

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 978**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2005 E 05789138 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 1773368**

54 Título: **Un método de presensibilización de cánceres antes de radioterapia y/o quimioterapia y una nueva mezcla de citoquinas**

30 Prioridad:

29.06.2004 US 878563

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

08.09.2016

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 2 581 978 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

Un método de presensibilización de cánceres antes de radioterapia y/o quimioterapia y una nueva mezcla de citoquinas

5

Introducción

La presente invención se refiere a un avance muy importante con el uso de una nueva mezcla de citoquinas para presensibilizar los tumores del carcinoma espinocelular oral (OSCC) antes de un tratamiento terapéutico tal como quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia. La mezcla de citoquinas es una mezcla exenta de suero y una mezcla exenta de mitógeno comprendida por relaciones específicas de citoquinas tales como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF a interleuquina 2 (IL-2), que es eficaz para inducir las células cancerosas a iniciar una fase de ciclo celular proliferativo aumentando de esta forma su vulnerabilidad a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Una de dichas nuevas mezclas de citoquinas es la inyección de interleuquina leucocítica (LI) o Multikine® que se puede usar sola o junto con otros fármacos para el tratamiento del cáncer, aumentando por lo tanto el éxito del tratamiento del cáncer y la supervivencia sin enfermedad de los pacientes de cáncer.

10

15

Antecedentes de la invención

Los tratamientos actuales del cáncer, y en concreto de los tumores sólidos, comprenden principalmente la intervención quirúrgica seguida por radioterapia y/o quimioterapia. Dunne-Daly CF, "Principles of radiotherapy and radiobiology", Semin Oncol Nurs. 1999 Nov;15(4):250-9; Hensley ML et al., "American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants.", J Clin Oncol. octubre de 1999; 17(10): 3333-55. Junto con los mencionados tratamientos, se usan agentes quimioterapéuticos tóxicos tales como Gemcidabina, Vinblastina, Cisplatino, Fluorouracilo, Gleevec, Metotrexato, que son incapaces de diferenciar entre células normales y células cancerosas. Aunque eficaces, estos y otros agentes quimioterapéuticos tóxicos han hecho poco para aumentar la supervivencia global del paciente. Además, los tratamientos actuales en general fracasan también en aumentar la tasa de supervivencia de 5 años de los pacientes con cáncer a pesar de la combinación sinérgica de quimioterapias y radioterapias. Incluso los agentes receptores del factor de crecimiento antiepidérmico, los fármacos antiangiogénicos y los tratamientos inmunológicos e inmunoadyuvantes que utilizan fármacos tales como Rituximab, Erbitux y Herceptin han fracasado en aumentar significativamente la tasa de supervivencia de 5 años de los pacientes con cáncer. Adicionalmente, la remisión completa o supervivencia sin enfermedad de los pacientes con cáncer sin tener en cuenta el tipo de cáncer no ha aumentado para ninguno de los tratamientos anteriormente mencionados o las combinaciones sinérgicas de los mismos.

20

25

30

35

Una modalidad de tratamiento investigada que aumenta las tasas de supervivencia sin enfermedad o que conduce a la remisión completa es la manipulación del ciclo de división celular de las células cancerosas. En particular, las células tumorales que ciclan son generalmente más vulnerables a las radioterapias y a las quimioterapias que las células tumorales que no ciclan debido a los procesos bioquímicos complejos y a procesos biomoleculares tales como la replicación del ADN dependiente de la enzima, fosforilación dependiente de la enzima, cascadas de señalización, asociación y disociación de los complejos moleculares activadores de la transcripción, y se requiere la formación y disociación de ensamblajes macromoleculares de elementos citoestructurales durante el ciclo celular. Mediante la inducción de las células tumorales a iniciar una fase del ciclo celular, se pueden usar agentes antimetabólicos que inhiben cualquiera de los procesos bioquímicos complejos tales como inhibidores de la ribonucleótido reductasa (RNR), inhibidores de la dihidrofolato reductasa o del ADN polimerasa para detener el ciclo celular y evitar por tanto la proliferación del tumor.

40

45

Sin embargo, los métodos conocidos que aprovechan el ciclo celular están limitados a sincronizar la detención del ciclo celular con aplicaciones secuenciales de un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, un método conocido de detener las células malignas en una fase S del ciclo celular con análogos de pirimidina seguido por la exposición a altas concentraciones de antimetabólitos. B. Bhutan et al., Cancer Res. 33:888-894 (1973). Pocas o ninguna célula en la población puede continuar más allá de este punto de detención tras la aplicación del antimetabolito. W Vogel et al., Hum. Genet. 45:193-8 (1978).

50

Otros esfuerzos incluyen métodos para manipular el ciclo de división celular alterando la distribución del ciclo celular en la población de células. Estos protocolos estimulan las células malignas desde una fase durmiente a una fase del ciclo celular aumentando por tanto su vulnerabilidad a los fármacos antimetabólicos que actúan durante la fase vulnerable de la replicación del ADN. H Euler et al., Ann. Med. Interne. (Paris) 145:296-302 (1994); B C Lampkin et al., J. Clin. Invest. 50:2204-14 (1971); Alama et al., Anticancer Res. 10:853-8 (1990). Por el contrario, otros métodos conocidos impiden a las células normales penetrar en la fase S protegiendo por tanto a las células normales de los fármacos quimiotácticos.

55

60

Otros métodos más conocidos de sincronizar la fase del ciclo celular con agentes quimioterapéuticos es la denominada quimioterapia de dosis pulsante, descrita por R E Moran et al., Cancer Treat. Rep. 64:81-6 (1980). En esta solución, las células tumorales leucémicas en ratones se detuvieron en la fase S del ciclo celular con una infusión de hidroxiaurea. Tras la infusión, las células se "liberaron" para continuar el ciclo celular momento en que se

65

proporciona un "pulso" de un segundo agente (Ara-C) a los ratones. El intento era aumentar al máximo la incidencia del segundo agente a medida que las células que ciclan desplazándose a la fase S del ciclo fueran vulnerables. Sin embargo, los resultados indicaron que, aunque los ratones tratados con Ara-C exactamente después de la infusión de hidroxurea mostraron una mayor supervivencia, los ratones tratados con Ara-C posteriormente después de la infusión de hidroxurea no muestra supervivencia aumentada. Claramente, un ciclo celular con una sincronización simple con un segundo agente que no actúa de forma simultánea no mejora la actuación de los dos agentes.

Sin embargo, los métodos conocidos que toman ventaja del ciclo celular continúan buscando una sinergia óptima pero pasiva entre la dosificación, la farmacocinética, la secuencia y el calendario.

Debe esperarse que confinar una población de células en una fase vulnerable del ciclo celular en la que las células son específicamente vulnerables al daño puede cambiar la dinámica de la destrucción celular hacia una mayor eficacia con una mayor reducción en los efectos secundarios disminuyendo la exposición a los fármacos tóxicos. Sin embargo, los experimentos actuales toman ventaja de la detención del ciclo celular o la sincronización estática ha sido decepcionante debido a que los métodos conocidos son incapaces de inducir realmente las células a un ciclo celular. En su lugar, todos los métodos conocidos necesitan tiempo para llevar a cabo la combinación sinérgica de la detención del ciclo celular o la sincronización estática con la población de células diana. Además, agentes tales como pirimidina e hidroxurea usados para efectuar el ciclo celular pueden producir daño a células normales.

Otra solución sería, por supuesto, inducir a las células a entrar en la fase del ciclo celular en vez de detener el ciclo celular o sincronizar el ciclo celular. Sin embargo, como se preveía de otra forma en la técnica, inducir a las células a entrar en el ciclo celular aumenta el riesgo de crecimiento y recurrencia rápida del tumor. Pero el fracaso continuado de composiciones conocidas por aumentar las tasas de supervivencia sin enfermedad o conducir a la remisión completa sugiere una necesidad de inducir a las células malignas a entrar en el ciclo celular de manera que no prolifere el tumor, pero aumente la susceptibilidad del tumor residual al seguimiento del tratamiento con radiación y/o quimioterapia.

