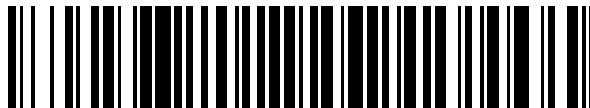


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 133**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005 E 05756247 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 1753452**

54 Título: **Método de modificación de la proporción de CD4/CD8 y del infiltrado celular mononuclear en un tumor**

30 Prioridad:

04.06.2004 US 576601 P

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**CEL-SCI CORPORATION (100.0%)
SUITE 802, 8229 BOONE BOULEVARD
VIENNA, VA 22182, US**

72 Inventor/es:

TALOR, EYAL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 133 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de modificación de la proporción de CD4/CD8 y del infiltrado celular mononuclear en un tumor

- 5 La patente o solicitud de patente, contiene al menos una figura realizada en color. Las copias de la presente solicitud o publicación de solicitud de patente, con una o varias figuras en color, serán proporcionadas por la Oficina de patentes a petición y pago de la tasa necesaria.

Introducción

- 10 La presente invención se refiere a un método de modificación de la proporción de CD4/CD8 y del infiltrado celular mononuclear en un tumor. Se muestra una modulación significativa de las células inmunes infiltrantes mediante una reducción de los linfocitos T CD8+ y un aumento significativo de los linfocitos T CD4+ que se infiltran en el tumor con 15 800 UI/día como IL-2 durante 5 días por dosis semanal de tratamiento con inyección de interleucina leucocitaria (LI) para un total de 3 semanas. La baja proporción de CD4/CD8 observada en un grupo de control no tratado de pacientes con carcinoma oral de células escamosas (COCE) aumentó drásticamente en el estroma e intraepitelialmente como resultado del tratamiento con LI. Una dosis de 800 UI/día como IL-2 durante 5 días a la semana durante 3 semanas de tratamiento con LI neoadyuvante de pacientes con COCE primario avanzado también produjo un cambio de paradigma, estando el cambio de paradigma definido como un infiltrado de linfocitos T 20 CD4+ notable y un cambio claro y específico en la densidad y la localización de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas y células inflamatorias, en particular, de neutrófilos de nidos cancerosos.

- La inyección de interleucina leucocitaria (LI) es una mezcla exenta de suero y exenta de mitógenos compuesta de 25 proporciones específicas de citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF con respecto a la interleucina 2 (IL-2). La LI también es eficaz en la inducción de las células cancerosas a entrar en una fase del ciclo celular proliferativo que aumente su vulnerabilidad a la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia. La LI se puede usar sola o en combinación con otros fármacos para el tratamiento del cáncer, aumentando así el éxito del tratamiento del cáncer y la supervivencia sin enfermedad de pacientes con cáncer como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N $^{\circ}$ 10/611.914, presentada el 3 de julio de 2003, publicada como el documento US 2005-0002896 A1.

- 30 El documento WO 2005/007086 A2, técnica anterior conforme al artículo 54(3) EPC, se refiere a un método de presensibilización del cáncer antes del tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia y a una mezcla de citocinas usada en dicho método.

- 35 Feinmesser, R. *et al.* (2003) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 129: 74-881 y Tímár, J. *et al.*, (2003) "Laryngoscope" 113: 2206-2217, evaluaron la eficacia y la toxicidad de la LI en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello y sus efectos sobre subpoblaciones peritumorales e intratumorales de células mononucleares de COCE. Tímár, J. *et al.* (2005) *J. Clin. Oncol.* 23: 3421-3432, investigaron los efectos clinicopatológicos del tratamiento con LI neoadyuvante local en el COCE.

- 40 Gez *et al.*, (1999) *Cancer Investigation* 17: 259-263, investigan subpoblaciones de linfocitos T en 10 pacientes con carcinoma de células renales metastásico tratado mediante interleucina-2 recombinante, interferón- α recombinante, 5-fluorouracilo y vinblastina.

45 **Antecedentes de la invención**

- La interacción entre el tumor y el hospedador es una característica compleja de la progresión del tumor y es un objetivo cada vez más importante para la terapia contra el cáncer (Tímár *et al.*, "Molecular pathology of tumor metastasis III. Target array and combinatorial therapies", *Pathol Oncol Res* 9:49(2003)). Las interacciones celulares 50 entre las células cancerosas, las células efectoras inmunes, las células inflamatorias, la vasculatura del tumor y el estroma muestran una interacción compleja de múltiples facetas. La modulación terapéutica de la función de cada miembro de dicha red interactiva compleja puede generar un mayor control del tumor.

- En general, se obtiene un efecto contra el cáncer inmunoterapéutico satisfactorio en la expresión de antígenos de 55 tumores y MHC en las células tumorales diana, la sensibilidad de las células cancerosas a los mecanismos efectoras y la inducción/el aumento de la actividad de los mecanismos efectoras contra el cáncer (Whiteside, "Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer", *Current Oncol Rep* 3:46 (2001); Whiteside *et al.*, "Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck", *Cancer Res* 53:5654 (1993)). Hay varias estrategias inmunológicas factibles para lograr estos objetivos mediante el uso de citocinas para aumentar los mecanismos efectoras inmunes. Hasta hace poco tiempo, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) no se consideraba una diana inmunoterapéutica, pero los estudios pioneros realizados por Whiteside y otros sugirieron que las metodologías inmunoterapéuticas bien 60 podrían ser una nueva forma de gestionar este tipo de cáncer tan agresivo.

- 65 Los primeros resultados demostraron tasas de respuesta muy variables para las administraciones locales de rIL-2 (6-65 %) (Vlock *et al.*, "Phase Ib trial of the effect of peritumoral and intranodal injections of interleukin-2 in patients

with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: an eastern cooperative oncology group trial", *J Immunother* 15:134 (1994); Cortesina *et al.*, "Interleukin-2 injected around tumor-draining lymph nodes in head and neck cancer", *Head Neck* 13:125 (1991)). Los ensayos de fase III que implican la administración local de rhIL-2 a pacientes de COCE dieron lugar a un aumento significativo ($p < 0,03$) de la supervivencia libre de enfermedad, así como de la supervivencia global (De Stefani *et al.*, "Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations", *J Immunother* 19:125 (1996); De Stefani *et al.*, "Improved survival with perilymphatic interleukin-2 in patients with respectable squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx", *Cancer* 95:90 (2002)). El examen histológico del tejido tumoral obtenido de pacientes con COCE tratados con rhIL-2 demostró el enriquecimiento en linfocitos T CD25+/HLADR+/CD3+ con necrosis focal (Valente *et al.*, "Infiltrating leukocyte populations and T-lymphocyte subsets in head and neck squamous cell carcinoma from patients receiving perilymphatic injections of recombinant interleukin 2", *Modern Pathol* 3:702 (1990)).

Los ensayos clínicos en los que se usa IL-2 natural, así como una mezcla de citocinas de origen natural proporcionaron tasas de respuesta del 30 % al 53,3 % (Hadden *et al.*, "Interleukins and contrasuppression induce immune regression of head and neck cancer", *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120:395 (1994); Verastegui *et al.*, "A natural cytokine mixture (IRX-2) and interference with immune suppression induce immune mobilization and regression of head and neck cancer", *Int J Immunopharmac* 19:619 (1997); Meneses *et al.*, "Histologic findings in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving perilymphatic natural cytokine mixture (IRX-2) prior to surgery", *Arch Pathol Lab Med* 122:447 (1998); Barrera *et al.*, "Combination Immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck", *Arch.* (2000)). El análisis histopatológico indicó que la mezcla de citocinas naturales produjo la infiltración del tumor de linfocitos T dependiente de la dosis predominante y la fragmentación del tumor.

Por otra parte, la mezcla de la inyección de interleucina leucocitaria (LI) exenta de suero y exenta de mitógenos compuesta de proporciones específicas de citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF con respecto a la interleucina 2 (IL-2) produjo la infiltración de linfocitos T CD3+ y CD25+ en nidos de células tumorales, así como la entrada de las células cancerosas en el modo del ciclo celular (Tímár *et al.*, "The Effect of Leukocyte Interleukin Injection (Multikine[®]) Treatment on Peritumoral and Intratumoral Subpopulation of Mononuclear Cells and on Tumor Epithelia: A Possible New Approach to Augmenting Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy in Oral Cancer", *Laryngoscope* 113:2206 (2003)).

Según lo publicado en Tímár *et al.*, la inyección de interleucina leucocitaria (LI) se administró peritumoralmente tres veces a la semana durante un período de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI o, en concreto, a 400 UI o al 800 UI, o incluso cinco veces a la semana en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI o a 400 UI o a 800 UI, en el que UI representan unidades internacionales para la interleucina 2 dadas en la primera norma internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 humana, 86/504. Las dosis se administraron a pacientes con COCE primario avanzado como tratamiento de primera línea antes de la terapia convencional y se indujeron alteraciones intratumorales en las células inmunes infiltrantes, en lugar de las células inflamatorias. La población de linfocitos T migró a los nidos cancerosos y los linfocitos T CD8+ infiltrantes se activaron según lo demuestra el aumento de la expresión de CD25+.

Aunque, en general, en la literatura científica se acepta que los linfocitos T citotóxicos CD8+ son necesarios para la destrucción tumoral, la falta de expresión de HLA de clase I en las células neoplásicas de COCE parece excluir la dirección de los linfocitos T CD8+ al COCE. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria satisfactoria hacia el COCE puede exigir la reversión de una baja proporción de CD4/CD8 intratumoral.

En particular, el predominio de linfocitos T CD8+ frente a linfocitos T CD4+ en el paciente de COCE no tratado previamente dentro del tumor y en el estroma circundante no es específico del COCE y se puede observar en muchos otros tumores sólidos. De igual manera, se han detectado proporciones bajas de CD4/CD8 en el carcinoma de células basales, el carcinoma de cuello uterino y en el cáncer de mama, lo que sugiere un estado inmunosuprimido adquirido del paciente inducido por estos tumores (Rohrbach *et al.*, "Immunology and growth characteristics of ocular basal cell carcinoma", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:35 (2001); Santin *et al.*, "Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of 1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix", *Gynecol Oncol* 81:424 (2001); Ben-Hur *et al.*, "The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immuno-histochemical and morphometric study", *Anticancer Res* 22(2B):1231 (2002)).

En combinación, estos estudios y observaciones demuestran que el tratamiento local con una mezcla de citocinas naturales es una metodología viable para el tratamiento del COCE. Sin embargo, no se evaluaron la relación entre las alteraciones inducidas en el infiltrado celular del tumor, los cambios en la histología del tumor ni las respuestas determinadas clínicamente.

Por lo tanto, existe la necesidad de modular de manera específica la densidad y la localización de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas) y las células inflamatorias, especialmente los neutrófilos, en los nidos cancerosos. También existe la necesidad de cambiar la composición del infiltrado de células inmunes del

tumor para revertir la proporción de CD4/CD8 intratumoral. También existe la necesidad de proporcionar un método de modificación de la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor en combinación con la administración de LI para aumentar la sensibilización a la radioterapia de las células tumorales residuales.

5 Sigue existiendo la necesidad de métodos de inducción de las células tumorales en un ciclo celular seleccionado del grupo de (diferentes fases del ciclo celular) G₁, S, G₂ y M, donde los nuevos métodos se pueden aplicar de forma sinérgica con quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia y mediante la modificación de la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor.

10 También existe la necesidad de presensibilizar tumores cancerosos, en general, junto con la necesidad de una nueva mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos compuesta de proporciones específicas de IL-1β con respecto a IL-2, TNF-α con respecto a IL-2, IFN-γ con respecto a IL-2 y GM-CSF con respecto a IL-2 que demuestra inesperadamente su eficacia frente a composiciones o métodos conocidos mediante la modificación de la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en métodos de modificación de la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor con una mezcla de inyección de interleucina leucocitaria (LI) exenta de suero y exenta de mitógenos compuesta de proporciones específicas de citocinas IL-1β con respecto a IL-2, TNF-α con respecto a IL-2, IFN-γ con respecto a IL-2 y GM-CSF con respecto a IL-2. La presente invención también permite el desarrollo de composiciones útiles como un producto farmacéutico o como un adyuvante para su uso en combinación con los tratamientos terapéuticos contra el cáncer tales como la quimioterapia, la inmunoterapia y la radioterapia.

