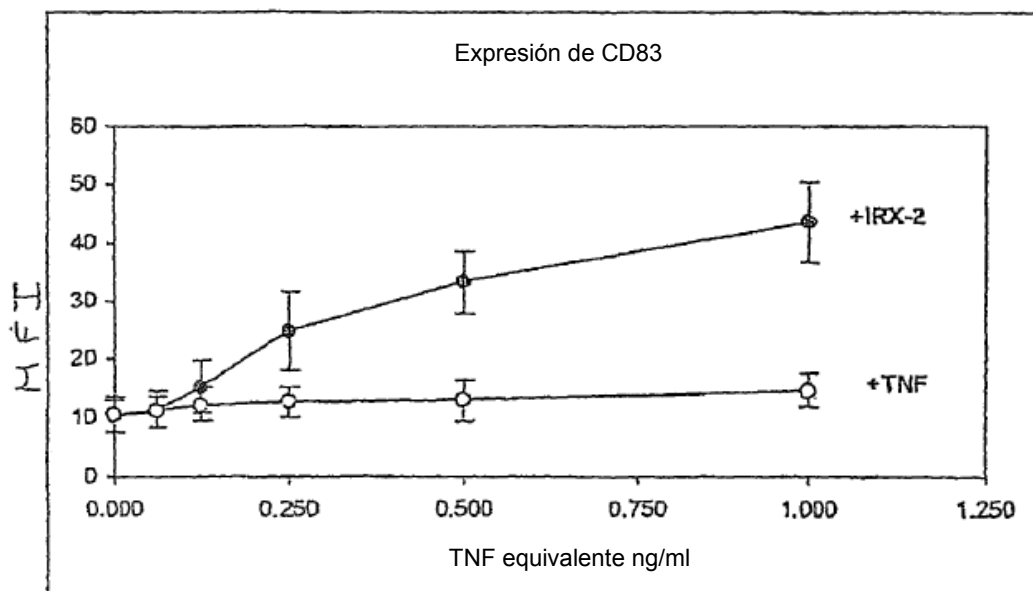
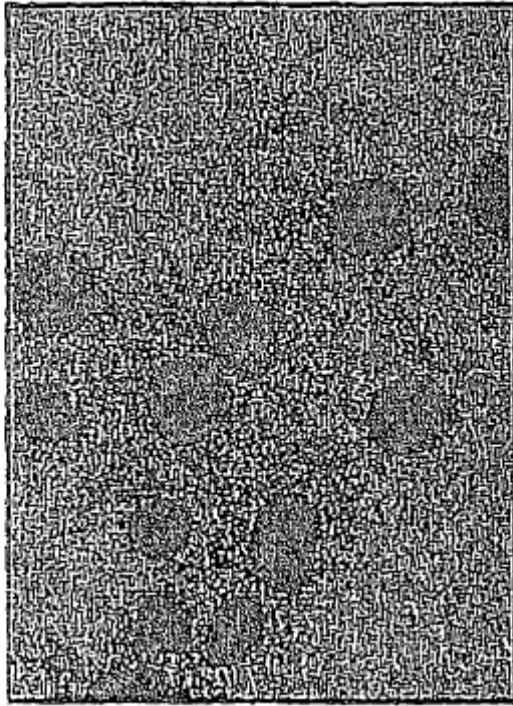