Por tanto, existe una necesidad de métodos para inducir células tumorales en un ciclo celular seleccionado entre el grupo de (diferentes fases del ciclo celular) G_1 , S, G_2 y M donde los nuevos métodos pueden aplicarse de forma sinérgica con quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia. Existe también una necesidad de presensibilizar tumores cancerosos en general junto con la necesidad de una nueva mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos comprendida por relaciones específicas de IL-1 β a IL-2, TNF- α a IL-2, IFN- γ a IL-2 y GM-CSF a IL-2 que demostró de forma inesperada mucha mejor eficacia sobre composiciones conocidas en la inducción de células tumorales a entrar en una fase de ciclo celular o para presensibilizar un cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en presensibilizar OSCCT utilizando una nueva mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos que tiene relaciones específicas de IL-1 β a IL-2, TNF- α a IL-2, IFN- γ a IL-2 y GM-CSF a IL-2. Se describe también en el presente documento el desarrollo de composiciones útiles como agentes farmacéuticos o como un adyuvante para utilizarse junto con tratamientos terapéuticos anticancerosos tales como quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia.

Se divulga también en el presente documento un método para mejorar la quimioterapia o radioterapia convencional de neoplasmas o enfermedades del sistema inmunitario con una mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos. Los métodos proporcionan una etapa de presensibilización para el tratamiento del cáncer junto con radioterapias u otras modalidades físicas de muerte celular. Se contempla también un método para inducir células tumorales en una fase vulnerable del ciclo celular seleccionada entre el grupo de (diferentes fases del ciclo celular) G_1 , S, G_2 y M. La presente divulgación no está limitada a cualquier tipo concreto de cáncer y puede incluir cualquier tipo de cáncer. Las aplicaciones específicas incluyen administrar una mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno peritumoralmente tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1600 UI o específicamente a 400 UI o a 800 UI o más adicionalmente en cinco veces a la semana en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1600 UI o a 400 UI o a 800 UI, en el que UI representa unidades internacionales de interleuquina-2 según el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.

En el presente documento también se describe una preparación de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos tal como una inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® a concentraciones nuevas y no evidentes. La preparación de citoquinas puede ser, adicionalmente, parte de una composición farmacéutica. En la presente invención, la nueva preparación exenta de suero y exenta de mitógenos tiene relaciones específicas de citoquina a interleuquina 2 (IL-2) como sigue: IL-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 0,4 - 1,5, y preferentemente a 0,7+/- 0,1 (IL-1 β /IL-2), TNF- α a IL-2 en un intervalo de relación de 3,2 - 11,3, y preferentemente a 9,5+/- 1,8 (TNF- α /IL-2), IFN- γ a IL2 en un intervalo de relación de 1,5 - 10,9, y preferentemente a 6,0+/- 1,1 (IFN- γ /IL-2), y GM-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,2 - 4,8, y preferentemente a 4,0+/- 0,5 (GM-CSF/IL-2).

En la presente invención, la preparación de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos, o la composición farmacéutica, tienen además diferentes citoquinas y otras moléculas pequeñas biológicamente activas en la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en el que la relación de cada una de las moléculas pequeñas biológicamente activas a IL-2 es como sigue: IL-3 a IL-2 en un intervalo de relación de 0,38 - 0,68, preferentemente a 0,53+/- 0,15, IL-6 a IL-2 en un intervalo de relación de 37,2 - 53,8, preferentemente a 46+/- 5,9, IL-8 a IL-2 en un intervalo de relación de 261 - 561,5, preferentemente a 411+/- 10,6, IL-1 α a IL-2 en un intervalo de relación de 0,56 - 0,94, preferentemente a 0,75+/- 0,19, IL-10 a IL-2 en un intervalo de relación de 2,82 - 3,22, preferentemente a 3,0+/- 0,18, IL-16 a IL-2 en un intervalo de relación de 1,16 - 2,84, preferentemente a 1,84+/-0,68, G-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,16 - 3,78, preferentemente a 2,97+/- 0,81, TNF- β a IL-2 en un intervalo de relación de 1,17 - 2,43, preferentemente a 1,8+/- 0,63, MIP-1 α a IL-2 en un intervalo de relación de 15,7 - 37,16, preferentemente a 22,7+/- 7,0, MIP-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 17,1 - 28,5, preferentemente a 22,8+/- 5,7, un RANTES a IL-2 en un intervalo de 2,3 - 2,7, preferentemente a 2,5+/- 0,13, un EGF a IL-2 en un intervalo de relación de 0,267 - 0,283, preferentemente a 0,275+/- 0,008, PGE₂ a IL-2 en un intervalo de relación de 3,63 - 5,42, preferentemente 4,5+/- 0,87 y TxB₂ a IL-2 en un intervalo de relación de 23,47 - 25,13, preferentemente a 24,3+/- 0,83.

Los expertos en la materia que tratan rutinariamente pacientes con cáncer saben que existen muchos regímenes diferentes para el tratamiento de los mencionados cánceres y la aplicación de aquellos regímenes a pacientes concretos dependerá de la consideración de varios factores, por ejemplo, el estadio del cáncer, la extensión de la diseminación de las células cancerosas, por ejemplo, las que han metastatizado, y los atributos físicos del paciente. Los expertos en la materia ajustan rutinariamente los parámetros de un tratamiento concreto, por ejemplo, la dosis, la duración, la ruta de administración y la forma administrada, para pacientes concretos, y una persona normalmente experta en la materia ajusta, sin experimentación innecesaria, dichos parámetros. Los dibujos y las tablas acompañantes, que constituyen una parte de la divulgación, ilustran y, junto con la descripción, explican el principio de la invención. Una persona normalmente experta en la materia apreciará que llegarán a ser evidentes otros aspectos de la presente invención tras la referencia a las figuras adjuntas y la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado a color. La Oficina proporcionará copias de esta solicitud o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color tras solicitarlo y el pago de los honorarios necesarios.

La invención se explicará ahora con mayor detalle mediante la siguiente descripción y las realizaciones específicas y con la ayuda de los dibujos acompañantes.

La Fig. 1 representa el modo de actuación de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®.

La Fig. 2 representa el efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre el porcentaje de células tumorales en ciclo en pacientes que tienen carcinoma espinocelular oral (OSCC) de la cabeza y el cuello con respecto a las evidencias inmunohistoquímicas de células positivas para Ki-67 en OSCC en un grupo tratado con LI. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 25, control, n = 11, grupo tratado con LI) (*P < 0,05) (0 = control, grupo sin tratar).

La Fig. 3 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) en las células linfoides detectadas por el marcador CD45 con respecto a la morfometría de densidad de células linfoides estromales en el carcinoma espinocelular oral (OSCC) en la superficie del tumor (zona 1.0); centro del tumor (zona 2.0); y la interfase de la superficie tumoral (zona 3.0). Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27, grupo control, n = 11, grupo tratado con LI) (*P < 0,05).

La Fig. 4 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre el porcentaje de células en ciclo en el carcinoma espinocelular oral (OSCC) con respecto a la morfometría. Se han contado células positivas para Ki-67 en el compartimento estromal y en los nidos epiteliales tumorales. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 25, control, n = 11, grupo tratado con LI) (*P < 0,05) (0 = control, grupo sin tratar).

La Fig. 5 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) en las células linfoides detectadas por el marcador CD45 con respecto a la morfometría de células linfoides intraepiteliales en OSCC. Zona 1.0 = superficie tumoral; Zona 2.0 = centro del tumor; Zona 3.0 = interfase tumor-estroma. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27, grupo control, n = 11, grupo tratado con LI) (*P < 0,05).

La Fig. 6 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre la densidad de la interleuquina-2, células linfoides positivas a receptor (CD-25) en carcinoma espinocelular oral (OSCC) (morfometría) sobre la densidad estromal. Zona 1.0 = superficie tumoral; Zona 2.0 = centro del tumor; Zona 3.0 = interfase tumor-estroma. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27, grupo control; n = 11, grupo tratado con LI) (*P < 0,05).

La Fig. 7 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre la densidad de la interleuquina-2, células linfoides positivas a receptor (CD-25) en carcinoma espinocelular oral (OSCC) (morfometría) sobre la densidad intraepitelial. Zona 1.0 = superficie tumoral; Zona 2.0 = centro del tumor; Zona 3.0 = interfase tumor-estroma. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27,

grupo control; n = 11, grupo tratado con LI) (* $P < 0,05$).

La Fig. 8 representa un caso control de carcinoma espinocelular oral sobre la densidad de linfocitos T; la inmunolocalización de células positivas para CD3 en el grupo control (caso 10) en este ensayo (aumento original X400).