25 En realizaciones de la divulgación, se desvela un método de modificación de la proporción de CD4/CD8 en una neoplasia o una enfermedad del sistema inmune con una mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos. Los métodos proporcionan una etapa de presensibilización para el tratamiento del cáncer en combinación con radioterapias u otras modalidades físicas de destrucción de las células tumorales. También se contempla un método de inducción de las células tumorales en una fase del ciclo celular vulnerable seleccionada del grupo de (diferentes fases del ciclo celular) G₁, S, G₂ y M.

30 Las aplicaciones específicas incluyen la administración de la mitad de una dosis diaria total peritumoralmente de una inyección de interleucina leucocitaria (LI) y la administración de la otra mitad de la dosis diaria total perilinfáticamente cinco (5) veces a la semana durante tres (3) semanas. La dosis diaria total es de 800 UI/ml como IL-2, representando UI unidades internacionales para la interleucina 2 dadas en la primera norma internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 humana, 86/504. La mitad de la dosis total es la dosis peritumoral. Por lo tanto, se inyectan 400 UI peritumoralmente en cuatro sitios diferentes alrededor de la masa tumoral. Se inyecta una cuarta parte (1/4) de la dosis peritumoral en cada uno de los cuatro sitios de modo que cada sitio recibe aproximadamente 100 UI/ml como IL-2. La LI se administra por vía intradérmica en los márgenes circunferenciales de la masa tumoral visible/palpable. La mitad restante de la dosis total de 400 UI como IL-2 se administra secuencialmente perilinfáticamente ipsilateral al sitio del tumor en la misma visita. Las inyecciones perilinfáticas se administran en la zona mandibular posterior, en la zona de la cadena linfática yugular ipsilateral a la masa tumoral inyectada.

45 La inyección de interleucina leucocitaria (LI) tiene las siguientes proporciones específicas de citocina con respecto a interleucina 2 (IL-2): IL-1β con respecto a la IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 a 1,5 y preferentemente a 0,7 ± 0,1 (IL-1β/IL-2), TNF-α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 a 10,9 y preferentemente a 9,5 ± 1,8 (TNF-α/IL-2), IFN-γ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 a 10,9 y preferentemente a 6,0 ± 1,1 (IFN-γ/IL-2) y GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 a 4.8 y preferentemente a 4,0 ± 0,5 (GM-CSF/IL-2).

50 En otras aplicaciones específicas descritas en el presente documento, el preparado de citocinas exento de suero y exento de mitógenos o la composición farmacéutica tiene más citocinas diferentes y otras moléculas pequeñas biológicamente activas, siendo la proporción de cada una de las moléculas pequeñas biológicamente activas con respecto a la IL-2 la siguiente: IL-3 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,38 a 0,68, preferentemente a 0,53 ± 0,15, IL-6 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 37,2 a 53,8, preferentemente a 46 ± 5,9, IL-8 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 261 a 561,5, preferentemente a 411 ± 10,6, IL-1α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,56 a 0,94, preferentemente a 0,75 ± 0,19, IL-10 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,82 a 3,22, preferentemente a 3,0 ± 0,18, IL-16 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,16 a 2,84, preferentemente a 1,84 ± 0,68, G-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,16 a 3,78, preferentemente a 2,97 ± 0,81, TNF-β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,17 a 2,43, preferentemente a 1,8 ± 0,63, MIP-1α con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 15,7 a 37,16, preferentemente a 22,7 ± 7,0, MIP-1β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 17,1 a 28,5,

preferentemente a $22,8 \pm 5,7$, una RANTES con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,3 a 2,7, preferentemente a $2,5 \pm 0,13$, un EGF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,267 a 0,283, preferentemente a $0,275 \pm 0,008$, PGE₂ con respecto a IL-2 en una intervalo de proporciones de 3,63 a 5,42, preferentemente a $4,5 \pm 0,87$ y TxB₂ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 23,47 a 25,13, preferentemente a $24,3 \pm 0,83$.

En la siguiente descripción, se exponen otros objetivos y otras ventajas de la presente invención. Las figuras y las tablas adjuntas, que constituyen una parte de la divulgación, ilustran y, junto con la descripción, explican el principio de la invención. El experto habitual en la materia apreciará que otros aspectos de la presente invención se harán evidentes con referencia a las figuras anexas y la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

A continuación, se explicará la invención en mayor detalle mediante la siguiente descripción y las realizaciones específicas y con ayuda de las figuras anexas:

La Fig. 1 representa la densidad de células infiltrantes CD4 y CD8 del número de células por HPF (campo de alta potencia), en un subgrupo que responde (al tratamiento), tratado con LI y el control, expresada como la media \pm ETM (aumento de la densidad de los linfocitos T CD4+ en comparación con el control, $p < 0,05$ y una reducción en los linfocitos T CD8+ en comparación con el control, $p < 0,05$).

La Fig. 2 representa la proporción de CD4/CD8 en el grupo tratado con LI y el control, detectada en el tumor de COCE (carcinoma oral de células escamosas) (intraepitelial y estroma). Reversión de la proporción de CD4/CD8 en comparación con el control (proporción de CD4/CD8 < 1 , en el control con respecto a la proporción de CD4/CD8 de $> 2,5$ del grupo tratado con LI).

La Fig. 3 representa la proporción de CD4/CD8 en el grupo tratado con LI (subgrupo que responde) y el control, detectada en el tumor de COCE (carcinoma oral de células escamosas) (intraepitelial y estroma). Reversión de la proporción de CD4/CD8 en comparación con el control (proporción de CD4/CD8 < 1 , en el control con respecto a la proporción de CD4/CD8 de $> 3,5$ del subgrupo que responde tratado con LI).

La Fig. 4 representa la infiltración y la localización de células dendríticas (CD1a) en el COCE (carcinoma oral de células escamosas), en la superficie del tumor (R1), en el centro del tumor (R2) y en la superficie de contacto entre el tumor y el estroma (R3). Número de células CD1a+ en HPF (campo de alta potencia), expresado como la media \pm ETM, en el subgrupo tratado con LI y el control.

La Fig. 5 representa la infiltración de macrófagos (células CD68) en el COCE (carcinoma oral de células escamosas), en el estroma tumoral y los epitelios tumorales. Número de células CD68+ en HPF (campo de alta potencia), expresado como la media \pm ETM, en el subgrupo tratado con LI y el control (reducción en el número de macrófagos en el subgrupo tratado con LI en comparación con el control, intraepitelialmente, $p < 0,002$).

La Fig. 6 representa la infiltración y la localización de neutrófilos (MPX, mieloperoxidasa) en el COCE (carcinoma oral de células escamosas), en la superficie del tumor (R1), el centro del tumor (R2) y la superficie de contacto entre el tumor y el estroma (R3). Número de células MPX+ en HPF (campo de alta potencia), expresado como la media \pm ETM, en el subgrupo tratado con LI y el control (aumento de la densidad intraepitelial de neutrófilos en el grupo tratado con LI en comparación con el control, $p < 0,005$).

La Fig. 7 representa el aspecto histológico de la necrosis del COCE (tinción con H y E). Grupo "A" - control que muestra la falta de necrosis en el nido intraepitelial del COCE; y Grupo "B" - tratado con LI, que muestra que todo el nido canceroso es necrótico, está lleno de residuos y leucocitos.

La Fig. 8 representa el efecto del tratamiento sobre la proporción de los nidos cancerosos del COCE (carcinoma oral de células escamosas) en el grupo tratado con LI y el grupo de control (según lo determinado mediante análisis morfométricos). Reducción de la proporción de nidos cancerosos en el grupo tratado con LI en comparación con el control, $p < 0,005$).

La Fig. 9 representa la activación inmune mediante inyección de interleucina leucocitaria (LI). La LI contiene citocinas, quimiocinas y linfocinas linfoproliferativas que funcionan de manera coordinada para producir un ataque inmune coordinado en el tumor *in vivo*. La LI se inyecta en las proximidades del tumor y de los ganglios linfáticos locales. En primer lugar, los factores de necrosis tales como TNF- α provocan la muerte de las células tumorales liberando antígenos tumorales. En segundo lugar, células presentadoras de antígenos tales como las células dendríticas en el proceso de la superficie de contacto entre el tumor y el estroma y presentan estos antígenos tumorales a los linfocitos T CD4+. En tercer lugar, las linfocinas linfoproliferativas tales como IL-2 provocan la proliferación de los linfocitos T tanto en el ganglio linfático local como en la zona del tumor. En cuarto lugar, Los factores quimiotácticos de LI, tales como IL-6, IL-8 y otros conducen a las células inmunes específicas del tumor y a las células inflamatorias a la zona del tumor para afectar a la infiltración de las células inmunes en el tumor y provocar una respuesta inflamatoria hacia el tumor que culmine en la destrucción del tumor.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no esté englobada por las reivindicaciones se proporciona meramente a título informativo.

La presente invención se refiere a métodos de presensibilización del cáncer en general y a una nueva mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos compuesta de proporciones específicas de IL-1 β con respecto a IL-2, TNF- α con respecto a IL-2, IFN- α con respecto a IL-2 y GM-CSF con respecto a IL-2. Una de dicha mezcla de citocinas es la inyección de interleucina leucocitaria (LI), que ha demostrado capacidades inmunomoduladoras. La importancia clínica de la inmunosupresión en pacientes con cáncer afecta inesperadamente a los métodos de presensibilización del cáncer antes del tratamiento terapéutico y, en particular, a la entrada de la célula tumoral en una fase del ciclo celular.

Por otra parte, la administración de 400 UI/ml peritumoralmente de una inyección de interleucina leucocitaria (LI) y la administración de 400 UI/ml perilinfáticamente cinco (5) veces a la semana durante tres (3) semanas modificó la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor. La dosis peritumoral se realiza inyectando 100 UI/ml como IL-2 en cuatro sitios diferentes en torno a la masa tumoral. Se inyecta en cada uno de los cuatro sitios un cuarto (1/4) de toda la dosis peritumoral de 400 UI/ml, de modo que cada sitio recibe aproximadamente 100 UI/ml como IL-2. La mitad restante de la dosis total de 800 UI como IL-2 se administra perilinfáticamente ipsilateral al sitio del tumor secuencialmente y en la misma visita. Las inyecciones perilinfáticas se dan en un sitio en la zona mandibular posterior de la superficie de la cadena linfática yugular ipsilateral a la masa tumoral inyectada. UI representa unidades internacionales para la interleucina 2 dadas en la primera norma internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 humana, 86/504.

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) es un preparado exento de suero, exento de mitógenos y exento de antibióticos producido a partir de células mononucleares humanas de sangre periférica que incluyen linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. Existen tres "familias" de citocinas en la LI que, en conjunto, son importantes para la actividad biológica única de la LI. Incluyen citocinas directas citotóxicas/citostáticas y virucidas/virostáticas, tales como TNF- α e IFN- γ , citocinas linfoproliferativas tales como IL-1 e IL-2 y citocinas quimiotácticas tales como IL-6, IL-8 y MIP-1 α . Además, la totalidad de las diferentes citocinas y pequeñas moléculas biológicas que constituyen la LI proceden de la estimulación *in vitro* mediante lectina (PHA) de células mononucleares humanas de sangre periférica, que incluyen linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. La centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque separa los glóbulos blancos (que incluyen linfocitos T, linfocitos B y los macrófagos) de la sangre completa del donante y una serie de lavados (en medios fisiológicamente tamponados) facilita el aislamiento de los linfocitos y la eliminación de los glóbulos rojos, los residuos celulares y otros componentes celulares no deseados del componente de glóbulos blancos aislados de la sangre completa del donante.

La LI contiene diferentes citocinas, que están presentes a proporciones específicas de cada citocina con respecto a la interleucina 2 (IL-2) de la siguiente manera: IL-1 β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 a 1,5 y preferentemente a $0,7 \pm 0,1$ (IL-1 β /IL-2), TNF- α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 a 10,9 y preferentemente a $9,5 \pm 1,8$ (TNF- α /IL-2), IFN- γ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 a 10,9 y preferentemente a $6,0 \pm 1,1$ (IFN- γ /IL-2) y GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 a 4,8 y preferentemente a $4,0 \pm 0,5$ (GM-CSF/IL-2).