Figura 8

A



B

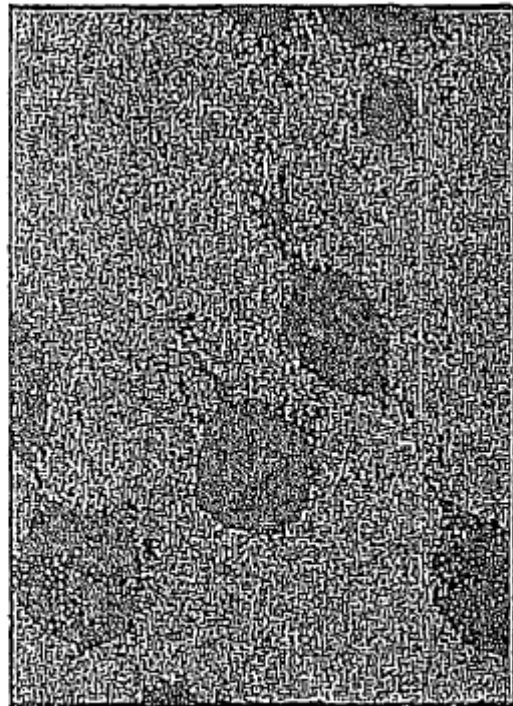


Figura 9

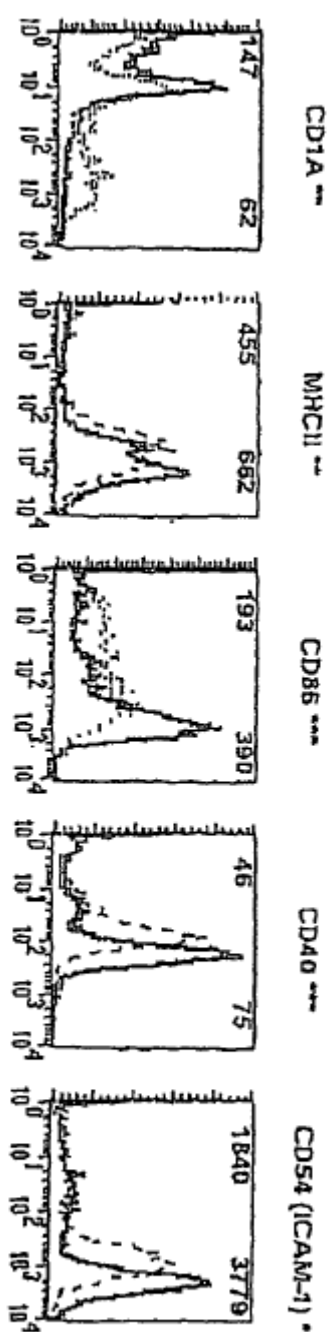


Figura 10