5 La Fig. 9 representa el efecto del tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) del carcinoma espinocelular sobre la densidad de linfocitos T positivos para CD3; la inmunolocalización de células positivas para CD3 tratadas con LI (caso 31 que tiene un aumento original X400).

10 La Fig. 10 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre la densidad de linfocitos T positivos para CD3 en la morfometría del carcinoma espinocelular oral (OSCC) con respecto a la densidad estromal. Zona 1.0 = superficie tumoral; Zona 2.0 = centro del tumor; Zona 3.0 = interfase tumor-estroma. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27, grupo control; n = 25, grupo tratado con LI) (* $P < 0,05$).

15 La Fig. 11 representa el efecto de aumentar la dosis de tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) sobre la densidad de linfocitos T positivos para CD3 en la morfometría del carcinoma espinocelular oral (OSCC) con respecto a la densidad tumoral intraepitelial. Zona 1.0 = superficie tumoral; Zona 2.0 = centro del tumor; Zona 3.0 = interfase tumor-estroma. Se proporcionan los datos como valores promedios \pm SEM (n = 27, grupo control; n = 25, tratado con LI)

20 Descripción detallada de la invención y de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere al uso de una nueva mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógenos comprendida por relaciones específicas de IL-1 β a IL-2, TNF- α a IL-2, IFN- γ a IL-2 y GM-CSF a IL-2 para presensibilizar OSCCT. Una de dichas nuevas mezclas de citoquinas es la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®, que ha demostrado capacidades inmunomoduladoras. La significación clínica de la
25 inmunosupresión en pacientes de OSCCT afecta inesperadamente a los métodos de presensibilizar el cáncer antes del tratamiento terapéutico y, en particular, a la entrada de células tumorales en una fase del ciclo celular.

La inmunorrestauración de pacientes con cáncer de cabeza y de cuello se lleva a cabo mediante la infusión de citoquinas tales como IL2, IFN α - γ o IL-12. Whiteside, "Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer", Curr Oncol Rep 2001; 3:46-55. En cáncer de cabeza y cuello, el tratamiento con citoquinas basado en interleuquina dio como resultado el aumento de la inmunidad. Cortesina G et al., "Interleukin-2 injected around tumor-draining lymph nodes in head and neck cancer", Head Neck 1991; 13:125-31; De Stefani et al., "Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations", J Immunother 1996;19:125-33; Valente et al., "Infiltrating leukocyte populations and T-lymphocyte subsets in head and neck squamous cell carcinomas from patients receiving perilymphatic injections of recombinant interleukin 2", Mod Pathol 1990;3:702-8; Whiteside TL 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 1990;53:5654-62; Barrera et al., "Combination immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck", Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000;126:345-51; 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 Immunopharmacol 1997;19:619-27; Hadden et al., "Interleukins and contrasuppression induce immune regression of head and neck cancer", Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1994;120:395-403. Por ejemplo, se usó (r)hIL-2 humano satisfactoriamente para aumentar la función inmunitaria de los pacientes de cáncer de cabeza y cuello como se midió mediante los linfocitos T citotóxicos [LTC] y las respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasado [DTH]. Se mostró la respuesta disminuida de los linfocitos T mediante la expresión disminuida del receptor de linfocitos T (TCR), sus componentes de señalización claves, la cadena ξ y zap-70, la ausencia de producción de IL-2 y la apoptosis aumentada de los linfocitos T. Whiteside TL., "Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer", Curr Oncol Rep 2001;3:46-55. Los estudios que investigaban las causas de la alteración de la función de los linfocitos T en el cáncer de cabeza y cuello mostraron que los sistemas Fas-FasL, TGF-P y PGE2 se expresaban a niveles elevados.
50

Sin embargo, la administración *in vivo* de rIL-2 aumentó la densidad de las células CD25⁺ así como la de los linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*), los linfocitos (HLA)-DR⁺ del antígeno de los leucocitos humanos y los linfocitos T. En otra serie de estudios se han observado respuestas clínicas positivas cuando se administró una
55 mezcla de citoquinas por vía perilinfática o peritumoral. Sin embargo, ninguno de estos estudios correlaciono una respuesta inmunitaria aumentada con un tratamiento de seguimiento definitivo tal como cirugía, radioterapia y/o quimioterapia.

60 La tecnología

Multikine® o inyección de interleuquina leucocitaria (LI), es una preparación exenta de suero, exenta de mitógenos, exenta de antibióticos, producida a partir de células mononucleares de sangre periférica humanas que incluye linfocitos T, linfocitos B y macrófagos. Existen tres "familias" de citoquinas en la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® que transmiten juntas la actividad biológica única de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. Incluyen citoquinas citotóxicas/citostáticas y virocidias/virostáticas directas tales como TNF- α , e IFN- γ , citoquinas linfoproliferativas tales como IL-1, e IL-2 y citoquinas quimiotácticas tales como IL-6, IL-8
65

y MIP-1 α . Adicionalmente, las diferentes citoquinas y pequeñas moléculas biológicas que constituyen la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ se derivan de la estimulación *in vitro* de la lectina (por ejemplo, PHA) de células mononucleares de sangre periférica humana que incluyen linfocitos T, linfocitos B, y macrófagos. La centrifugación en un gradiente de Ficoll-Paque separa los glóbulos blancos (incluyendo los linfocitos T, linfocitos B, y macrófagos) del donante de sangre completa, y una serie de lavados (en medios fisiológicamente tamponados) facilita el aislamiento de linfocitos, y la eliminación de glóbulos rojos, residuos celulares y otros componentes celulares no deseados procedentes de componentes de glóbulos blancos aislados del donante de sangre completa.

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ contiene diferentes citoquinas presentes en relaciones específicas de cada citoquina a interleuquina 2 (IL-2) como sigue: IL-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 0,4 - 1,5, y preferentemente a 0,7+/- 0,1 (IL-1 β /IL2), TNF- α a IL-2 en un intervalo de relación de 3,2 - 11,3, y preferentemente a 9,5+/- 1,8 (TNF- α /IL-2), IFN- γ a IL-2 en un intervalo de relación de 1,5 - 10,9, y preferentemente a 6,0+/- 1,1 (IFN- γ /IL-2), y GM-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,2 - 4,8, y preferentemente a 4,0+/- 0,5 (GM-CSF/IL-2).

El resto de las diferentes citoquinas y otras moléculas pequeñas biológicamente activas en la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ que están también presentes en cada preparación de la pequeñas molécula biológicamente activa a IL-2 es como sigue: IL-3 a IL-2 en un intervalo de relación de 0,38 - 0,68, preferentemente a 0,53+/- 0,15, IL-6 a IL-2 en un intervalo de relación de 37,2 - 53,8, preferentemente a 46+/- 5,9, IL-8 a IL-2 en un intervalo de relación de 261 - 561,5, preferentemente a 411+/- 10,6, IL-1 α a IL-2 en un intervalo de relación de 0,56 - 0,94, preferentemente a 0,75+/- 0,19, IL-10 a IL-2 en un intervalo de relación de 2,82 - 3,22, preferentemente a 3,0+/- 0,18, IL-16 a IL-2 en un intervalo de relación de 1,16 - 2,84, preferentemente a 1,84+/- 0,68, G-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,16 - 3,78, preferentemente a 2,97+/- 0,81, TNF- β a IL-2 en un intervalo de relación de 1,17 - 2,43, preferentemente a 1,8+/- 0,63, MIP-1 α a IL-2 en un intervalo de relación de 15,7 - 37,16, preferentemente a 22,7+/- 7,0, MIP-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 17,1 - 28,5, preferentemente a 22,8+/- 5,7, un RANTES a IL-2 en un intervalo de 2,3 - 2,7, preferentemente a 2,5+/- 0,13, un EGF a IL-2 en un intervalo de relación de 0,267 - 0,283, preferentemente a 0,275+/- 0,008, PGE $_2$ a IL-2 en un intervalo de relación de 3,63 - 5,42, preferentemente a 4,5+/- 0,87 y TxB $_2$ a IL-2 en un intervalo de relación de 23,47 - 25,13, preferentemente a 24,3+/- 0,83.