En el presente documento, también se describe que el resto de las diferentes citocinas y otras moléculas pequeñas biológicamente activas de la LI también están presentes en cada preparación de la molécula pequeña biológicamente activa con respecto a la IL-2 de la siguiente manera: IL-3 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,38 a 0,68, preferentemente a $0,53 \pm 0,15$, IL-6 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 37,2 a 53,8, preferentemente a $46 \pm 5,9$, IL-8 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 261 a 561,5, preferentemente a $411 \pm 10,6$, IL-1 α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,56 a 0,94, preferentemente a $0,75 \pm 0,19$, IL-10 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,82 a 3,22, preferentemente a $3,0 \pm 0,18$, IL-16 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,16 a 2,84, preferentemente a $1,84 \pm 0,68$, G-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,16 a 3,78, preferentemente a $2,97 \pm 0,81$, TNF- β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,17 a 2,43, preferentemente a $1,8 \pm 0,63$, MIP-1 α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 15,7 a 37,16, preferentemente a $22,7 \pm 7,0$, MIP-1 β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 17,1 a 28,5, preferentemente a $22,8 \pm 5,7$, RANTES con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,3 a 2,7, preferentemente a $2,5 \pm 0,13$, un EGF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,267 a 0,283, preferentemente a $0,275 \pm 0,008$, PGE₂ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,63 a 5,42, preferentemente a $4,5 \pm 0,87$ y TxB₂ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 23,47 a 25,13, preferentemente a $24,3 \pm 0,83$.

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) se ensayó usando un protocolo de caracterización y no contiene las siguientes citocinas ni otras moléculas pequeñas biológicamente activas: IL-4, IL-7 ni IL-15, TfR, sICAM, PDGF-AB, IFN- α , EPO, LTC 4, TGF- β 2, FGF básico, angiogenina, sE-selectina, SCF y LIF. La LI solo contiene trazas (justo por encima del nivel de detección del ensayo) de IL-12 y LTB4.

En el proceso de fabricación, las células mononucleares se separan de las "capas leucocitarias" del donante humano mediante centrifugación en gradiente escalonado y se cultivan con PHA para aumentar la producción y la

secreción de IL-2 y de otras citocinas a partir de los glóbulos blancos del donante en cultivo, según lo desvelado en las patentes de EE.UU. Nº 5.093.479, 4.390.623, 4.388.309, 4.406.830, 4.661.447, 4.681.844 y 4.464.355. Posteriormente, se recoge el sobrenadante del cultivo en condiciones asépticas, se aclara y se somete a un proceso comercial de exclusión de virus. A continuación, se concentra el sobrenadante aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración y microfiltración.

En este momento, se añade albúmina sérica humana inyectable, USP y luego se tampona el concentrado hasta alcanzar un pH fisiológico y se lleva hasta una concentración diana de IL-2 según lo indicado en la etiqueta (por ejemplo, 400 UI/ml). A continuación, se somete el concentrado a una segunda microfiltración (filtro de 0,22 micrómetros), se dispensa en condiciones asépticas en viales esterilizados para suero y se etiqueta según su contenido de IL-2. Se mide la potencia del producto mediante la incorporación de timidina radiomarcada por una línea de linfocitos T citotóxicos (CTLL-2). El agente inyectable final es ensaya además mediante el método ELISA para determinar la presencia de cinco citocinas marcadoras: IL-2, IL-1 β , GM-CSF, IFN- γ y TNF- α .

15 Definiciones

IL-2 - interleucina 2 (IL-2): una glicoproteína de 15,5 kD sintetizada por los linfocitos T auxiliares CD4+ (anteriormente conocida como factor de crecimiento de linfocitos T). La IL-2 tiene un efecto autocrino que actúa sobre los linfocitos T CD4+ que la producen y en otras células del sistema inmune (incluyendo los linfocitos B, linfocitos T CD8+, linfocitos NK [citolíticos naturales] y otras).

IL-1 β - interleucina 1 β (IL-1 β): una citocina de 17-kD sintetizada por fagocitos mononucleares activados que se encuentra en forma libre en la circulación y actúa de mediadora de las respuestas inflamatorias. Actúa sobre los linfocitos T CD4+ para facilitar su proliferación, así como sobre los linfocitos B como factor de crecimiento y diferenciación. También produce la síntesis de la IL-6 por los fagocitos mononucleares.

TNF- α - factor de necrosis tumoral α (TNF- α): una proteína de 157 restos de aminoácido (aa) sintetizada por monocitos y macrófagos estimulados, linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK, entre otros, que se encuentra en la circulación en forma trimérica. El TNF media la acción directa antitumoral, provocando la lisis de las células tumorales; facilita la aglomeración de leucocitos, generando la angiogénesis y potencia la proliferación de los fibroblastos.

IFN- γ - interferón γ (IFN- γ): un homodímero glicoproteico de 21-24 kD sintetizado por los linfocitos T y los linfocitos NK activados, que es un potente activador de los monocitos y aumenta la capacidad de los monocitos para destruir los microorganismos intracelulares y las células tumorales. Tiene una actividad antiviral y antiproliferativa directa y hace que muchos tipos de células expresen el complejo molecular de la superficie celular MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II, a la vez que aumenta la expresión del MHC de clase I.

GM-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF): una proteína de 127 aa que se encuentra en forma de monómero en la circulación, que es producida por macrófagos y linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. Es un factor de crecimiento para las células hematopoyéticas y estimula el crecimiento y la diferenciación del linaje mielomonocítico.

IL-3 - interleucina 3 (IL-3): una linfocina de 20 kD sintetizada por los linfocitos T auxiliares CD4+ activados, que actúa como factor de estimulación de colonias, facilitando la proliferación de algunas células hematopoyéticas y potenciando la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T.

IL-6 - interleucina - 6 (IL-6): una citocina de 26 kD producida por los linfocitos T activados, los fagocitos mononucleares, las células endoteliales y los fibroblastos. Actúa sobre muchas células, pero tiene una función especial en permitir que los linfocitos B activados se puedan diferenciar en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, e induce a los hepatocitos a formar proteínas de fase aguda (implicadas en las respuestas inflamatorias), así como fibrinógeno.

IL-8 - interleucina 8 (IL-8): una proteína de 8 kD producida por los macrófagos y las células endoteliales. Es un poderoso factor quimiotáctico para los neutrófilos y los linfocitos T y facilita la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales.

IL-1 α - interleucina 1 α (IL-1 α): una citocina de 17 kD (como la IL-1 β) escindida de una molécula precursora de 33 kD, sintetizada por fagocitos mononucleares activados, que no suele encontrarse en forma libre en la circulación y que actúa como una sustancia asociada a la membrana. Ayuda a IL-1 β en la mediación de las respuestas inflamatorias.

IL-10 - interleucina 10 (IL-10): un polipéptido de 18 kD producido por los linfocitos T CD4+ y CD8+, los monocitos, los macrófagos, los linfocitos B activados y los queratinocitos. Inhibe la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos, particularmente, ante las células de tipo T_H1 y de secretar IL-6 y TNF.

IL-16 - interleucina 16 (IL-16): una proteína tetramérica de 14 kD producida por linfocitos T CD8+, eosinófilos, mastocitos y células epiteliales respiratorias. Tiene potentes propiedades quimiotácticas para los linfocitos T CD4+ y los monocitos.

5 G-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF): una glicoproteína homodímera de 22-25 kD producida por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células estromales. Aumenta las células progenitoras de granulocitos de la médula y mantiene el aumento de los neutrófilos en sangre. También aumenta la capacidad de los neutrófilos de presentar una mejor producción de superóxido, que se cree que es importante en la destrucción de células infectadas por microbios y de células tumorales.

10 TNF- β - factor de necrosis tumoral β (TNF- β): una proteína de 25 kD producida por linfocitos activados. Puede destruir las células tumorales en cultivo y estimula la proliferación de los fibroblastos. Además, imita la mayoría del resto de acciones del TNF- α .

15 MIP-1 α - proteína inflamatoria de macrófagos - 1 α (MIP-1 α): una proteína monomérica de 66 aa producida por macrófagos y otras células. Es quimiotáctica para los monocitos, los linfocitos T y los eosinófilos.

RANTES - una proteína de 8 kD producida por los linfocitos T, que es quimiotáctica para los monocitos, los linfocitos T y los eosinófilos y potencia la inflamación.

20 EGF - factor de crecimiento epidérmico (EGF): un polipéptido trisulfatado de 53 restos de aa. El EGF es un miembro de la familia de las tirosina quinasas y tiene múltiples funciones, entre las que se incluye la estimulación de la respuesta mitogénica y la ayuda en la cicatrización de heridas.

25 PGE₂ - prostaglandina E₂ (PGE₂): La PGE₂ pertenece a una familia de lípidos biológicamente activos que se obtienen del ácido araquidónico mediante la reacción enzimática de la ciclooxigenasa. Es liberada por los monocitos activados y bloquea la expresión de MHC de clase II en los linfocitos T y los macrófagos.

30 TxB₂ - tromboxano B₂ (TxB₂): El TxB₂ es un miembro de los compuestos biológicamente activos que se obtienen de los ácidos grasos poliinsaturados mediante la isomerización de la prostaglandina y la endoperoxidasa PGH₂ a través de la enzima tromboxano sintetasa. El TxB₂ tiene un papel fisiológico en las enfermedades tromboembólicas y en las reacciones anafilácticas.

35 Células CD25+ - CD25 es una glicoproteína monocatenaria, a menudo denominada cadena α del receptor de la interleucina-2- (IL-2R) o el antígeno Tac, que tiene un peso en moles de 55 kDa y está presente en los linfocitos T y B activados y en los macrófagos activados. Funciona como un receptor para IL2. Junto con la cadena β del IL-2R, el antígeno CD25 forma un complejo receptor de alta afinidad para la IL-2.

40 CTLL-2 (línea celular) - Una línea de linfocitos T citotóxicos de ratón obtenida de ratones C57BL/6. Esta línea de linfocitos T depende de una fuente exógena de IL-2 para el crecimiento y la proliferación.

45 Fas - FasL - El sistema de ligandos Fas/Fas. La combinación de un antígeno Fas, una proteína transmembrana de la superficie celular que media la apoptosis y una citoquina activada por Fas complementaria en un neutrófilo que transduce una señal apoptótica en las células. Fas es una proteína de membrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y FasL es un miembro de la familia de TNF. El ligando FAS es una proteína unida a la membrana de 31 kDa [kilo Dalton] (278 aminoácidos). El sistema de ligandos Fas-Fas desempeña un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo la eliminación de las células linfoides autorreactivas. El ligando Fas se expresa predominantemente en los linfocitos T activados y es una de las principales moléculas efectoras de los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos citolíticos naturales.

50 Linfocitos HLA-DR⁺ - Linfocitos que contienen antígenos leucocitarios humanos (HLA) -DR, un grupo de glicoproteínas polimórficas determinadas por una secuencia pegamento que se encuentra en un loci de leucocito ubicado en el cromosoma 6, el principal loci de histocompatibilidad de los seres humanos.

55 UI (unidades internacionales) - una unidad de medida de la potencia de los preparados biológicos mediante la comparación con respecto a una norma de referencia internacional con un peso y fuerza específicos, por ejemplo, la primera norma internacional de la OMS para la IL-2 humana, 86/504. Las unidades internacionales son el único método reconocido y normalizado para informar de las unidades de actividad biológica que se publican y proceden de un esfuerzo de colaboración en investigación internacional.

60 U (unidades como medida de la actividad biológica) - abreviatura para una variedad de lo que se denomina "unidades", que cada laboratorio considera una referencia y que, además, son únicas para el laboratorio en el que se esté realizando el trabajo. Cada "unidad" es diferente de un laboratorio a otro y no es una norma reconocida a nivel mundial tal como las unidades internacionales (UI).

65

Infiltrado mononuclear- Presencia de monocitos, células plasmáticas y linfocitos en tejido en el que "normalmente" no estarían presentes; o presencia de estas células en grandes cantidades o abundancia en grupos en los que, de otro modo, solo estarían presentes en una pequeña cantidad.

5 Cadena ξ del TCR- Cadena ξ del receptor de los linfocitos T. La subunidad ξ es parte del complejo TCR y se dirige a la interacción del receptor de superficie celular TCR con su ligando (antígeno). La subunidad ξ que se extiende en el citoplasma celular (citosol) se fosforila en sus restos de tirosina tras la activación de los linfocitos T y está implicada en la transducción de señales tras la ligadura del TCR.