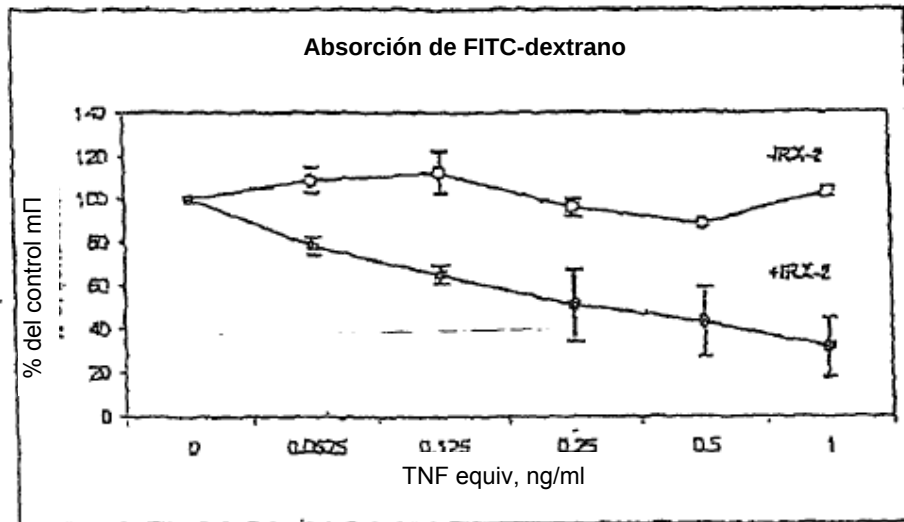


Figura 11

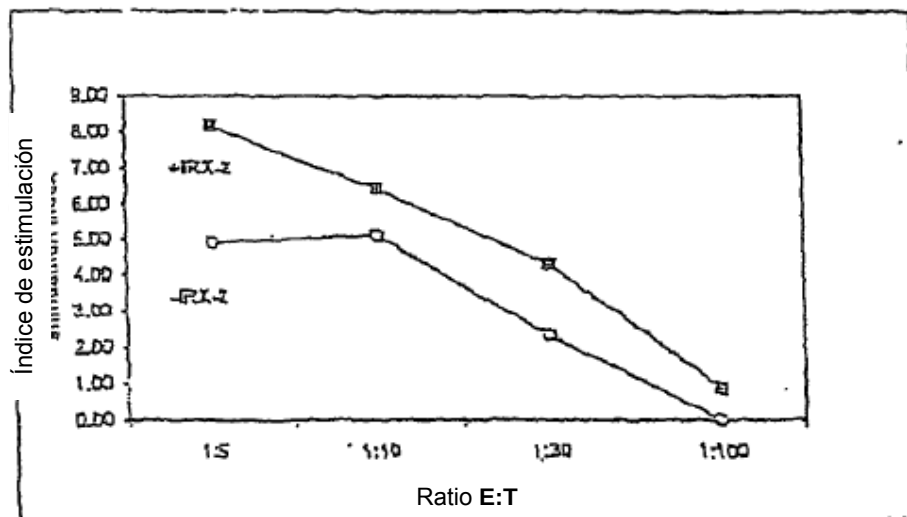
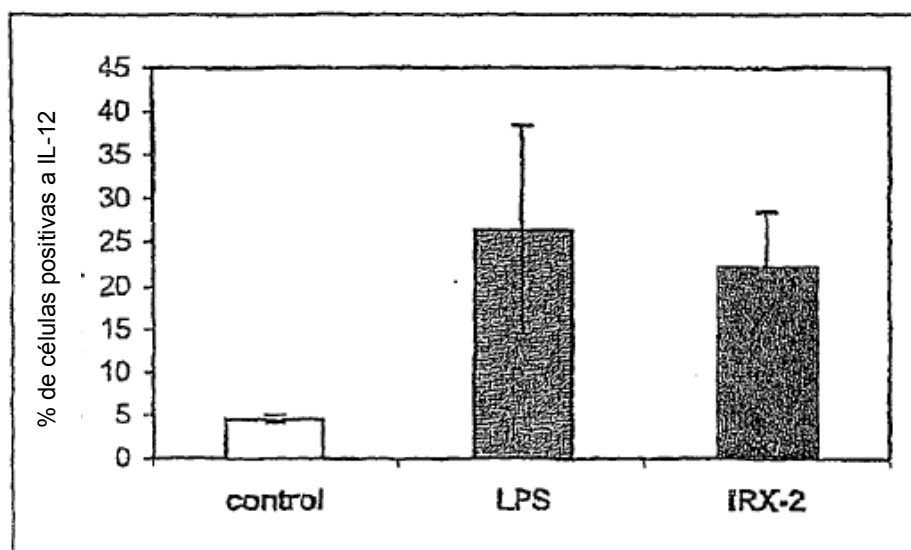