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ se ensayó utilizando un protocolo de caracterización y no contiene las siguientes citoquinas y otras moléculas pequeñas biológicamente activas: IL-4, IL-7, e IL-15, TFR, sICAM, PDGFAB, IFN- α , EPO, LTC 4, TNF- β 2, FGF básico, Angiogenina, sE-selectina, SCF, y LIF. La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ contiene solo cantidades traza (exactamente por encima del nivel de detección del ensayo) de IL-12, y LTB 4.

En el proceso de fabricación, las células mononucleares se separaron de la "capa leucocitaria" del donante humano mediante centrifugación en gradiente por etapas y se cultivaron con PHA para potenciar la producción y la secreción de IL-2 y otras citoquinas de los glóbulos blancos del donante en cultivo como se divulga en las patentes de Estados Unidos 5.093.479, 4.390.623, 4.388.309, 4.406.830, 4.661.447, 4.681.844 y 4.464.355, que se han incorporado por referencia en el presente documento. Posteriormente, el cultivo del sobrenadante se recogió asépticamente, se clarificó y se sometió a un proceso de exclusión del virus comercial. El sobrenadante se concentró a continuación adicionalmente aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración y microfiltración.

En ese momento, se añadió una inyección USP de seroalbúmina humana y el concentrado se tamponó a continuación a pH fisiológico y se llevó a una concentración diana de IL-2 para la etiqueta reivindicada (ejemplo 400 IU/ml). El concentrado se sometió a continuación a una segunda microfiltración (filtro de un tamaño de 0,22 micrómetros) y se dispensó asépticamente en viales de tipo suero estériles y se etiquetó por su contenido de IL-2. Se midió la potencia del producto por la incorporación de timidina radiomarcada por una línea linfocítica de linfocitos T citotóxicos (CTL-2). El agente inyectable final se ensayó adicionalmente mediante ELISA para la presencia de cinco citoquinas marcadoras: IL-2, IL1 β , GM-CSF, IFN- γ , y TNF- α .

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ se proporciona congelada en un vial de vidrio borosilicatado para suero que contiene 2,2 ml de fármaco en la etiqueta reivindicada como IL-2 (400 IU/ml) para administración peritumoral, intratumoral, perilinfática o subcutánea. La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ se sometió a ensayos de control de calidad para determinar la identidad, esterilidad, endotoxinas bacterianas, pH, y concentración de proteínas totales. Cada vial se inspeccionó para determinar la contaminación particulada y el aspecto. La preparación tiene un contenido de proteínas totales de aproximadamente 3 mg/ml (o +/- 1 mg/ml) en el que el material se suministra estéril y exento de pirógenos. La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine $\text{\textcircled{R}}$ tiene una fecha de caducidad asignada de 24 meses desde la fecha de fabricación cuando el fármaco se almacena a -20 $^{\circ}$ C.

Definiciones

IL-2 - Interleuquina 2 (IL-2): una glicoproteína de 15,5 kD sintetizada mediante linfocitos T auxiliares CD4+ (conocida formalmente como factor de crecimiento de linfocitos T). IL-2 tiene un efecto autocrino que actúa sobre los linfocitos

T CD4+ que producen esta y en otras células del sistema inmune (incluyendo los linfocitos B, linfocitos T CD8+, linfocitos NK [citotóxicos naturales] y otros).

- 5 IL-1 β - Interleuquina 1 beta (IL-1 β): una citoquina de 17 kD sintetizada por fagocitos mononucleares activados, se encuentra en forma libre en la circulación y media en las respuestas inflamatorias. Actúa sobre los linfocitos CD4+ para ayudar a facilitar su proliferación, y actúa sobre los linfocitos B como un factor de crecimiento y diferenciación. Induce también la síntesis de IL6 por los fagocitos mononucleares.
- 10 TNF- α - Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α): una proteína de 157 restos de aminoácidos (aa), sintetizada por monocitos estimulados, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, y linfocitos NK entre otros, se encuentra en forma trimérica en la circulación. TNF media en la acción antitumoral directa, produciendo la lisis de células tumorales, facilita el reclutamiento de leucocitos, induciendo la angiogénesis y promueve la proliferación de linfoblastos.
- 15 IFN- γ - Interferón Gamma (IFN- γ): un homodímero de la glicoproteína de 21-24 kD sintetizada por los linfocitos T activados y los linfocitos NK, es un potente activador de los monocitos que aumenta la capacidad de los monocitos de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Tiene una actividad antivírica y antiproliferativa directa, y da lugar a que muchos tipos celulares expresen el complejo molecular superficial celular MHC de Clase II (complejo mayor de histocompatibilidad), así como al aumento de la expresión del MHC de Clase I.
- 20 GM-CSF - Factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF): Una proteína de 127 aa se encuentra como un monómero en la circulación, producida por macrófagos y linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. Es un factor de crecimiento para células hemopoyéticas, y estimula el crecimiento y la diferenciación del linaje mielomonocítico.
- 25 IL-3 - Interleuquina - 3 (IL-3): una linfoquina de 20 kD sintetizada por los linfocitos T auxiliares CD4+, actúa como un factor estimulador de colonias facilitando la proliferación de algunas células hematopoyéticas y promoviendo la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T.
- 30 IL-6 - Interleuquina - 6 (IL-6): una citoquina de 26 kD producida por linfocitos T activados, fagocitos mononucleares, células endoteliales, y fibroblastos. Actúa sobre muchas células, pero tiene una función especial de permitir a los linfocitos B activados diferenciarse en las células plasmáticas que secretan anticuerpos, e induce a los hepatocitos a formar proteínas en fase aguda (implicadas en respuestas inflamatorias) así como fibrinógeno.
- 35 IL-8 - Interleuquina - 8 (IL-8): Una proteína de 8 kD producida por macrófagos y células endoteliales. Es un potente factor quimiotáctico para neutrófilos y linfocitos T, y facilita la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales.
- 40 IL-1 α - Interleuquina 1 alfa (IL-1 α): Una citoquina de 17-kD (similar a IL-1 β) se escinde de una molécula precursora de 33-kD, sintetizada por fagocitos mononucleares activados, se encuentra raramente en forma libre en la circulación y actúa como una sustancia asociada a membrana. Ayuda a IL-1 β en la mediación de las respuestas inflamatorias.
- 45 IL-10 - Interleuquina - 10 (IL-10): Un polipéptido de 18 kD producido por linfocitos T CD4+ y CD 8+, monocitos, macrófagos, linfocitos B activados, y queratinocitos. Inhibe la capacidad de los macrófagos de presentar antígenos, particularmente a células de tipo T_H1, y secretar IL-6 y TNF.
- 50 IL-16 - Interleuquina - 16 (IL-16): una proteína tetramérica de 14 kD producida por linfocitos T CD8+, eosinófilos, mastocitos y células epiteliales respiratorias. Tiene fuertes propiedades quimioatrativas para los linfocitos T CD4+ y los monocitos.
- 55 G-CSF - Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF): una glicoproteína homodimérica de 22 - 25 kD producida por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células estromales. Aumenta las células progenitoras de granulocitos en la médula ósea, y sostiene el aumento de neutrófilos en sangre. Potencia también la capacidad de los neutrófilos para presentar producción potenciada de superóxido que se piensa que es importante en la destrucción de células infectadas microbianamente y células tumorales.
- 60 TNF- β - Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β): una proteína de 25 kD producida por linfocitos activados. Puede destruir células tumorales en cultivo, y estimula la proliferación de fibroblastos. Además, imita la mayoría de las diferentes acciones de TNF- α .
- MIP-1 α - Proteína inflamatoria de macrófagos - 1 alfa (MIP-1 α): Una proteína monomérica de 66 aa producida por macrófagos y células endoteliales. Es un quimioatrayente de los monocitos, linfocitos T y eosinófilos.
- RANTES - Una proteína de 8 kD producida por los linfocitos T es un quimioatrayente de monocitos, linfocitos T y eosinófilos, y promueve la inflamación.
- 65 EGF - Factor de crecimiento epidérmico (EGF): Un polipéptido trisulfatado de 53 restos aa. EGF es un miembro de la familia de la tirosina quinasa, y tiene múltiples funciones, incluyendo la estimulación de la respuesta mitógena y

ayuda en la cicatrización de la herida.