10 TIL (linfocitos infiltrantes de tumores) - Linfocitos T aislados del tumor en el que se están infiltrando. Los linfocitos infiltrantes de tumores tienen poca o ninguna citotoxicidad. Los TIL incluyen linfocitos T predominantemente CD4+ y CD8+ y se pueden expandir *in vitro* mediante el cultivo en presencia de IL-2. Estas células son activadas por el tratamiento con IL-2 y, con frecuencia, son más agresivas hacia el tumor del que se aislaron que las células activadas por linfocinas normales. La actividad citotóxica de los TIL se puede mejorar con IFN- γ . La actividad antitumoral de los TIL *in vivo* puede ser bloqueada por TGF- β .

ZAP 70 - Una proteína asociada a ξ de 70 kD, asociada con la cadena ξ del TCR, que es una tirosina quinasa presente en el citosol. Se cree que ZAP 70 participa en el mantenimiento de la señalización del receptor de linfocitos T, la mediación de la transducción de señales que finalmente produce IL-2. El gen ZAP70 se expresa en los linfocitos T y los linfocitos citolíticos naturales y se mapea en el cromosoma humano 2q12.

25 Cadena ξ (Zeta) - Véase la Cadena ξ del TCR- El gen de la cadena ξ se encuentra en el cromosoma 1 de los seres humanos. El dominio extracelular de esta proteína tiene nueve aminoácidos de longitud, mientras que el dominio transmembrana contiene un resto de ácido aspártico cargado negativamente y el dominio citoplasmático es de 113 aminoácidos de longitud. La cola citoplasmática contiene tres de los motivos de reconocimiento de antígenos que se encuentran en las colas citoplasmáticas de las cadenas CD3. La cadena ξ también está asociada con otros receptores tales como el receptor γ de Fc (fragmento, cristalino) de los linfocitos NK.

30 USP - Monografías de la farmacopea estadounidense.

P - "p < 0,01": un término matemático de estadística que indica el nivel de probabilidad de que se produzca un acontecimiento es condiciones predeterminadas.

35 ANOVA (análisis de varianzas) - un análisis monofactorial descrito en los libros de texto de Estadística y Matemáticas, por ejemplo, "Handbook of Statistical Methods for Engineers and Scientists", Harrison M. Wadsworth, Jr., ed., McGraw Hill 1990 y "Statistical Operations Analysis of Health Research Data", Robert P. Hirsch y Richard K. Riegelman, eds. Blackwell Science Inc., 1996.

40 Modo de acción y caracterización de la LI

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) es una mezcla inmunomoduladora, mínimamente tóxica, biológicamente activa de citocinas humanas obtenidas de manera natural y de origen natural producidas en condiciones determinadas como se describe en el presente documento. La LI se puede usar como tratamiento anticancerígeno y antiviral o como una terapia neoadyuvante con una aplicación de amplio espectro para el cáncer, las enfermedades infecciosas y otros estados patológicos que responden a la inmunomodulación.

Los estudios realizados en animales demuestran que las "interleucinas mixtas" tienen una actividad inmunomoduladora e inmunoestimuladora *in vitro* (Hadden *et al.*, "Mixed Interleukins and Thymosin Fraction V Synergistically Induce T Lymphocyte Development in Hydrocortisone-Treated Aged Mice", *Cell. Immunol.* 144:228-236 (1992)). Sin quedar vinculados a teoría alguna, se ha propuesto como hipótesis que la inyección local/regional de "interleucinas mixtas" supera la inmunosupresión local. Posteriormente, se produce una tolerancia de rotura hacia los antígenos tumorales, que permite que se produzca una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz a nivel local. También se sabe que la instilación local de interleucinas en la región del tumor o la transfección real de genes de interleucina en un tumor aumenta notablemente la respuesta inmunitaria antitumoral, produciendo la regresión del tumor, según lo informado por Golumbek *et al.*, "Treatment of Established Renal Cancer by Tumor Cells Engineered to Secrete Interleukin-4", *Science* 254:713-716 (1991).

Sin embargo, la inducción de células malignas en una fase del ciclo celular sin causar la proliferación activa del tumor o el efecto de alterar la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado de células mononucleares en un tumor de LI no se conocía previamente para las composiciones que tienen las siguientes proporciones específicas de citocina con respecto a interleucina 2 (IL-2): IL-1 β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 a 1,5 y preferentemente a 0,7 \pm 0,1 (IL-1 β /IL-2), TNF- α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 a 10,9 y preferentemente a 9,5 \pm 1,8 (TNF- α /IL-2), IFN- γ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 a 10,9 y preferentemente a 6,0 \pm 1,1 (IFN- γ /IL-2) y GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 a 4,8 y preferentemente a 4,0 \pm 0,5 (GM-CSF/IL-2) y que tienen además diferentes citocinas y otras moléculas pequeñas

biológicamente activas, en las que la proporción de cada una de las moléculas pequeñas biológicamente activas con respecto a la IL-2 es la siguiente: IL-3 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,38 a 0,68, preferentemente a $0,53 \pm 0,15$, IL-6 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 37,2 a 53,8, preferentemente a $46 \pm 5,9$, IL-8 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 261 a 561,5, preferentemente a $411 \pm 10,6$, IL-1 α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,56 a 0,94, preferentemente a $0,75 \pm 0,19$, IL-10 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,82 a 3,22, preferentemente a $3,0 \pm 0,18$, IL-16 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,16 a 2,84, preferentemente a $1,84 \pm 0,68$, G-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,16 a 3,78, preferentemente a $2,97 \pm 0,81$, TNF- β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,17 a 2,43, preferentemente a $1,8 \pm 0,63$, MIP-1 α con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 15,7 a 37,16, preferentemente a $22,7 \pm 7,0$, MIP-1 β con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 17,1 a 28,5, preferentemente a $22,8 \pm 5,7$, RANTES con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,3 a 2,7, preferentemente a $2,5 \pm 0,13$, un EGF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,267 a 0,283, preferentemente a $0,275 \pm 0,008$, PGE₂ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,63 a 5,42, preferentemente a $4,5 \pm 0,87$ y TxB₂ con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 23,47 a 25,13, preferentemente a $24,3 \pm 0,83$, tal como la inyección de interleucina leucocitaria (LI).

La administración de LI antes de la cirugía conduce a un aumento del número de células tumorales en la fase del ciclo celular sin aumentar el riesgo de un tumor de crecimiento más rápido y de recurrencia más rápida como hubiera cabido esperar de la técnica. La LI también modifica la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado de células mononucleares en un tumor. La capacidad de inducir las células tumorales al ciclo celular es única de la LI y se puede deber al efecto sinérgico de las diferentes citocinas presentes en este fármaco en investigación y al efecto diferencial de estas citocinas tanto en el sistema inmunológico del hospedador como en las células tumorales. También se observa un cambio de paradigma a partir de la administración dependiente de la dosis de LI que altera la proporción de CD4/CD8 y el infiltrado celular mononuclear en un tumor.

Pacientes

En las Tablas 1 y 2, se proporciona la información relativa al grupo de pacientes tratados con inyección de interleucina leucocitaria y al grupo de control. En las Tablas 1 y 2 se presenta sitio primario del tumor, tanto del grupo tratado como del grupo de control, respectivamente. Se incluyen cuarenta y un pacientes, pero solo treinta y nueve son evaluables. Estas muestras de control se hacen coincidir con un grupo tratado basado en el tamaño del tumor, el sitio de tumor, el estadio del tumor, el sexo y la edad del paciente.

Tabla 1

Grupo tratado con inyección de interleucina leucocitaria: Información de los pacientes			
Nº de paciente	Sexo	Edad (años)	Ubicación del tumor
1	mujer	65	<i>Radix linguae</i>
2	varón	40	Lengua
3	varón	51	Gingival
4	varón	73	Suelo (boca)
5	varón	66	Labio
6	varón	54	Suelo (boca)
7	mujer	59	Suelo (boca)
8	varón	72	Suelo (boca)
9	varón	60	Suelo (boca)
10	varón	59	Lengua
11	mujer	54	Suelo (boca)
12	mujer	57	Boca
13	mujer	87	Suelo (boca)
14	varón	54	Orofaringe
15	varón	48	Suelo (boca)

16	varón	60	Lengua
17	varón	54	Suelo (boca)
18	varón	57	Suelo (boca)
19	varón	59	Suelo (boca)

Tabla 2

Datos de los pacientes, grupos de control: información de los pacientes			
Paciente Nº	Sexo	Edad (años)	Ubicación del tumor
1	mujer	65	Suelo (boca)
2	varón	52	Lengua
3	varón	52	Lengua
4	varón	57	<i>Radix linguae</i>
5	varón	40	Lengua
6	varón	59	Lengua
7	varón	43	Suelo (boca)
8	varón	53	<i>Radix linguae</i>
9	varón	45	Lengua
10	mujer	50	Lengua
11	varón	66	Labio
12	varón	75	Labio
13	varón	67	Labio
14	varón	55	Lengua
15	varón	58	<i>Radix linguae</i>
16	mujer	53	Lengua
17	varón	46	Lengua
18	varón	75	Labio
19	varón	77	Labio
20	varón	61	Suelo (boca)

Criterios de inclusión

5 Se incluyen veintiún pacientes con cáncer de cabeza y cuello no tratado previamente (carcinoma oral de células escamosas, COCE) en un grupo de tratamiento con LI. Los criterios de inclusión son edad de 18 años o superior que tienen carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, confirmado histológicamente sin enfermedad metastásica conocida y con una esperanza de vida superior a 6 meses, que no han sido tratados previamente para el COCE o mediante ninguna otra inmunoterapia. Se excluyeron las pacientes embarazadas que habían sido radiadas previamente en el sitio de la administración de la LI, los que presentaban úlcera duodenal o gástrica, o los

10 pacientes asmáticos.

Pacientes evaluables

15 Se selecciona un total de cuarenta y un pacientes, siendo treinta y nueve de ellos evaluables. Un grupo tratado con LI consiste en 21 pacientes, siendo 19 pacientes evaluables. Se confirma posteriormente que dos de los pacientes del grupo tratado con LI tienen (1) carcinoma anaplásico de la úvula y (2) adenocarcinoma en el suelo de la boca. Estos dos pacientes reciben el ciclo completo de tratamiento que incluye la administración del fármaco en

20 investigación, pero no se les incluye en el análisis histopatológico/inmunohistoquímico, por no cumplir los criterios de tener el carcinoma de las células escamosas en la cavidad oral. El grupo de control consistía en 20 pacientes con

carcinoma de células escamosas oral confirmado por biopsia, con los tumores ubicados en las mismas zonas de la cavidad oral y el tamaño del tumor y el estadio de la enfermedad similares a los del grupo tratado con el fármaco en investigación (LI).

5 Protocolo de tratamiento

Se realiza la administración de la inyección de interleucina leucocitaria (LI) de la siguiente manera: se inyecta peritumoralmente una mitad (400 UI) de la dosis diaria total (800 UI/ml, como IL-2) (1/4 de la dosis peritumoral [aproximadamente 100 UI] en cada uno de cuatro sitios alrededor de la masa tumoral) y una mitad (400 UI, como IL-2) de la dosis diaria total se administra perilinfáticamente ipsilateral al sitio del tumor (secuencialmente y en la misma visita) durante un período de tres semanas, 5 veces a la semana durante tres semanas. La LI se administra por vía intradérmica en los márgenes circunferenciales de la masa tumoral visible/palpable. Las inyecciones perilinfáticas se dan en la zona mandibular posterior, en la zona de la cadena linfática yugular ipsilateral a la masa tumoral inyectada.

Se administra una sola infusión intravenosa de ciclofosfamida en inyección, 300 mg/m², tres días antes de la primera administración de LI. La indometacina (25 mg) se autoadministra por vía oral (con alimentos) tres veces al día para alcanzar una dosis diaria total de 75 mg, comenzando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía. Se autoadministran sulfato de cinc (50 mg, como cinc elemental) y un suplemento multivitamínico una vez al día, empezando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía.

Todos los pacientes (tratados con LI y control) se someten a cirugía a las 1-2 semanas después de la última dosis de LI seguida de radioterapia en 1-4 semanas después de la cirugía. El pretratamiento de LI no afectó negativamente a la cicatrización de las heridas en esta población de pacientes.