Figura 12

A



B

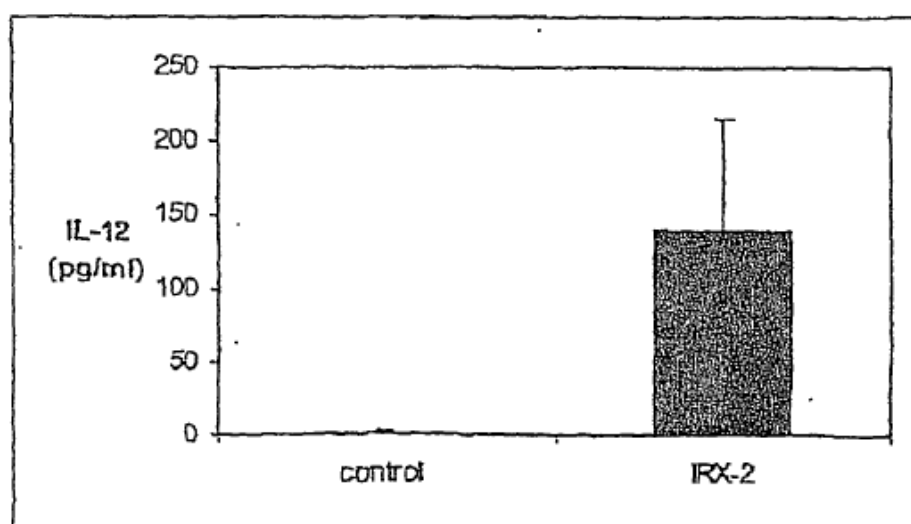


Figura 13

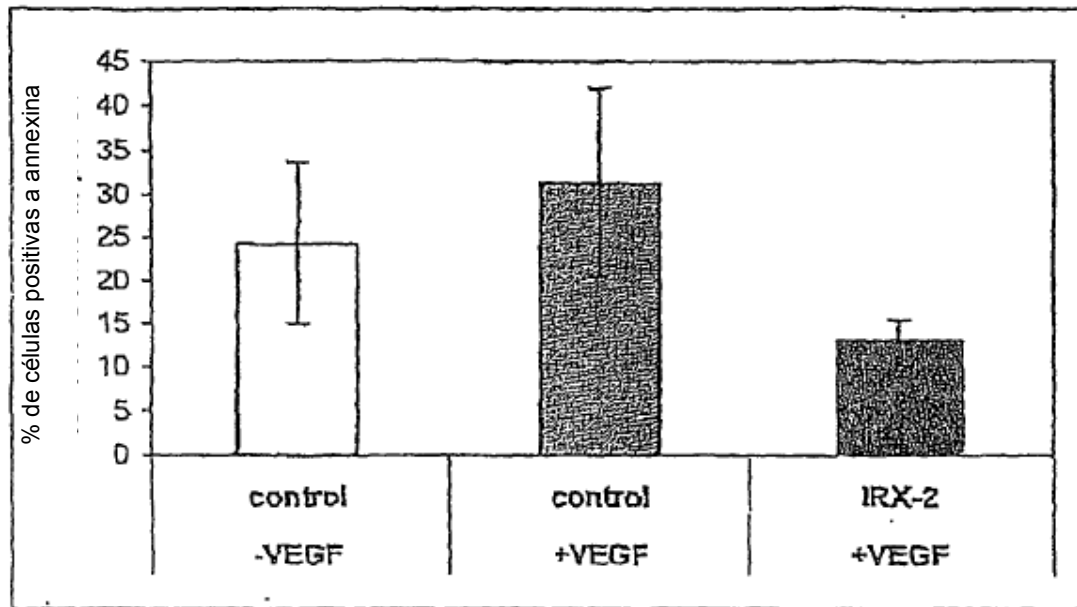
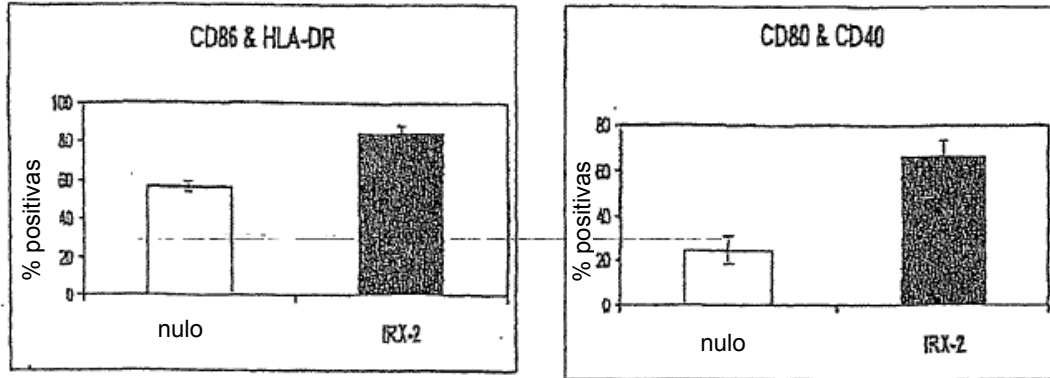