PGE₂ - Prostaglandina E₂ (PGE₂): PGE₂ pertenece a una familia de lípidos biológicamente activos derivados de ácido araquidónico a través de la reacción enzimática de la ciclooxigenasa. Se libera mediante monocitos activados y bloquea la expresión de MHC de Clase II en los linfocitos T y los macrófagos.

TxB₂ - Tromboxano B₂ (TxB₂): TxB₂ es un miembro de compuestos biológicamente activos derivados de ácidos grasos poliinsaturados por isomerización de la prostaglandina y la endoperoxidasa PGH₂ mediante la enzima tromboxano sintetasa. TxB₂ tiene un papel fisiológico en la enfermedad tromboembólica, y reacciones anafilácticas.

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

CTLL-2 (línea celular) - Una línea de linfocitos T citotóxicos de ratón obtenidos de ratones C57B1/6. Esta línea de linfocitos T es dependiente de una fuente exógena de IL-2 para el crecimiento y la proliferación.

Fas - FasL-El sistema Fas/Ligando de Fas. La combinación de un antígeno de Fas, una proteína transmembrana de la superficie celular que media en 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 del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), y FasL es un miembro de la familia TNF. El ligando FAS es una proteína de unión a membrana de 31 kDa [kilo Dalton] (278 aminoácidos). El sistema FAS-ligando de Fas juega importantes papeles en muchos procesos biológicos, incluyendo la eliminación de células linfoides autorreactivas. El ligando de Fas se expresa predominantemente en linfocitos T activados y es una de las moléculas efectoras principales de los linfocitos T citotóxicos y linfocitos citolíticos naturales.

Linfocitos HLA-DR⁺ - Linfocitos que contienen el antígeno de los leucocitos humanos, los antígenos (HLA)-DR, un grupo de glicoproteínas polimórficas determinado por una secuencia que se encuentra en los loci de leucocitos localizados en el cromosoma 6, los loci de histocompatibilidad mayor en seres humanos.

UI (Unidades Internacionales) - Una unidad de medida de la potencia de preparaciones biológicas mediante comparación con un patrón de referencia internacional de un peso y una resistencia específicas, por ejemplo, 1^{er} Estándar Internacional de la OMS para la IL-2 humana, 86/504. Las Unidades Internacionales son el único método reconocido y normalizado para notificar las unidades de actividad biológica que se publican y se derivan de un esfuerzo internacional de colaboración en investigación.

U (Unidades como una medida de la actividad biológica) - Abreviaturas para varias "unidades" nombradas, que cada laboratorio deriva como una referencia, que es además única para el laboratorio donde se está realizando el trabajo. Cada "unidad" es diferente de un laboratorio a otro y no es un estándar globalmente reconocido tal como las Unidades Internacionales (UI).

Infiltrado mononuclear - Presencia de monocitos, células plasmáticas, y linfocitos, en tejido donde no debería estar "normalmente" presente; o la presencia de estas células en gran cantidad o abundancia en agrupaciones en donde estarían presentes de otra forma en solo un pequeño número.

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

TIL (Linfocitos infiltradores del tumor) - Linfocitos T aislados del tumor en el que se infiltran. Los linfocitos infiltradores del tumor tienen poco o ninguna citotoxicidad. Los TIL incluyen linfocitos T, predominantemente CD4⁺ CD8⁺, y se pueden expandir *in vitro* mediante cultivo en presencia de IL-2. Estas células se activan por el tratamiento con IL-2 y son frecuentemente más agresivas hacia el tumor del cual se aislaron que las células activadas por linfocinas normales. La actividad citotóxica de los TIL puede potenciarse mediante IFN- γ . La actividad antitumoral de las TIL *in vivo* puede bloquearse mediante TNF- β .

ZAP 70 - Una proteína Zeta de 70 kD asociada con la cadena ξ de TCR que es una tirosina quinasa presente en el citosol. Se piensa que ZAP 70 participa en el mantenimiento de la señalización del receptor de los linfocitos T, que media en la transducción de la señal que eventualmente produce IL-2. El gen ZAP70 se expresa en linfocitos T y en linfocitos citolíticos naturales y en las cartografías del cromosoma 2q12 humano.

Cadena ξ (Zeta) - Véase Cadena ξ de TCR. El gen de la cadena Zeta se localiza en el cromosoma 1 en 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 tiene 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 zeta se asocia también con otros receptores tales como el receptor gamma del FC (fragmento cristalino) de los linfocitos NK.

5 USP - U.S. Pharmacopeia Monographs.

P - "p < 0,01": Un término en estadística matemática que denota el nivel de probabilidad de un acontecimiento que se produce en condiciones preestablecidas.

10 ANOVA (Análisis de varianzas) - Un análisis de un solo factor como se describe en 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.

15 Modo de actuación y caracterización de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® es una mezcla inmunomoduladora biológicamente activa, mínimamente tóxica, de citoquinas humanas derivadas naturalmente o que se producen naturalmente producidas en condiciones establecidas como se describe en el presente documento. La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se puede usar como un tratamiento anticanceroso y antivírico o como una terapia neoadyuvante con una aplicación de amplio espectro para el cáncer, una enfermedad infecciosa, y otros estados de enfermedad que responden a la inmunomodulación.

25 La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica. Mizel et al., "Purification to Apparent Homogeneity of Murine Interleukin 1", J. Immunol. 126:834 (1981); Togawa et al., "Characterization of Lymphocyte-Activating Factor (LAF) Produced by Human Mononuclear Cells: Biochemical Relationship of High and Low Molecular Weight Forms of LAF", J. Immunol. 122: 2112 (1979); Lachman et al., "Purification of Human Interleukin 1", Chem. Abstr. 94: 137539t (1981) de J. Supramolec. Struct. 13: 457 (1980); Lachman et al., "Partial Purification of Human Lymphocyte Activating Factor", Chem. Abstr. 93: 165824e (1980) of Prep. Biochem. 10: 387 (1980); Mizel et al., "Characterization of Lymphocyte Activating Factor Obtained from the Murine Macrophage Cell Line P388D1", Chem. Abstr. 93:93346a (1980), of Biochem. Charact. Lymphokines, Proc. Int. Lymphokine Workshop 2nd (1979) pp. 411-418; Economou et al., "Purification, Physicochemical Characterization and a Biological Role of Lymphocyte Activating Factor (LAF)", Chem. Abstr. 93: 93347b (1980) of Biochem. Charact. Lymphokines, Proc. Int. Lymphokine Workshop, 2nd (1979) pp. 419-421; Simon et al., "The Role of Subcellular Factors in Pulmonary Immune Function: Physicochemical Characterization of Two Distinct Species of Lymphocyte-Activating Factor Produced by Rabbit Alveolar Macrophages", J. Immunol. 126: 1534 (1981). Animal studies also demonstrated that "mixed interleukins" may have immunomodulatory and immunostimulatory activity *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 pretender quedar limitado a teoría alguna de la invención, una posible hipótesis es que la inyección local/regional de "interleuquinas mixtas" tales como la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® supera la inmunosupresión local. Posteriormente, se produce una tolerancia a la rotura y permite que se produzca una respuesta inmunitaria antitumoral local eficaz.

45 Se ha mostrado que la instilación local de interleuquinas en la región del tumor o la transfección real de genes de la interleuquina en un tumor aumenta marcadamente la respuesta inmunitaria antitumoral resultante en la regresión del tumor como ha notificado Golumbek et al., "Treatment of Established Renal Cancer by Tumor Cells Engineered to Secrete Interleukin4", Science 254:713-716 (1991). Sin embargo, ninguno de estos estudios descubrió el efecto muy esperado de inducir células malignas en una fase del ciclo celular sin producir la proliferación activa del tumor.

50 Inesperadamente, la administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® antes de la cirugía conduce a un aumento en el número de células tumorales en la fase del ciclo celular sin aumentar el riesgo de un crecimiento y de un tumor que se produce más rápidamente como se prevería de otra forma a partir de la técnica. La capacidad de inducir células tumorales en el ciclo celular parece ser única para la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® y puede ser debida al efecto sinérgico de diferentes citoquinas presentes en el fármaco en investigación y el efecto diferencial de estas citoquinas sobre el sistema inmune del hospedador y las células tumorales.