25 Examen de los pacientes

Antes de la inclusión en el ensayo, los pacientes son sometidos a una evaluación general. También se revisa su historial médico. Una vez incluidos, se realizó un examen físico completo, análisis hematológico, análisis químico sanguíneo, cardiografía de tórax y electrocardiograma. Cuando es posible, se obtiene una imagen de la zona del tumor primario para obtener una imagen inicial. Todos los pacientes tienen una medición bidimensional inicial de su tumor primario, mediante la medición de los dos diámetros perpendiculares principales. Los pacientes son entrevistados en cada visita posterior y se les pregunta sobre la calidad de vida (por ejemplo, nivel de dolor, grado de movilidad de la lengua, etc.) mediante un cuestionario autorizado. El médico responsable evaluó la toxicidad en cada visita.

Inyección de interleucina leucocitaria (LI)

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) se prepara a partir de células mononucleares humanas de sangre periférica obtenidas de la Cruz Roja estadounidense tras superar todas las pruebas obligatorias de la FDA de la sangre para transfusión cultivada con mitógenos. No se permiten personas que no hayan donado nunca. A continuación, se recoge el sobrenadante del cultivo exento de suero en condiciones asépticas, se aclara, se somete a un proceso comercial de exclusión de virus, se concentra y se microfiltra. Se añade al concentrado albúmina sérica humana inyectable, USP y se tampona la solución resultante hasta un pH fisiológico, se lleva hasta una concentración de IL-2 diana y se somete a una segunda microfiltración. Se dispensa la solución del fármaco formulado en condiciones asépticas en viales estériles de suero y se etiqueta según su contenido de IL-2. Se mide la potencia del producto mediante la incorporación de timidina radiomarcada (*in vitro*) mediante el uso de una línea celular de linfocitos T citotóxicos (CTLL-2) dependiente de la IL-2. Se ensaya además el agente inyectable final mediante ELISA para determinar la presencia de cinco citocinas marcadoras: IL-2, IL-1 β , GM-CSF, IFN- γ y TNF- α . La LI se somete además a pruebas de control de calidad para determinar la esterilidad, las endotoxinas bacterianas, el pH y la concentración total de proteínas, así como a otros ensayos físico-químicos.

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) se proporciona congelada en un vial de suero de vidrio de borosilicato que contiene 2,2 ml de fármaco, según lo indicado en la etiqueta, en forma de IL-2 (400 UI/ml) para la administración peritumoral, intratumoral, perilinfática o subcutánea. La LI se somete a pruebas de control de calidad para determinar la identidad, la esterilidad, las endotoxinas bacterianas, el pH y la concentración total de proteínas. Cada vial es analizado para determinar la contaminación de partículas y el aspecto. El preparado tiene un contenido total de proteínas de 3 mg/ml, en el que el material se suministra esterilizado y exento de pirógenos. La LI tiene una fecha de caducidad asignada de 24 meses desde la fecha de fabricación cuando el fármaco se almacena a -20 °C.

60 Ciclofosfamida

La inyección, USP, de ciclofosfamida (Bristol-Myers-Squibb, RU) se suministra en forma de un polvo estéril que contiene 45 mg de cloruro sódico, 75 mg de manitol o aproximadamente 82 mg de bicarbonato de sodio por 100 mg de ciclofosfamida para la reconstitución antes de la infusión intravenosa.

Indometacina

La indometacina, USP (Sanofi - Synthelabo, Francia), se suministra en forma de comprimidos de 25 mg para la autoadministración oral con alimentos.

5

Sulfato de cinc y multivitaminas

El sulfato de cinc (50 mg como cinc elemental, R. P. Scherer Corporation, Clearwater, Florida, EE.UU.) y las multivitaminas de venta libre son suministrados por la clínica para la autoadministración de cada paciente.

10

Patología

Un único protocolo de patología describe la preparación y la fijación de las muestras extirpadas quirúrgicamente y los procedimientos de examen general, macroscópico y microscópico, de histología e inmunohistoquímica, según lo descrito en el presente documento. El diagnóstico de las lesiones orales se determina en la biopsia de la escisión de la lesión sospechada. El cáncer se clasifica como T2-3N0-2M0. Solo se seleccionan para la inmunoterapia los pacientes T2-3N0-2M0 que cumplen el resto de criterios de inclusión. La respuesta tumoral determinada mediante mediciones bi/tridimensionales se evalúa al final del régimen de tratamiento con LI y antes de la programación de los pacientes para la resección del tumor. Se dispone el tejido extirpado en recipientes previamente marcados con formalina tamponada con solución salina, se fijan durante la noche antes de la introducción en parafina y la preparación de los portaobjetos de secciones finas para la tinción con hematoxilina-eosina (H & E), la inmunohistoquímica y la evaluación de la patología de la respuesta tumoral.

15

20

Histología

Se realizan análisis histopatológicos en 3 regiones tumorales diferentes: superficie (Zona 1), centro (Zona 2) y superficie de contacto del tumor y el estroma (zona 3). Se determinan la histología y la clasificación AJCC y la aparición de células tumorales necróticas de cortes teñidos con HE. Se determina el porcentaje de componente epitelial del tumor frente al estroma en los tumores mediante dos métodos: (1) tejido conjuntivo teñido de acuerdo con Mallory (tinción de tricomas) y (2) medición en los portaobjetos de la superficie de los nidos cancerosos (epitelios tumores) con el programa informático de análisis ImagePro (MediaCibernetics, Silver Spring, MD). Los portaobjetos que contienen tejido extirpado se marcan para la citoqueratina usando anticuerpo de pancitoqueratina de DAKO (Glostrup, Dinamarca) (A1A3 + CK19), que marcan las células cancerosas. Los portaobjetos se examinan microscópicamente y se analizan usando el programa informático de análisis ImagePro.

25

30

35

Caracterización del infiltrado de células mononucleares

Las células mononucleares presentes en las inmediaciones de los nidos de células tumorales se determinan mediante técnicas de inmunohistoquímica (de cortes de parafina). Se desparafinan los cortes y se tratan con microondas para recuperar la antigenicidad. Solo se usan anticuerpos comerciales, que han demostrado previamente teñir de manera constante los cortes de parafina desparafinados. Los neutrófilos se marcan usando el anticuerpo contra la mieloperoxidasa (monoclonal de ratón de DAKO), las células madre hematopoyéticas se marcan con anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 (DAKO), la población de células de macrófagos se identifica por la expresión del antígeno CD68 (anti-CD68 monoclonal de ratón, DAKO), las células dendríticas se identifican por la expresión de marcador CD1a (anti-CD1a monoclonal de ratón, Immunotech, París, Francia). Las células linfoides se identifican por la expresión del antígeno LCA (anti-CD45 monoclonal de ratón, DAKO). Los linfocitos T se identifican por el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (DAKO). Los linfocitos T citotóxicos se identifican por la expresión de CD8 por el anticuerpo de linfocitos T citotóxicos anti-CD-8, DAKO. Los linfocitos T CD4 efectores se identifican usando anticuerpo de linfocitos T anti-CD4+ (Novocastra, Newcastle upon Tyne, RU). Los linfocitos NK se identifican usando anticuerpo anti-CD56 y anti-CD57 monoclonal de ratón de antígeno CD56/CD57 de Novocastra. En todos los casos, se preparan y se evalúan portaobjetos de control positivo y negativo del anticuerpo apropiado (anticuerpo de un mismo isotipo). Las células que expresan IL-2R, de los epitelios y el estroma tumorales se identifican usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra IL-2R, CD25 (Novocastra). En todos los casos, se preparan portaobjetos de control negativo usando anticuerpos monoclonales de un mismo isotipo no específicos de la diana de interés.

40

45

50

55

Todo el marcaje inmunohistoquímico (IHC) se realiza con el kit LSAB-2 de DAKO usando un enlazador de IgG anti-ratón/anti-conejo biotinilado y estreptavidina-HRP para revelar los anticuerpos unidos específicamente. El cromógeno usado es marcador AEC (rojo). Los cortes se contratiñeron para determinar los núcleos usando hematoxilina.

60

Técnica de puntos calientes

La densidad de las células mononucleares se determina basándose en la técnica de "puntos calientes". Cada densidad de superficie tumoral estudiada se mide en la región de la densidad más alta de células mononucleares de infiltración tumoral. Este método reduce al mínimo la heterogeneidad extrema de los infiltrados celulares en los

65

tejidos.

Evaluación de la patología

5 Se evalúan las biopsias de los tumores del grupo tratado con LI y del grupo de control mediante tinción con HE usando el aspecto microscópico del tumor. También se realiza el marcaje de CD3, CD4, CDB y CD1a, siempre que el tamaño de la muestra permita la realización de los 5 procedimientos de marcaje. Se emplea el programa analítico completo para el grupo de control y el grupo tratado con LI. Para seleccionar los portaobjetos que se van a visualizar, se usa un aumento x30. Durante el análisis histológico, se usa un aumento x100. La evaluación patológica e histológica y las mediciones morfométricas de los cortes de tejido son realizadas por 3 patólogos independientes (JT, LCR y BD) en un estudio con ocultación. Como es conocido en la técnica, se puede usar otra evaluación patológica e histológica.

15 Análisis estadístico

Los datos de patología se analizan mediante ANOVA, análisis monofactorial y los valores de " p " < 0,05 (a α = 0,05) se consideran estadísticamente significativos.

20 Evaluación histológica

25 El diagnóstico histológico, las puntuaciones de Brodes y el estadio de TNM (metástasis de los nódulos tumorales) de todos los pacientes del grupo tratado con LI (19) y del grupo de control (20) se enumeran en las Tablas 3 y 4. Como se muestra en las Tablas 3 y 4, el grupo tratado con LI y el grupo de control no difieren histológicamente, ni con respecto a la queratinización (puntuaciones de Brodes) ni los estadios de TNM (Odell *et al.*, "The Prognostic Value of Individual Histologic Grading Parameters in Small Lingual Squamous Cell Carcinomas; The Importance of the Pattern of Invasion.", *Cancer* 74: 789 (1994)). Esto es confirmado por los patrones de inmunotinción con citoqueratina, que muestran una expresión altamente heterogénea de CK-19 y pan-CK en los tumores de ambos grupos.

30 Tabla 3

Histología, grupo de control				
Nº de paciente	Dg	Grado	pTNM	Tipo de necrosis
1	cc.espinocel.	BR3	PT2N0	-
2	CPC	BR2	PT2N0	+ macroscópico
3	CPC	BR3	PT2N1	-
4	CPC	BR3	PT2N0	+ unicelular
5	CPC	BR2	PT2N0	-
6	CPC	BR3	PT2N2	+ macroscópico
7	CPC	BR2	PT2N0	-
8	CPC	BR3	PT3N0	+ macroscópico
9	CPC	BR3	PT2N0	-
10	CPC	BR3	PT2N0	-
11	CPC	BR1	PT2N0	+ micro-centr
12	CPC	BR1	PT2N0	-
13	CPC	BR1	PT3N0	-
14	CPC	BR3	PT2N0	-
15	CPC	BR1	PT2N0	+ macroscópico
16	CPC	BR3	PT3N0	-
17	CPC	BR1	PT2N0	+centr-micr
18	CPC	BR2	PT2N0	-
19	CPC	BR1	PT2N0	-

20	CPC	BR1	PT2N0	+unicelular
----	-----	-----	-------	-------------

Tabla 4

Histología y patología; Grupo tratado con inyección de interleucina leucocitaria					
Nº de paciente	Dg	Grado	pTNM	Respuesta clínica [*]	Tipo de necrosis
1	CPC	BR3	T2N0M0		Mi, Multifocal
2	CPC	BR1	T2N0M0		No
3	CPC basaloide	BR3	T2N0M0		Mi, multifocal
4	CPC	BR3	T2N0M0	MR (40 %)	Mi Multifocal
5	<u>Estroma fibroso</u>			CR (100 %)	No
6	CPC	BR3	T3N0M0	MR (35 %)	No,
7	CPC	BR2	T1N0M0	PR (66 %)	Mi Multifocal
8	CPC	BR2	T2N0M0		No
9	CPC	BR2	T2N0M0	MR (30 %)	No,
10	CPC	BR2	T2N0M0		Mi, Multifocal
11	CPC	BR2	T2N0M0		Mi, Multifocal
12	CPC	BR3	T2N2M0	MR (35 %)	Mi, multifocal
13	CPC	BR3	T2N1M0		No
14	Displasia			CR (100 %)	No
15	CPC	BR3	T2N0M0		No
16	CPC	BR2	T2N0M0		Mi, multifocal
17	CPC	BR1	T2N0M0		Mi, Necrosis
18	CPC	BR1	T2N0M0	PR (61 %)	No
19	CPC	BR1	T2N0M0		Mi, multifocal
*Determinada por patología (Therasse <i>et al.</i> "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors", <i>J Nat Can Inst</i> 92 (2000).					