Figura 14

A



B

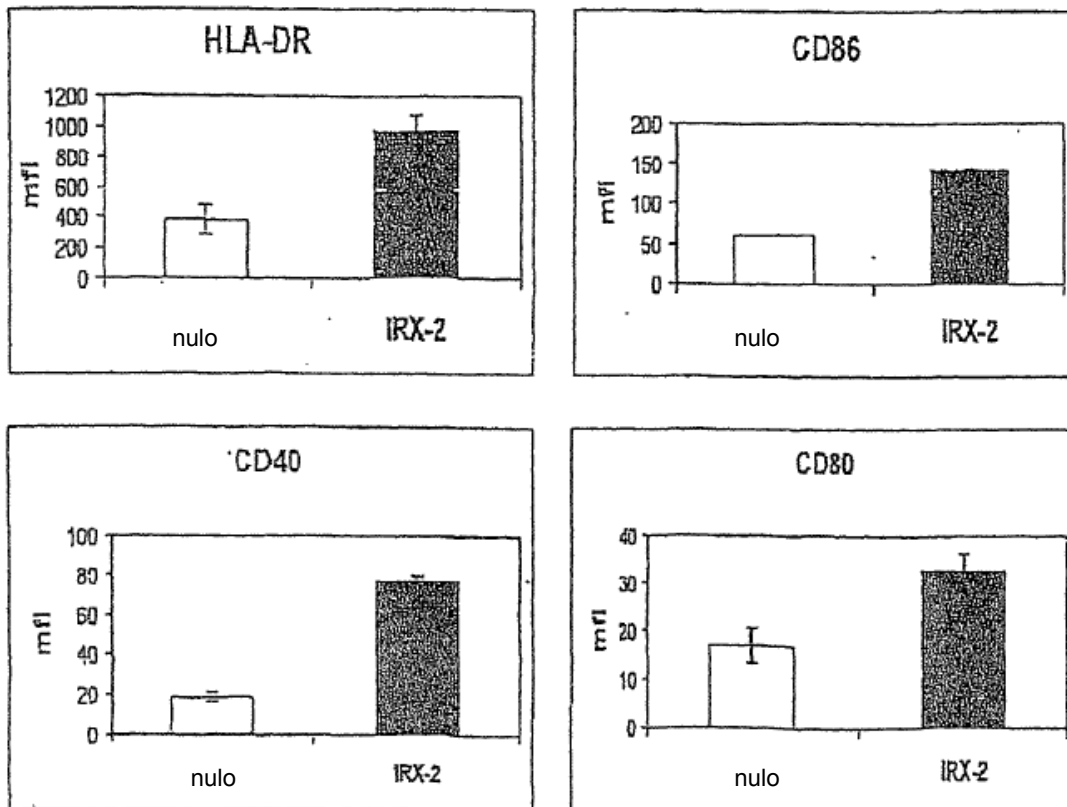