60 Los datos con respecto a la tasa de reincidencia de pacientes tratados con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® antes de la cirugía no mostraron reincidencia del cáncer a los 24 meses después del tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. De forma remarcable, una cohorte pequeña de 8 pacientes tratados secuencialmente que no han tenido un paciente individual recurrente en los 24 meses del periodo de seguimiento. En marcado contraste, la bibliografía enseña que la tasa de reincidencia de pacientes similares es aproximadamente del 50 % a los 18-24 meses después de la cirugía.

65 El tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® no induce la proliferación del tumor que reside en las células linfoides. De forma correspondiente, disminuyeron las células Ki-67⁺ estromales aunque la

frecuencia de las células cancerosas Ki-67⁺ aumentó tras el tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. Por tanto, el tratamiento mediante inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® induce un aumento en el número de células tumorales que ciclan que conduce a una susceptibilidad aumentada del tumor residual para el seguimiento del tratamiento con radiación y/o quimioterapia. Aunque otros estudios llevados a cabo con citoquinas naturales y recombinantes han mostrado eficacia en el tratamiento de la terapia contra el cáncer, aquellos estudios han fracasado en enseñar la inducción de entrada en la fase del ciclo celular o el nuevo método de combinar sinérgicamente la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® con quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia.

Por ejemplo, los estudios con el uso de IL-2 humana y recombinante natural y otras citoquinas, así como en el tratamiento local-regional demostraron el aumento de la inmunidad y la actividad anticancerosa en varios sitios. En particular, IL2 demuestra actividad en la cavidad pleural, el hígado y la vejiga urinaria mientras que IFN- α demuestra actividad en el ovario mientras que IFN- β demuestra actividad en el cerebro, como notificaron Yasumoto et al., "Induction of lymphokine-activated killer cells by intrapleural instillations of recombinant interleukin-2 in patients with malignant pleurisy due to lung cancer", *Cancer Res* 1987;47:2184-7; Mavilgit et al., "Splenic versus hepatic artery infusion of interleukin-2 in patients with liver metastases", *J Clin Oncol* 1990;8:319-24; Pizza et al., "Tumor regression after intralesional injection of interleukin-2 (IL2) in bladder cancer. Preliminary report", *Int J Cancer* 1984;34:359-67; Berek et al., "Intraperitoneal recombinant interferon for "salvage" immunotherapy in stage III epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study", *Cancer Res* 1985;45:4447-53; y Fettel et al., "Intratumor administration of beta-interferon in recurrent malignant gliomas-A phase I clinical and laboratory study", *Cancer* 1990;65:78-83. Más aún, se ha mostrado que IFN- γ demuestra actividad en la piel mientras que TNF- α demuestra actividad en los genitales mientras que una mezcla de diversas citoquinas demuestra actividad en la cabeza y el cuello como han notificado Edwards et al., "The effect of intralesional interferon gamma on basal cell carcinomas", *J Am Acad Dermatol* 1990;22:496-500; Irie et al., "A case of vulva cancer responding to the recombinant human tumor necrosis factor (PT-950) local injection therapy", *Gan No Rinsho* 1988;34:946-50; y Pulley et al., "Intravenous, intralesional and endolymphatic administration of lymphokines in human cancer", *Lymph Res* 1986;5:S157-63. Además, los estudios de las administraciones de IL-2 recombinante durante 10 días antes de la cirugía en la yugular por vía perilinfática o en la yugular por vía perilinfática y bajo la barbilla mostraron una necrosis variable y una infiltración linfocítica como notificaron Valente et al., "Infiltration leukocyte populations and T-lymphocyte subsets in head and neck squamous cell carcinomas from patients receiving perilymphatic injections of recombinant interleukin-2", *Mod Pathol* 1990;3:702-8 and DeStefani et al., "Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations", *J Immunother* 1996;19:125-33. Además, el examen microscópico de los tumores extirpados demostró un aumento en el infiltrado linfocítico que se correlacionaba con las observaciones clínicas de IL-2 como notificaron Saito et al., "Immunohistology of tumor tissue in local administration of recombinant interleukin-2 in head and neck cancer", *Nip Jibi Gakkai Kaiho* 1989;92:1271-6.

Sin embargo, ninguno de los estudios anteriormente mencionados mostró ningún cambio en las dimensiones en grosor de los tumores extirpados a pesar de dos remisiones a dosis presuntamente elevadas de IL-2 recombinante (800.000 U durante cuatro semanas [U=Unidades]) en 20 pacientes de cáncer de cabeza y de cuello como notificaron Saito et al., "Clinical evaluation of local administration of rIL-2 in head and neck cancer", *Nip Jibi Gakkai Kaiho*. 1989;92:1271-6. Adicionalmente, los estudios anteriormente mencionados han estado limitados por el pequeño número de pacientes y obstaculizados por la ausencia de comparaciones patológicas con un grupo del control. Vlock et al., "Phase Ib trial of the effect of peritumoral and intranodal injections of interleukin-2 in patient with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: An Eastern Cooperative Oncology Group trial", *Immunother* 1994;15:134-139; Musiani et al., "Effect of low doses of interleukin-2 injected perilymphatically and peritumorally in patients with advanced primary head and neck squamous cell carcinoma", *J Biol Res Modi* 1989;8:571-578.

Aunque un reciente estudio en fase III multicéntrico, aleatorizado de 202 pacientes de OSCC realizado por Stefani et al. indicó que la administración perilinfática de dosis bajas (5000 U/día [U=Unidades]) de IL-2 humano recombinante durante 10 días antes de la cirugía, en la cadena de ganglios linfáticos del cuello del útero ipsilateral, dio como resultado un aumento significativo ($p < 0,01$) en la supervivencia exenta de enfermedad, que a la vez dio como resultado una supervivencia global más larga ($p < 0,03$), De Stefani et al. fracasaron en evaluar el papel de este régimen de tratamiento sobre el ciclo celular y su efecto sobre la mejora de la radiación y la quimioterapia. De Stefani et al., "Improved Survival With Perilymphatic Interleukin 2 in Patients With Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx", *Cancer* 2002; 95: 90-97. Adicionalmente, a pesar de la enseñanza, podrían prepararse 5000 U/día, sin comparaciones entre la presente invención y De Stefani et al. con respecto a las enseñanzas de De Stefani et al. de una dosis "alta" y "baja" de un tratamiento biológico administrado debido a que la potencia del fármaco se midió por U no definibles (Unidades). Por el contrario, la presente divulgación validó y completó el programa de validación de métodos analíticos de la USP para determinar la actividad biológica de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en UI (Unidades Internacionales).

Métodos

Un experto en la materia apreciará que se puede usar la proliferación de células tumorales medidas mediante un marcador Ki-67 inmunohistoquímico u otros medios equivalentes tales como mediante el uso de un marcador PCNA,

un marcador p53, como un parámetro de pronóstico, de Vicente et al., "Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinico-pathological and prognostic significance", *Oral Oncol* 2002; 38: 301-8; Bettendorf et al., "Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma", *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002;64:200-5. En conjunto, se usaron la citometría de flujo o los métodos de tinción convencionales y el uso del microscopio con métodos clínicos, histopatológicos y de estadios y clasificación tumorales (TNM, Tumor, Ganglio, Metástasis) con otros para indicar la agresividad del proceso de enfermedad. Kerdporn et al., "Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma", *Oral Disease* 1997;3:86-92.

Un marcador de proliferación celular Ki67 se diferencia y es específico solo de células en los estadios del ciclo celular. G₁ es la primera fase de crecimiento; S es la segunda fase marcada por el inicio de la síntesis de ADN por la célula donde se replica el ADN celular, y G₂, la segunda fase de crecimiento de la célula sigue la replicación del ADN en la que la célula duplica el tamaño. M es la última fase en el ciclo celular donde se produce la mitosis en la que la célula se divide en la célula hermana de la célula progenitora original. Cada célula resultante contiene una réplica completa del ADN de la célula progenitora original. Siendo el marcador celular Ki67 específico de las células en el ciclo celular que no se pueden encontrar en las células que están en G₀, que es una fase restante de la célula. Durante G₀, la célula no experimenta la replicación celular, proliferación o replicación de ADN. De forma notable, el fenómeno de la fase del ciclo celular es adecuadamente común a todas las células eucariotas vivas incluyendo las células tumorales.