- 5 Dos de los diecinueve pacientes tratados con LI no tienen tejido canceroso en el tumor extirpado. Se considera que estos dos pacientes responden clínicamente de manera completa a la LI, presentando cada uno una reducción del 100 % del tumor como se muestra en la Tabla 4. Otros dos casos tienen una reducción del volumen del tumor verificado histológicamente superior al 50 % y se considera que tienen una respuesta parcial (importante). Cuatro pacientes más tienen una reducción del volumen superior al 30 %, pero inferior al 50 % y se considera que tienen una respuesta menor. La tasa de respuesta objetiva del grupo tratado con LI en este ensayo es del 21 % con una respuesta global medida en ocho de los diecinueve paciente o del 42 % según lo determinado por la patología mostrada en las Tablas 4 y 5.
- 10

Tabla 5

Clasificación de la patología de las categorías de cáncer (respuesta al tratamiento)*		
Clasificación	Volumen del tumor/reducción de la superficie	Categoría de la respuesta
I	< 30 %	Sin respuesta
II	> 30 - 49 %	Respuesta menor
III	> 50-99 %	Respuesta importante (respuesta parcial)
IV	100 %	Respuesta completa
*Determinada por patología (Therasse <i>et al.</i> "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors", <i>J Nat Can Inst</i> 92 (2000).		

Linfocitos de infiltración tumoral

En el infiltrado de células linfoides del COCE predominan los linfocitos T, especialmente en el estroma tumoral. En el grupo de control (no tratado con LI), el número de linfocitos T CD8+ que se infiltraron en el tumor y en el estroma superó (2:1) al número de linfocitos T CD4+, como se muestra en la Fig. 1. Como resultado de ello, la proporción de CD4/CD8 en el control (no tratado con LI) está muy por debajo de 1 (a aproximadamente 0,5) en todas las zonas tumorales estudiadas (superficie [R1], centro de [R2] y superficie de contacto de tumor y estroma [R3]), como se muestra en la Fig. 2. Por otro lado, el tratamiento con LI induce un aumento significativo ($p < 0,05$) en la densidad y en el número de los linfocitos T CD4+ (Fig. 2) y una reducción significativa ($p < 0,05$) en la densidad de los linfocitos T CD8+, tanto en el estroma como en los nidos tumorales epiteliales (Fig. 2). Esta tendencia se mantiene cuando se aplica el mismo análisis solo al grupo que responde al tratamiento (Fig. 1 y 3). Por consiguiente, el tratamiento con LI provocó un cambio notable de una proporción de CD4/CD8 baja (<1) a una proporción de CD4/CD8 alta ($> 2,5-3,5$) en la composición del infiltrado celular del tumor de COCE (Fig. 2 y 3).

No se encuentran células mononucleares CD34+ ni linfocitos NK CD56+ en el estroma ni en los nidos epiteliales tumorales con independencia de la zona del tumor o de la población de pacientes investigada. Se ha informado de hallazgos similares en pacientes de COCE tratados con LI y de control.

Las células dendríticas presentadoras de antígenos (CD1a+) se encuentran casi exclusivamente en los nidos epiteliales tumorales y son más abundantes en la superficie de contacto entre el tumor y el estroma en el grupo tratado con LI. Se observa un efecto diferencial del tratamiento con LI sobre la distribución de las células dendríticas (CD1a+) en las 3 zonas examinadas (superficie [R1], centro de [R2] y superficie de contacto de tumor y estroma [R3]). En particular, no se observa ningún cambio en el centro del tumor; se detecta una disminución de las células dendríticas CD1a+ en la superficie del tumor y hay un aumento presente en la superficie de contacto de tumor y estroma como se muestra en la Fig. 4. Hay un cambio más pronunciado desde la superficie del tumor hacia la superficie de contacto de tumor y estroma de las células dendríticas CD1a+ en el análisis del subgrupo de pacientes que responden clínicamente, como se muestra en la Fig. 4. Las dos pacientes que tienen una respuesta completa no tienen tejido tumoral observable que descarte el análisis inmunohistoquímico.

Células inflamatorias

Se determina la presencia de infiltrado de neutrófilos y de macrófagos en las muestras de tumores extraídas mediante la tinción con mieloperoxidasa (MPX) y los marcadores CD68, respectivamente. Se realiza la morfometría de las 3 regiones de los tumores (superficie [R1], centro [R2] y superficie de contacto de estroma y tumor [R3]).

El análisis de la densidad de macrófagos indica que el tratamiento con LI no varía la presencia en el estroma de macrófagos CD68+, pero reduce significativamente ($p < 0,002$) a nivel intraepitelial como se muestra en la Fig. 5.

El tratamiento con LI aumenta significativamente ($p < 0,005$) la densidad intraepitelial de los neutrófilos con independencia de la zona (R1, R2 o R3) analizada como se muestra en la Fig. 6.

Necrosis tumoral

El aspecto histológico de las necrosis muestra una diferencia notable entre el grupo tratado con LI y el grupo de control, como se muestra en la Fig. 7. La necrosis microscópica multifocal es notablemente más frecuente en el grupo tratado con LI (10/17 de los pacientes tratados) frente al grupo de control (4/20 pacientes de control), como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Incidencia de la necrosis en muestras tumorales de COCE		
Forma de la necrosis	CONTROL	Inyección de interleucina leucocitaria
No	12/20	7/17
Multifocal/microscópica	4/20	10/17
Macroscópica	4/20	0/17

Proporción de estroma tumoral/nido canceroso

El porcentaje del nido de células cancerosas con respecto al estroma tumoral muestra el efecto selectivo del tratamiento con LI en los nidos cancerosos. Las muestras de tejido extraídas teñidas con la técnica tricrómica de Mallory que tenían nidos cancerosos se tiñeron de color rosa y la proporción de nido epitelial del tejido tumoral se determina mediante morfometría usando el programa informático ImagePro como se muestra en la Fig. 8. El tratamiento con LI genera una reducción significativa de la proporción de nidos de células cancerosas en el tejido

tumoral ($p < 0,005$, análisis ANOVA monofactorial) en comparación con el control (no tratado con LI).

5 La colagenosis periepitelial tiene una frecuencia similar tanto en los pacientes del grupo de control como en los pacientes tratados con LI, mientras que la fibrosis intraepitelial intersticial es significativamente ($p < 0,01$) más frecuente en el grupo tratado con LI (10/19 o 53 % de los pacientes tratados) frente al grupo de control (2/20 o 10 % de los pacientes del grupo de control) como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Incidencia de la fibrosis en las muestras de tumor COCE		
Fibrosis	CONTROL	Inyección de interleucina leucocitaria
No	8/20	3/19
Periepitelial	10/20	6/19
Estromal	2/20	10/19

10 La inyección de interleucina leucocitaria (LI) administrada a pacientes con COCE primario avanzado como tratamiento de primera línea antes de la terapia convencional induce alteraciones intratumorales en la infiltración de las células inmunes en lugar de las células inflamatorias. La población de linfocitos T migra hacia los nidos cancerosos. Los linfocitos T CD8+ que se infiltran aumentan la expresión de CD25+ al administrar la LI peritumoralmente tres veces a la semana durante un período de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI o, específicamente, a 400 UI o a 800 UI, o incluso cinco veces a la semana en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI o a 400 UI o a 800 UI. Dado que este régimen de tratamiento no da lugar a la necrosis masiva del tejido tumoral al final del régimen de tratamiento de dos semanas, no se produce un cambio notable en la proporción de tejido conjuntivo con respecto al componente epitelial tumoral.

20 Esto contrasta con el método descrito en el presente documento que produce una reducción significativa de la masa tumoral de los pacientes de COCE tratados con LI en comparación con un grupo de control después de un tratamiento previo de tres semanas con LI antes de la cirugía seguida de radioterapia. El método contempla una dosis de tratamiento previo de LI de 800 UI/día como IL-2 durante 5 días a la semana para un total de 3 semanas, induciendo con ello una modulación significativa de las células inmunes infiltrantes. El número de linfocitos T CD8+ (p < 0,05) se reduce con un aumento correspondiente y significativo (p < 0,05) de los linfocitos T CD4+ de infiltración tumoral. Estos cambios conducen a una alteración fundamental de la proporción de CD4/CD8 en el tumor.

30 La baja proporción de CD4/CD8 (<1) observada en el grupo de control no tratado de pacientes con COCE aumentó drásticamente en el estroma y a nivel intraepitelial (proporción de CD4/CD8 de > 2 a > 3,5) como resultado de un tratamiento con LI. Por lo tanto, la dosis alta (definida como: 800 UI/día como IL-2, 5 días/semana, durante 3 semanas) de tratamiento con LI neoadyuvante de pacientes con COCE primario avanzado es un cambio de paradigma notable de un infiltrado de linfocitos T CD4+. En el diagrama esquemático de la activación inmune del hospedador mediante LI de la Fig. 9, se muestra un cambio claro y específico de la densidad y la ubicación de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas) y de las células inflamatorias, especialmente de los neutrófilos, en los nidos cancerosos.

40 También se producen alteraciones complejas del componente celular de infiltración tumoral de la respuesta inmunitaria antitumoral del hospedador tal como la necrosis multifocal de los nidos cancerosos y un aumento en la proporción de tejido conjuntivo detectado en los pacientes de COCE tratados con LI. Estos cambios reflejan las consecuencias de una respuesta inmunitaria antitumoral satisfactoria generada contra el COCE inducida por la administración de LI neoadyuvante.

45 Una respuesta inmunitaria satisfactoria hacia el COCE puede requerir la inversión de la proporción de CD4/CD8 intratumoral baja (<1). El predominio de los linfocitos T CD8+ en el paciente de COCE sin tratamiento previo frente a los linfocitos T CD4+ dentro del tumor y en el estroma circundante se puede ver en muchos otros tumores sólidos y no es específico del COCE. Del mismo modo, se han detectado proporciones de CD4/CD8 bajas en el carcinoma de células basales, el carcinoma de cuello uterino y el cáncer de mama, lo que sugiere un estado inmunodeprimido adquirido del paciente (hospedador) inducido por estos tumores.

50 Las alteraciones histopatológicas inducidas por el tratamiento con LI del infiltrado celular de las células inmunitarias del hospedador en el COCE producen una tasa de respuesta global del 42 % en el grupo de pretratamiento con LI. La tasa de respuesta objetiva es del 21 % con 2 respuestas completas verificadas patológicamente en 19 pacientes tratados con LI evaluables.