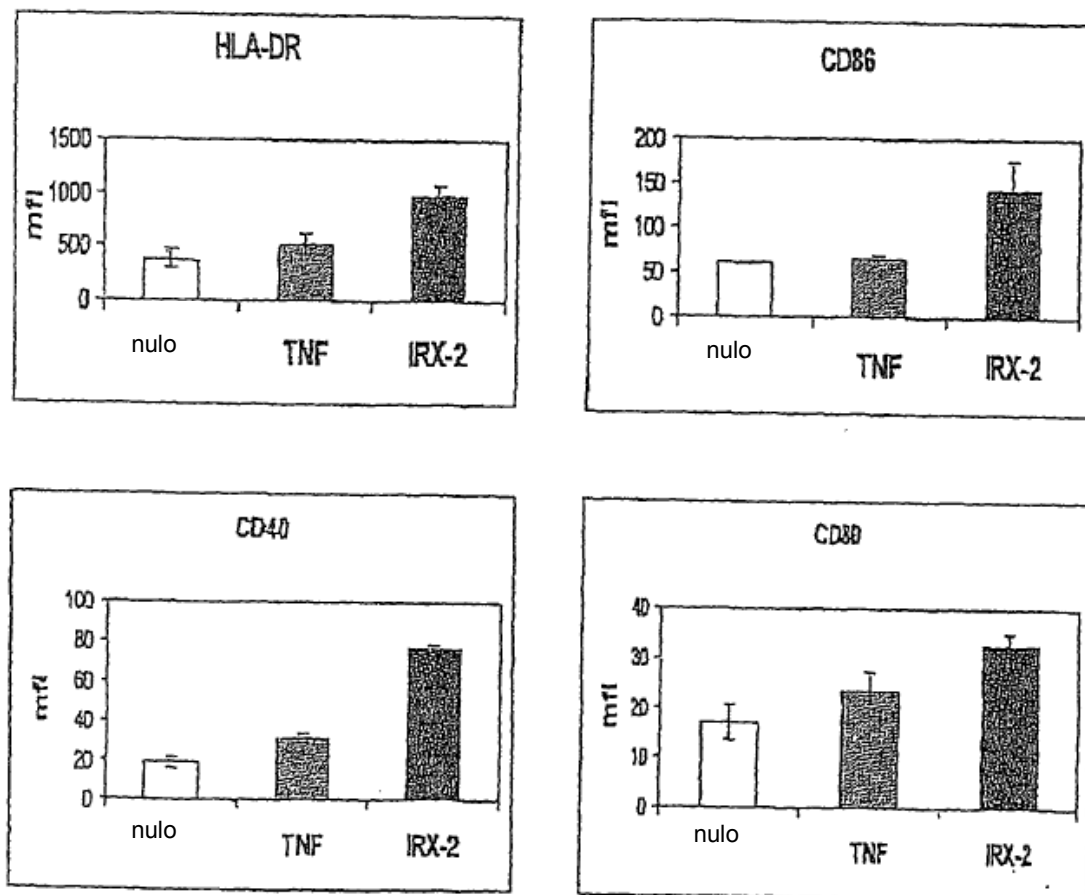