Para detectar la proliferación de células tumorales, se determinó la presencia de ki-67 en nidos de células tumorales residuales tras la resección quirúrgica. Raybaud et al., "Nuclear DNA content, an adjunct to p53 and Ki-67 as a marker of resistance to radiation therapy in oral cavity and pharyngeal squamous cell carcinoma", *Int J. Oral Maxillofac Surg* 2000; 29:36-41; Koelbl et al., "p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? An immunohistochemical and clinicopathologic study", *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:147-54. En general, Ki-67 se puede encontrar en células que experimentan el ciclo celular G₁, S, G₂, y M pero no en el "resto" de células tumorales (G₀). Debido a que las células tumorales que ciclan son más radiosensibles y quimiosensibles, y a que las células tumorales que no ciclan son por lo general radiorresistentes y quimiorresistentes.

Se estudiaron los tumores de los pacientes de cáncer de cabeza y cuello tratados con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® antes de la extirpación quirúrgica del tumor residual y se analizaron mediante inmunohistopatología. Timár et al., "The effect of Leukocyte Interleukin, Injection on the peri- and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and on tumor epithelia - A possible new approach to augmenting sensitivity to radiation and chemotherapy in oral cancer. A multi-center Phase I/[pi] clinical trial", *The Laryngoscope* 113, diciembre 2003. El estudio se llevó a cabo de una manera enmascarada y se ejecutó por tres patólogos calificados independientes que se enmascararon al tratamiento y a la población de pacientes, tratados o del control. El estudio clínico analizó una cohorte de 54 pacientes de cáncer espinocelular oral (HyNC) como parte de un ensayo clínico en fase I-II. Se investigaron estos pacientes para la seguridad del régimen terapéutico, el tumor y las respuestas clínicas, y para la composición del infiltrado mononuclear y las tasas del ciclo celular.

El régimen de tratamiento en la presente sección de ejemplo para la presensibilización del cáncer con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se basa en un protocolo de tratamiento desarrollado para los pacientes de cáncer de cabeza y cuello en los que se ha demostrado de una manera estadísticamente significativa el aumento del ciclo de células tumorales volviendo estos tumores más sensibles a seguir el tratamiento con radiación y/o quimioterapia. El tratamiento incluyó la administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® intradérmicamente en los márgenes perimetrales de la masa tumoral visible o palpable.

Un proceso de dos semanas de diez (10) inyecciones subcutáneas/subdérmicas diarias de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en una dosis diaria que varía de aproximadamente 20 UI a 1600 UI como IL-2 se administró peritumoralmente en el margen perimetral de la masa tumoral. Otra trayectoria de tratamiento está en el intervalo de 40 UI a 800 UI. Otra trayectoria más está en el intervalo de 35UI a 75 UI. Otro ejemplo no limitante más de un tratamiento sugerido contempla la administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® a una dosis diaria de 55 UI como IL-2 en un proceso de 2 semanas de inyecciones diarias subcutáneas/subdérmicas a menudo diariamente (10).

Pacientes

Información con respecto a la Interleuquina Leucocitaria, En las Tablas 1 y 2 se proporcionan grupos de pacientes del control y tratados con la inyección (LI). Se incluyeron cincuenta y cuatro pacientes con veintisiete pacientes en un grupo del control en un grupo de tratamiento.

Tabla 1
Inyección de interleuquina leucocitaria, grupo de control: Información del paciente

Paciente n.º	Sexo	Edad (a)	Localización del tumor
1	Mujer	65	S. boca
2	Hombre	54	Lengua
3	Hombre	52	Lengua
4	Hombre	53	Lengua
5	Hombre	52	Lengua
6	Hombre	57	Lengua
7	Hombre	40	Lengua
8	Hombre	59	Lengua
9	Hombre	43	S. boca
10	Hombre	53	Lengua
11	Hombre	45	Lengua
12	Mujer	50	Lengua
13	Hombre	66	Labio
14	Hombre	75	Labio
15	Hombre	67	Labio
16	Hombre	55	Lengua
17	Hombre	58	Lengua
18	Mujer	53	S. boca
19	Hombre	46	S. boca
20	Hombre	71	Lengua
21	Hombre	61	Lengua
22	Mujer	43	Lengua
23	Hombre	75	Labio
24	Hombre	77	Labio
25	Hombre	76	Parte ventral de la lengua
26	Hombre	61	Parte ventral de la lengua
27	Hombre	54	Lengua

S. boca = suelo de la boca

Tabla 2
Información del paciente para la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) Grupo de tratamiento

Paciente n.º	Sexo	Edad (a)	Localización del tumor
Dosis alta (HD)			
24	Hombre	58	Lengua
29	Hombre	74	Lengua
27	Hombre	55	Retromolar
26	Hombre	43	S. boca
31	Hombre	64	Parte ventral de la lengua
30	Hombre	45	S. boca
21	Hombre	47	Parte ventral de la lengua
Dosis media (MD)			
25	Hombre	65	Labio
20	Hombre	46	Parte ventral de la lengua
07	Hombre	52	S. boca
13	Hombre	56	S. boca
14	Hombre	50	S. boca
15	Hombre	64	Lengua
23	Hombre	49	S. boca
17	Hombre	41	Parte ventral de la lengua
18	Hombre	51	S. boca
06	Hombre	51	Lengua
12	Mujer	57	Orofaringe
22	Hombre	62	S. boca
Dosis baja (LD)			
08	Hombre	62	S. boca
04	Mujer	65	Lengua
09	Mujer	49	Retromolar
03	Mujer	63	S. boca
01	Hombre	58	Parte ventral de la lengua
02	Hombre	62	Lengua
05	Hombre	55	Parte ventral de la lengua
11	Hombre	57	Parte ventral de la lengua

HD = dosis acumulativa alta de interleuquina leucocitaria, lny (8000 UI, como IL-2 equivalente), MD= dosis media (4800 UI) LD= dosis baja (2400 UI)

Régimen de tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® para el cáncer

5 Otra realización contemplada por la presente divulgación para un régimen de tratamiento para la presensibilización del cáncer con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se basa en un protocolo de tratamiento desarrollado para los pacientes de cáncer de cabeza y cuello en los que se ha demostrado de una manera estadísticamente significativa el aumento del ciclo de células tumorales volviendo estos tumores más sensibles a seguir el tratamiento con radiación y/o quimioterapia. El tratamiento incluyó la administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® por vía subcutánea en el área submandibular de la cadena de ganglios linfáticos del cuello del útero.

10 Un proceso de dos semanas de diez (10) inyecciones subcutáneas/subdérmicas diarias de inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en una dosis diaria que varía de aproximadamente 20 UI a 1600 UI como IL-2 se administró 1/2 peritumoralmente en el margen perimetral de la masa tumoral, y 1/2 en la cadena de ganglios linfáticos submandibular ipsilateral a la masa tumoral. Otra trayectoria de tratamiento está en el intervalo de 40 UI a 15 800 UI. Otra trayectoria más está en el intervalo de 35UI a 75 UI. Otro ejemplo no limitante más de un tratamiento sugerido contempla la administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® a una dosis diaria de 55 UI como IL-2 en un proceso de 2 semanas de inyecciones diarias subcutáneas/subdérmicas a menudo diariamente (10).

20 Veintisiete pacientes del grupo de tratamiento recibieron la administración peritumoral de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en un estudio con una dosis creciente. Las administraciones de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se llevaron a cabo de la siguiente manera: la dosis diaria se inyectó peritumoralmente durante un periodo de dos semanas (3 veces por semana) a las siguientes dosis de cada uno de los grupos de dosis sometidos a ensayo; dosis baja, 400 UI (Unidades Internacionales de IL-2) [IL-2 25 equivalente] diaria (8 pacientes), dosis media, 800 UI (IL-2 equivalente) diaria (12 pacientes), y 5 veces por semana a la dosis alta, 800 IU (IL-2-equivalente) diaria (7 pacientes). Todas las inyecciones de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se administraron intradérmicamente en el margen perimetral de la masa de tumor visible/palpable. La cirugía destinada a la resección de la masa tumoral residual se llevó a cabo entre el día 21 y el día 28 tras la administración inicial de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. La radioterapia local/regional comenzó en pacientes después de la operación siguiendo la cicatrización de la herida en tiempos variables tras la cirugía y fue dependiente de la recuperación del paciente individual de la intervención quirúrgica. La radioterapia se inició generalmente entre dos a cuatro semanas después de la cirugía.