55 La comparación histopatológica del grupo tratado con LI con los descritos en el subgrupo de pacientes que responden al tratamiento con LI en la que se observaron regresiones clínicas y de patología en ocho de los diecinueve casos revela que todos los parámetros estudiados desde la composición de las células inmunes hasta la

5 densidad de las células inflamatorias y la histología del tumor residual son muy similares en estos dos subgrupos de
 pacientes tratados con LI. Estos datos sugieren que el grupo tratado con LI respondió de manera relativamente
 homogénea al tratamiento con LI, pero los efectos de la patología contra el cáncer resultantes son diferentes. Una
 explicación plausible de esta discrepancia podría ser la inmunosensibilidad diferencial de los pacientes de COCE
 10 (diferencias en los genes Ir y HLA) y/o el nivel de inmunocompetencia (al inicio del estudio), que resultó en una
 gradación del deterioro de la respuesta inmunitaria funcional en los diferentes pacientes tratados con LI. La falta de
 expresión bien de los antígenos MHC-I, de las moléculas coestimulantes en las células cancerosas diana y su
 expresión del ligando FAS o las anomalías de la cadena ξ de TCR y la sensibilidad apoptótica de los linfocitos T
 15 CD8+ y la presencia de células CD34+ pueden contribuir al deterioro de la respuesta inmunitaria en el COCE (Cruz
et al., "Lack of MHC class I surface expression on neoplastic cells and poor activation of the secretory pathway of
 cytotoxic cells in oral squamous cell carcinomas", *Br J Cancer* 81:881 (1999); Lang *et al.*, "Impairment of T-cell
 activation in head and neck cancer in situ and in vitro", *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125:82 (1999); Lutz *et al.*,
 "Human leukocyte antigen class I expression on squamous cell regulates natural killer cell activity", *Cancer Res*
 59:5793 (1999); Hoffmann *et al.*, "Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck
 20 cancer and its clinical importance", *Clin Cancer Res* 8:2553 (2002); Reichert *et al.*, "The number of intratumoral
 dendritic cells and ξ -chain expression in T cells and prognostic and survival biomarkers in patients with oral
 carcinoma", *Cancer* 91:2136 (2001); Kuss *et al.*, "Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signaling defects
 patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.", *Br J Cancer* 88:223 (2003); Schmidt *et al.*,
 "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34+ cells which
 25 suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", *Clin
 Cancer Res* 1:95 (1999); Rivoltini *et al.*, "In vivo interleukin 2-induced activation of lymphokine-activated killer cells
 and tumor cytotoxic T-cells in cervical lymph nodes of patients with head and neck tumors", *Cancer Res* 50:5551
 (1990); Young *et al.*, "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the
 immune infiltrate of the cancer", *Int J Cancer* 67:333 (1996). Por consiguiente, la dirección exclusiva del sistema
 30 inmune sin un intento simultáneo de modular la sensibilidad de la célula cancerosa diana puede no dar lugar a una
 mejora de la tasa de respuesta global al tratamiento.

El pretratamiento neoadyuvante con LI de pacientes con COCE primario avanzado de acuerdo con las dosis
 35 descritas en el presente documento genera un cambio de paradigma en el tipo de las células inmunes que se
 infiltran en el tumor (predominantemente linfocitos T CD4+ en lugar de linfocitos T CD8+). Este cambio produce la
 necrosis de las células tumorales y una notable reducción de la masa tumoral en comparación con una respuesta
 antitumoral marginal producida en el grupo de control que tiene un predominio de infiltrado de linfocitos T CD8+ y
 pocos linfocitos T CD4+ que se infiltran en el tumor. Un cambio de paradigma en la composición del infiltrado de
 40 células inmunes tumorales (una inversión de la proporción de CD4/CD8 intratumoral) tomado junto con el hallazgo
 clínico del que se ha informado anteriormente, en el que los pacientes tratados con LI presentaron una mayor
 sensibilización a la radioterapia de las células tumorales residuales y un efecto biológico del tratamiento medido por
 el aumento del tiempo hasta la recurrencia y la reducción de la tasa de recurrencia de los pacientes de COCE
 tratados con LI en comparación con los pacientes de COCE de control (no tratados) se traduce en una nueva
 metodología para el tratamiento del COCE y, posiblemente, otros tumores sólidos.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente activa de una mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos para su uso en un método de presensibilización del cáncer mediante la modificación de la proporción de CD4/CD8 en un tumor de cabeza y cuello, siendo administrada dicha mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos cinco veces a la semana durante un período de tres semanas en una cantidad de 800 UI, UI representando unidades internacionales para la interleucina 2 dadas en la primera norma internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 humana, 86/504, en la que 400 UI de dichas 800 UI de mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos se inyectan peritumoralmente en cuatro zonas diferentes situadas alrededor de una masa tumoral, de manera que se inyectan 100 UI en cada una de las cuatro zonas y se inyectan 400 UI/ml perilinfáticamente ipsilateral a la masa tumoral; y en donde dicha mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos se compone de las siguientes proporciones específicas de citocina seleccionada del grupo de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF con respecto a la interleucina 2 (IL-2):
- 15 IL-1 β con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 0,4 a 1,5;
 TNF- α con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 3,2 a 11,3;
 IFN- γ con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 1,5 a 10,9; y
 GM-CSF con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 2,2 a 4,8.
- 20 2. La mezcla de citocinas de la reivindicación 1 para el uso definido en dicha reivindicación, en donde dicha inyección perilinfática de 400 UI se aplica a la masa tumoral en la zona mandibular posterior de la zona de la cadena linfática yugular ipsilateral..
- 25 3. La mezcla de citocinas de las reivindicaciones 1 o 2 para el uso definido en dicha reivindicación, en la que dichas proporciones específicas de citocinas son las siguientes:
- 30 IL-1 β con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 0,6 a 0,8;
 TNF- α con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 7,7 a 10,9;
 IFN- γ con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 4,9 a 7,1; y
 GM-CSF con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 3,5 a 4,5.
- 35 4. Una cantidad terapéuticamente activa de una mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos para su uso en un método de presensibilización hacia el cáncer mediante la modificación del infiltrado de células mononucleares en un tumor de cabeza y cuello, siendo administrada dicha mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos cinco veces a la semana durante un período de tres semanas en una cantidad de 800 UI, UI representando unidades internacionales para la interleucina 2 dadas en la primera norma internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 humana, 85/504, en la que 400 UI de dichas 800 UI de mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos se inyectan peritumoralmente en cuatro zonas diferentes situadas alrededor de una masa tumoral, de manera que se inyectan 100 UI en cada una de las cuatro zonas y se inyectan 400 UI/ml perilinfáticamente ipsilateral a la masa tumoral; y en donde dicha mezcla de citocinas exenta de suero y exenta de mitógenos está compuesta de las siguientes proporciones específicas de citocinas seleccionadas del grupo de IL-1 β +, TNF- α , IFN- γ y GM-CSF con respecto a la interleucina 2 (IL-2):
- 40 45 IL-1 β con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 0,4 a 1,5;
 TNF- α con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 3,2 a 11,3;
 IFN- γ con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 1,5 a 10,9; y
 GM-CSF con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 2,2 a 4,8.
- 50 5. La mezcla de citocinas de la reivindicación 4 para el uso definido en dicha reivindicación, en donde dicha inyección perilinfática de 400 UI se aplica a la masa tumoral en la zona mandibular posterior de la zona de la cadena linfática yugular ipsilateral.
- 55 6. La mezcla de citocinas de la reivindicación 5 para el uso definido en dicha reivindicación, en la que dichas proporciones específicas de citocinas son las siguientes:
- 60 IL-1 β con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 0,6 a 0,8;
 TNF- α con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 7,7 a 10,9;
 IFN- γ con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 4,9 a 7,1; y
 GM-CSF con respecto a IL-2 a un intervalo de proporciones de 3,5 a 4,5.
- 65 7. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-3 con respecto a IL-2 en el intervalo de 0,38 a 0,68, preferentemente a 0,53 \pm 0,15.
8. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en

- dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-6 con respecto a IL-2 en el intervalo de 37,2 a 53,8, preferentemente a $46 \pm 5,9$.
- 5 9. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-8 con respecto a IL-2 en el intervalo de 261 a 561,5, preferentemente a $411 \pm 10,6$.
- 10 10. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-1 α con respecto a IL-2 en el intervalo de 0,56 a 0,94, preferentemente a $0,75 \pm 0,19$.
- 15 11. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-10 con respecto a IL-2 en el intervalo de 2,87 a 3,22, preferentemente a $3,00 \pm 0,18$.
- 20 12. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de IL-16 con respecto a IL-2 en el intervalo de 1,16 a 2,84, preferentemente a $1,84 \pm 0,68$.
- 25 13. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de G-CSF con respecto a IL-2 en el intervalo de 2,16 a 3,78, preferentemente a $2,97 \pm 0,81$.
- 30 14. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de TNF- β con respecto a IL-2 en el intervalo de 1,17 a 2,43, preferentemente a $1,8 \pm 0,63$.
- 35 15. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de MIP-1 α con respecto a IL-2 en el intervalo de 15,7 a 37,16, preferentemente a $22,7 \pm 7,0$.
- 40 16. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de MIP-1 β con respecto a IL-2 en el intervalo de 17,1 a 28,5, preferentemente a $22,8 \pm 5,7$.
- 45 17. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de RANTES con respecto a IL-2 en el intervalo de 2,3 a 2,7, preferentemente a $2,5 \pm 0,13$.
- 50 18. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de EGF con respecto a IL-2 en el intervalo de 0,267 a 0,283, preferentemente a $0,275 \pm 0,008$.
- 55 19. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de PGE₂ con respecto a IL-2 en el intervalo de 3,63 a 5,42, preferentemente a $4,5 \pm 0,87$.
- 60 20. Una mezcla de citocinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 para el uso definido en dichas reivindicaciones, que comprende además una proporción de TxB₂ con respecto a IL-2 en el intervalo de 23,47 a 25,13, preferentemente a $24,3 \pm 0,83$.
21. La mezcla de citocinas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso definido en dichas reivindicaciones, en la que IL-12 solo está presente en cantidades traza.
22. La mezcla de citocinas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso definido en dichas reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un tumor de cabeza y cuello.
23. La mezcla de citocinas de la reivindicación 22 para el uso definido en dicha reivindicación, en donde el cáncer es carcinoma oral de células escamosas (COCE).

Figura 1

Densidad de células infiltrantes CD4 y CD8 del OSCC
(Subgrupo que responde, tratado con LI, y control)

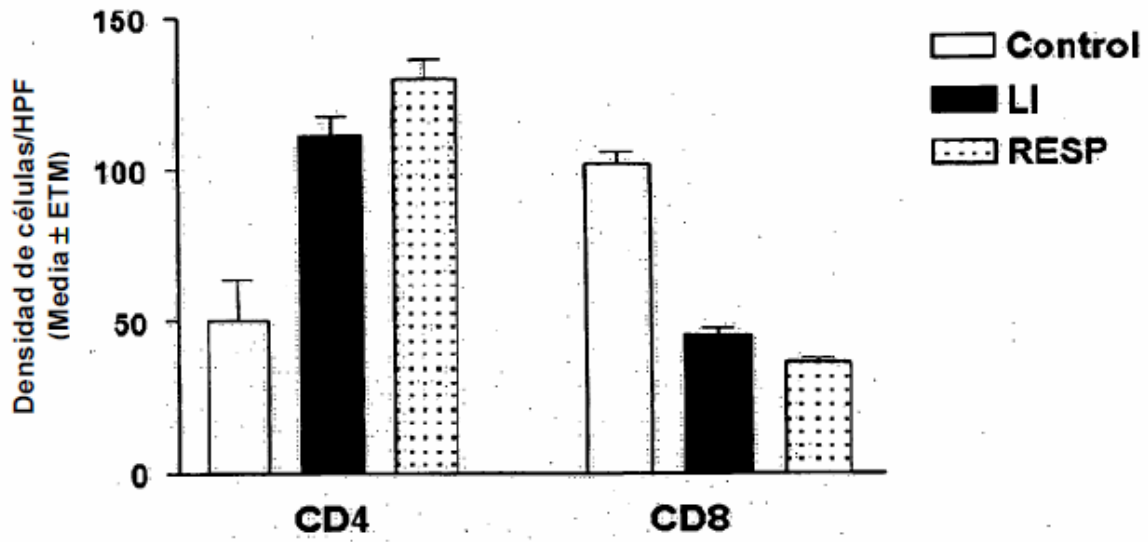


Figura 2
Proporción de CD4/CD8 de COCE
(Pacientes tratados con LI y de control)

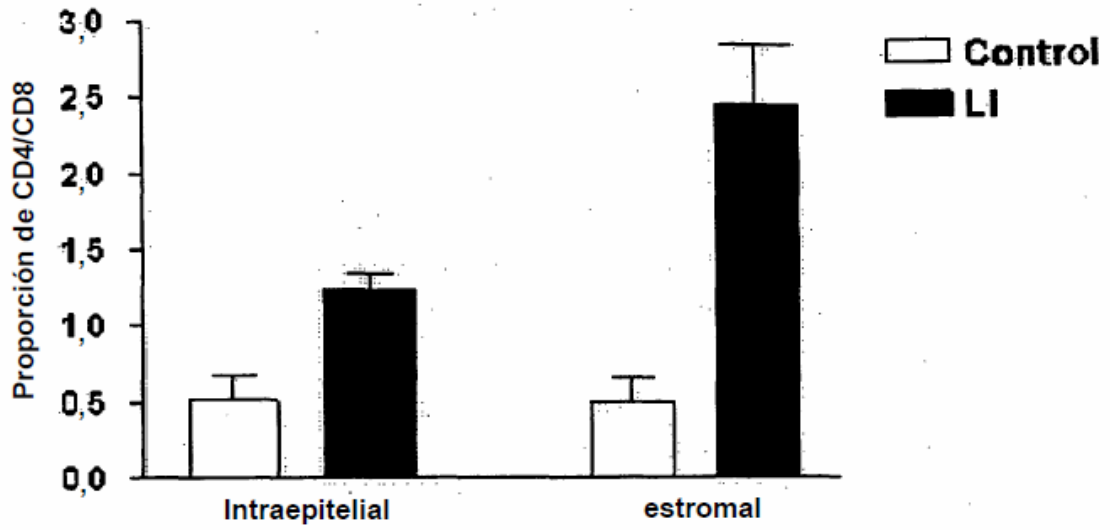


Figura 3
Proporción de CD4/CD8 de pacientes de COCE tratados
con LI y de control
(Análisis de subgrupos de respuesta parcial y completa)