Figura 15



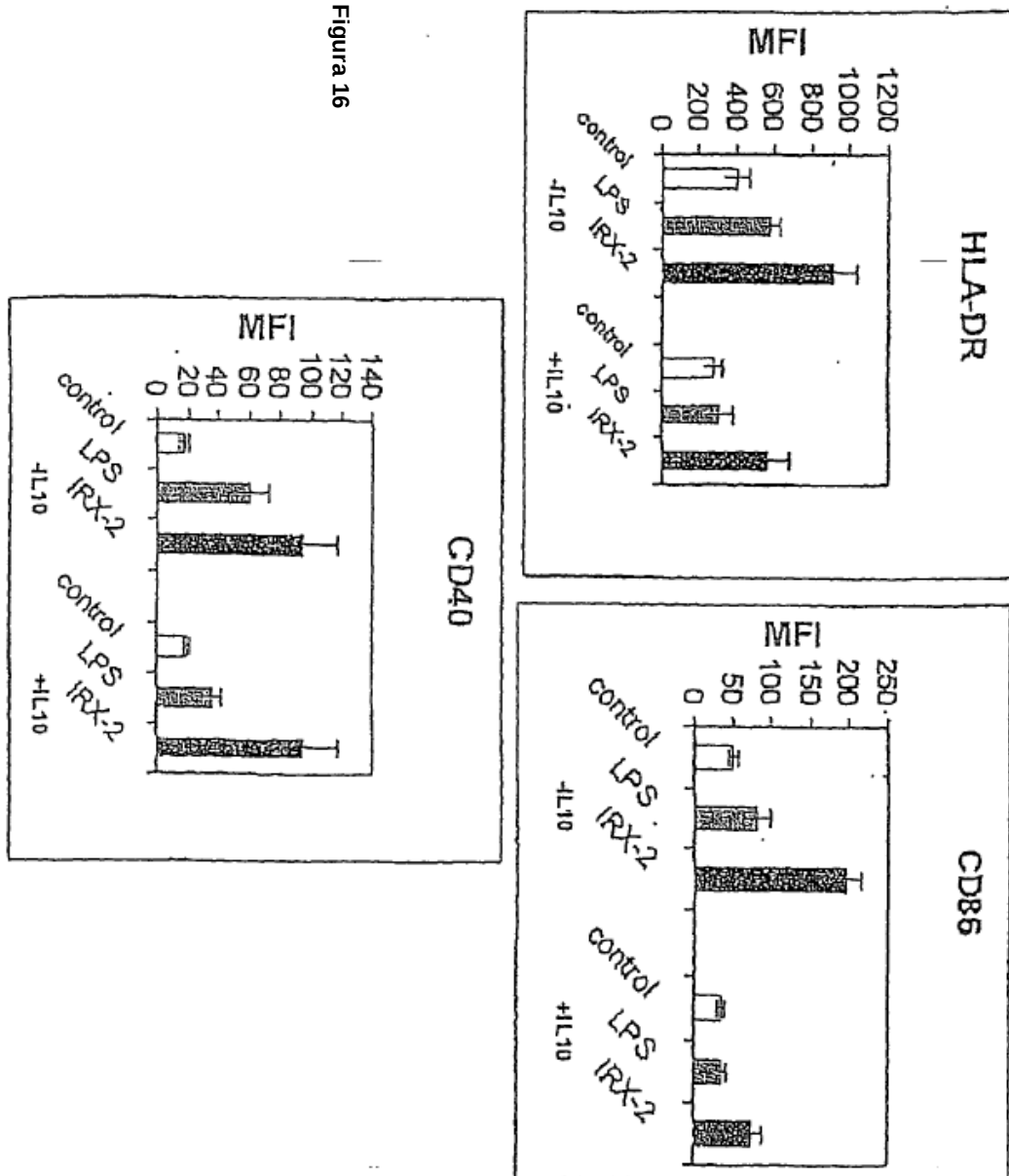


Figura 16

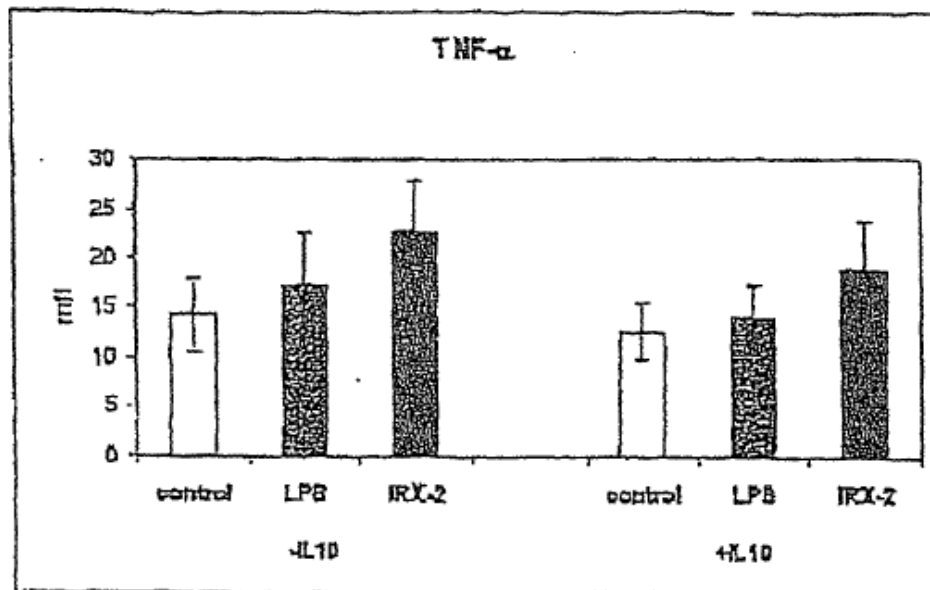


Figura 17