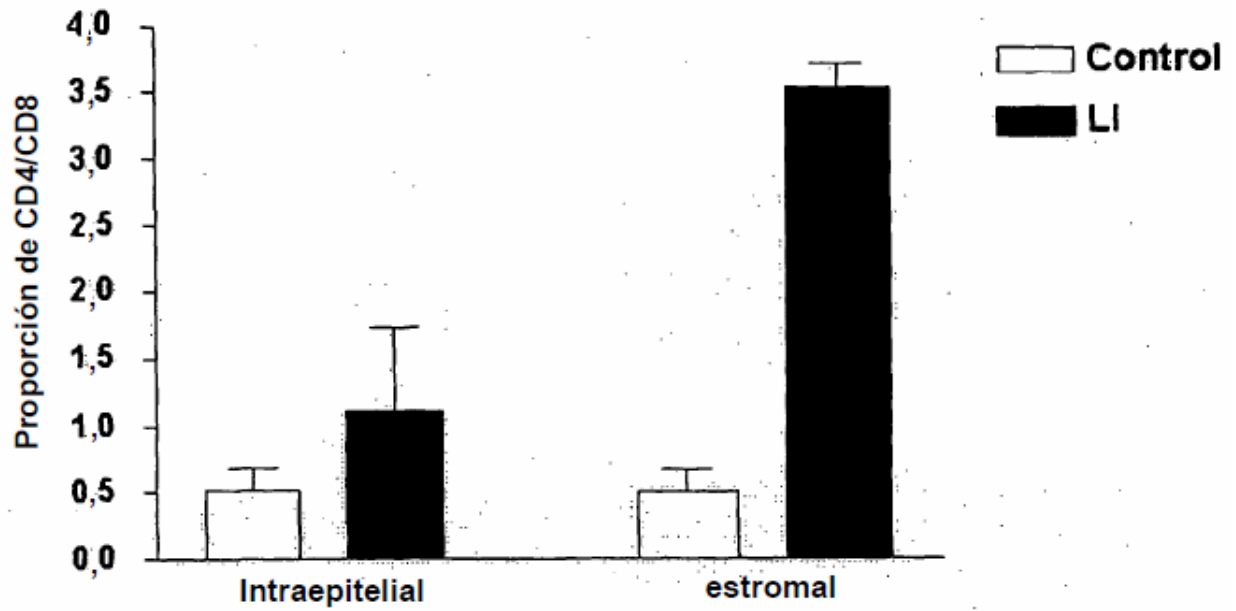
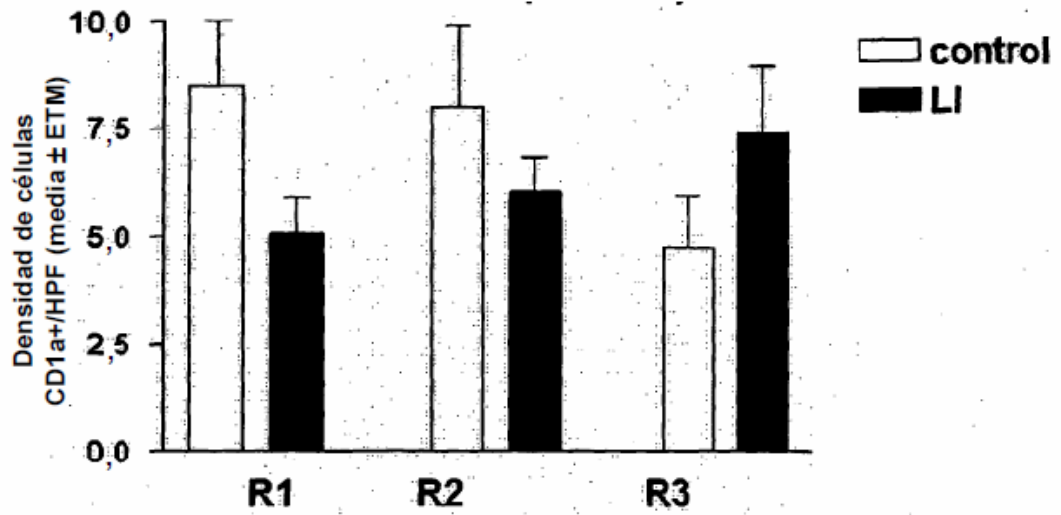


Figura 4

Infiltrado de células dendríticas (CD1a)



R1 = Superficie del tumor; R2 = Centro del tumor; R3 = Superficie de contacto entre tumor y estroma

Figura 5

Infiltrado de macrófagos (CD68)

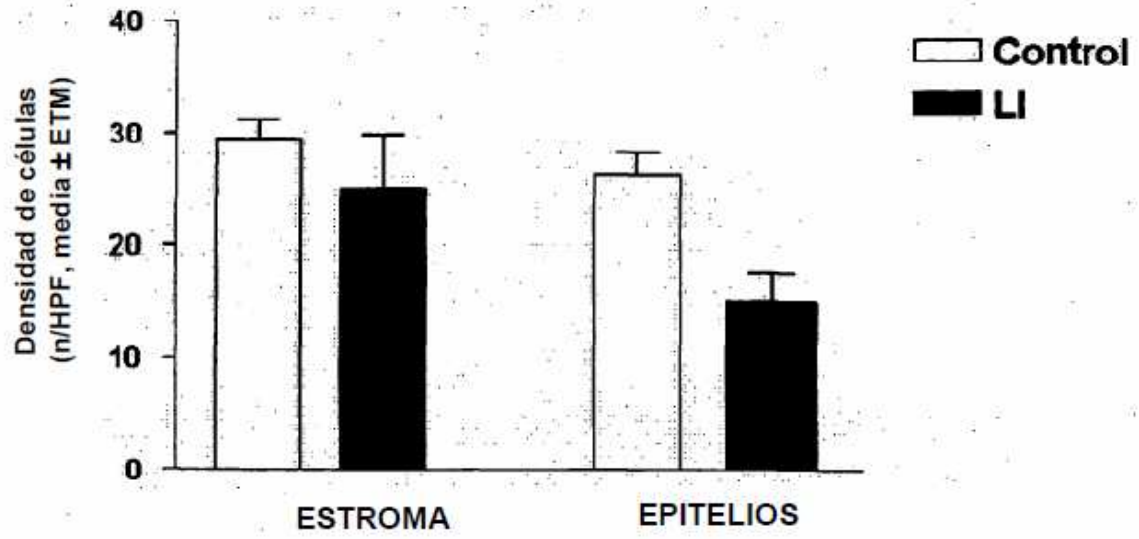
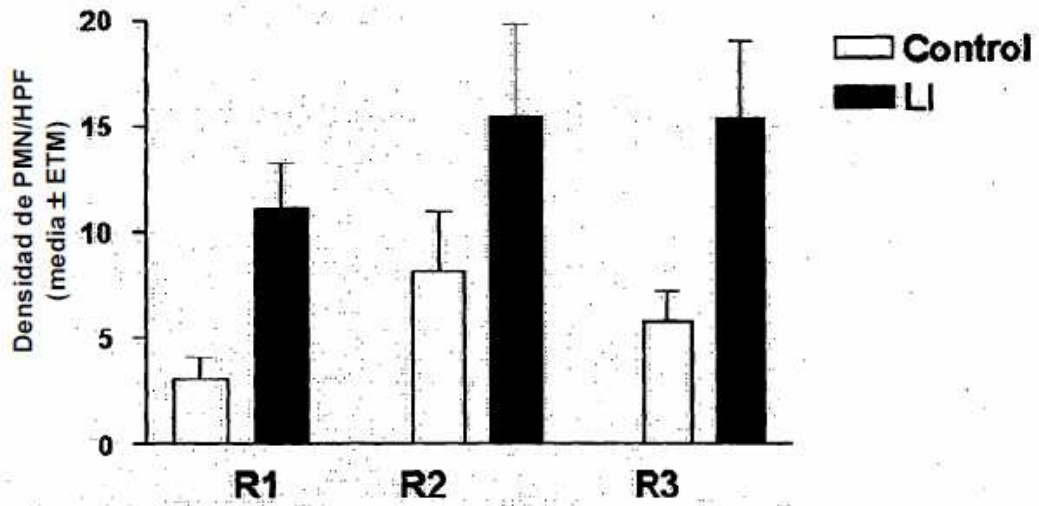


Figura 6

Infiltrado de neutrófilos (MPX)

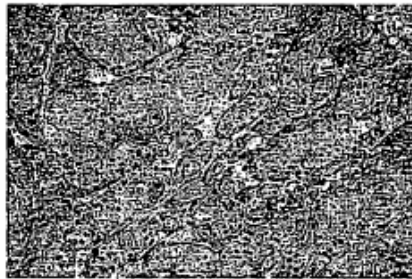


R1 = Superficie del tumor; R2 = Centro del tumor; R3 = Superficie de contacto entre tumor y estroma

Figura 7

**Respuesta del cáncer de cabeza y cuello al tratamiento con
inyección de interleucina leucocitaria (LI)**

**Aspecto histológico de la necrosis del carcinoma oral de
células escamosas (COCE) [tinción con HE]:**



Grupo A



Grupo B

**Grupo A: Control: falta de necrosis en los nidos epiteliales del COCE.
Grupo B: Tratado con LI: todo el nido canceroso está necrótico y lleno
de residuos y leucocitos.**

Figura 8

Inyección de interleucina leucocitaria

Efecto del tratamiento sobre la proporción de los nidos cancerosos del COCE (según morfometría)

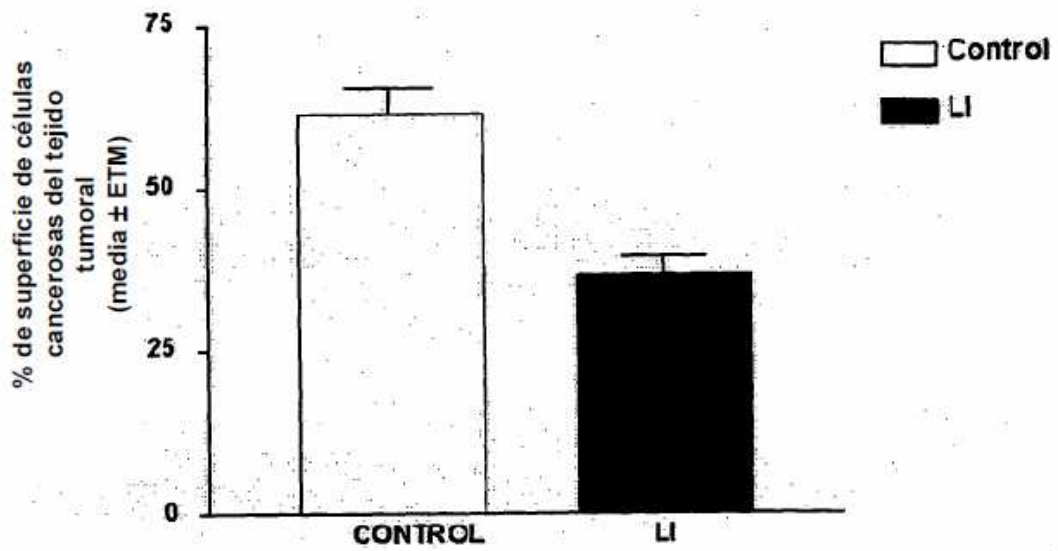


Figura 9
Activación inmune mediante inyección de interleucina leucocitaria
-Un cambio de paradigma-