35 La administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® estuvo precedida por una única infusión intravenosa de ciclofosfamida, 300 mg/m² tres días antes de la primera administración Multikine®. Se autoadministró indometacina (25 mg) por vía oral (con el alimento), tres veces al día, comenzando tres días después de la administración con ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía. Se autoadministraron sulfato de cinc (50 mg) y suplemento multivitaminas, una vez al día, comenzando tres días después de la administración de ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía. Estos agentes no afectan en absoluto el ciclo celular y se proporcionaron a dosis que están 3-5 veces por debajo de las dosis terapéuticas normales contra el cáncer para estos fármacos.

45 La interleuquina leucocitaria se prepara y suministra por los Chesapeake Biological Laboratories, Inc., Baltimore, MD, CEL-SCI Corporation, proporcionada en un vial de tipo suero de vidrio de borosilicato precintado que contiene 2,2 ml de fármaco en 400 UI/ml (IL-2 equivalente) para la administración peritumoral, intratumoral, perilinfática, o subcutánea. La preparación tiene un contenido total de proteínas de aproximadamente 3 mg/ml (o +/- 1 mg/ml). El material se suministró estéril y exento de pirógenos. El fármaco en investigación tiene una fecha de caducidad asignada de 24 meses desde la fecha de fabricación cuando el fármaco se almacena a -20 °C.

50 Ciclofosfamida USP (Bristol-Myers-Squibb, Morton, Reino Unido) se suministró como un polvo estéril que contiene 45 mg de cloruro de sodio, 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.

55 Indometacina USP (Sanofi-Synthelabo, Paris, Francia) se suministró como comprimidos de 25 mg para la autoadministración con alimentos.

Sulfato de cinc (50 mg) (R. P. Scherer Corporation, Clearwater, FL) y el médico proporcionó multivitaminas sin receta a cada paciente para la autoadministración.

60 Se llevaron a cabo estudios patológicos por el Department of Tumor Progression, National Institute of Oncology, Budapest, Hungría (J.T.). Un único protocolo de patología controló el presente estudio y describe la preparación y fijación de los especímenes extirpados quirúrgicamente y el grosor, el examen macroscópico y microscópico, así como los procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos. Los especímenes se recogieron y procesaron

inicialmente por el departamento de patología de cada institución participante, como se detalla en el protocolo de patología. Los especímenes se enviaron a continuación al laboratorio central de patología para el registro, procesamiento adicional, y evaluación patológica.

5 El diagnóstico de las lesiones orales se basó en una biopsia de prueba por escisión de la lesión sospechosa, y los cánceres clasificados como T2-3N0-2M0 se seleccionaron para la inmunoterapia con el régimen de tratamiento LI o Multikine® como se ha descrito inicialmente. Al final del periodo de tratamiento de la LI o Multikine® y después de la cirugía, se evaluaron las respuestas clínicas de acuerdo con la respuesta tumoral, se programó a los pacientes para la resección del tumor (eliminación quirúrgica del tumor residual), una biopsia con una pequeña escisión, o sin
10 biopsia en el caso de una respuesta clínica completa. De acuerdo con ello, estuvieron disponibles dos formas de especímenes patológicos para el tratamiento post-LI o Multikine® para el análisis inmunohistoquímico y de patología: 1) tumores completos y 2) especímenes procedentes de la biopsia del tumor. Los últimos, debido a su pequeño tamaño, limitaron la extensión del análisis patológico de estas muestras.

15 Análisis histológico

El tejido extirpado se introdujo en recipientes etiquetados previamente con formaldehído tamponado con solución salina, se fijó durante la noche antes de incluirse el tejido en parafina y se prepararon portas de 5 mm para la tinción de HyE y el análisis inmunohistológico. Se llevaron a cabo los análisis histológicos y la clasificación de los tumores a
20 partir las secciones teñidas con HyE de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer. El análisis histopatológico se llevó a cabo sobre tres regiones tumorales diferentes (zona 1.0), centro del tumor (zona 2.0), y la interfase tumor-estroma (zona 3.0). Se evaluó también la incidencia de células tumorales necróticas a partir de los portas de HyE. Se determinó el porcentaje del componente epitelial frente al estroma en los tumores cancerosos de cabeza y cuello mediante dos métodos. En primer lugar, el tejido conector se tiñó de acuerdo con Mallory (tinción del tricoma), y se midieron los portas para el área de los nidos de cáncer (epitelio tumoral) utilizando el software de
25 análisis ImagePro (MediaCibemetics, Silver Spring, MD). En segundo lugar, los portas que contenían el tejido extirpado se marcaron inmunohistoquímicamente para la citoqueratina utilizando el anticuerpo contra pancitoqueratina de DAKO (Glostrup, Dinamarca) (A1A3+CK19), que marca las células cancerosas, y se examinaron microscópicamente y se analizaron mediante el uso del software de análisis ImagePro.

30 Determinación de la fracción de proliferación de las células cancerosas

Se marcaron secciones de parafina con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el antígeno ki-67 (DAKO) para demostrar la proporción de población de células que ciclan. Se contó la frecuencia de células tumorales que
35 ciclan al aumento original x 20 en tres áreas separadas del campo seleccionado. Adicionalmente, se determinaron también las células estromales que ciclan utilizando los mismos criterios que para las células tumorales intraepiteliales. Se evaluaron al menos 3 x 100 células tumorales por área.

40 Caracterización del infiltrado de células mononucleares

Se determinaron las células mononucleares presentes en estrecha proximidad de los nidos de células tumorales mediante análisis inmunohistoquímico llevado a cabo en secciones de parafina de las muestras tumorales. Se desparafinaron secciones y se trataron con microondas para recuperar la antigenicidad. Se usaron solo anticuerpos
45 comerciales, para los que se había demostrado previamente que teñían secciones de parafina consistentemente. Se marcaron neutrófilos utilizando anticuerpo dirigido contra mieloperoxidasa (anticuerpo monoclonal de ratón, DAKO), y citoblastos hemopoyéticos con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD34 (DAKO). La población de células macrófagas se identificó mediante la expresión del antígeno CD68 (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD68, DAKO), y se identificaron células dendríticas mediante la expresión del marcador Cilia (anticuerpo de ratón dirigido contra Cilia, Immunotech, Paris, Francia). Se identificaron células linfoides mediante la expresión del
50 antígeno LCA (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD45, DAKO). Se marcó la población de linfocitos B con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD20 y se identificaron los linfocitos T mediante un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CD3 (ambos de DAKO). Se identificaron los linfocitos T citotóxicos mediante la expresión de CD8 (mediante un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD8, DAKO), y se identificaron los linfocitos NK utilizando el antígeno CD57 (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD57, Novocastra, Newcastle on Tyne, Reino Unido). Se identificaron las células que expresaban el receptor de la interleuquina-2 (IL2R) en el epitelio tumoral y el estroma utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón hacia IL2R, CD25 (Novocastra). En todos los casos, se usó un anticuerpo de control con un isotipo adecuado como control negativo.

Se llevó a cabo todo el marcado inmunohistoquímico con el kit DAKO LSAB-2 un enlazador de la inmunoglobulina G dirigida contra IgG de ratón e IgG de conejo biotinilado y peroxidasa de rábano picante-estreptavidina para revelar
60 los anticuerpos unidos específicamente. El cromógeno utilizado era una marca de amino-etil-carbazol (AEC) (rojo). Las secciones se teñieron con contraste para los núcleos con hematoxilina.

65 Consideraciones críticas

Se determinó la densidad de células mononucleares basándose en la técnica de punto caliente ("*hot-spot*") similar a

las medidas de la densidad microvascular. En cada área tumoral estudiada, se midió la densidad de las células infiltrantes en la región de la mayor densidad de células mononucleares infiltrantes en el tumor minimizando por lo tanto la extrema heterogeneidad de los infiltrados celulares en los tejidos.

5 Diseño del estudio de patología

Se evaluaron los especímenes de las biopsias tumorales de los grupos tratados con Li o Multikine® y control (no tratados con Li) con la tinción HyE usando las evidencias microscópicas del tumor. CD3, CD8, Cilia, y CD25 con la condición de que el tamaño de la muestra permitiera la ejecución de los cuatro procedimientos de marcado. En el grupo del control y en el grupo tratado con LI, en el que se llevó a cabo la eliminación completa del tumor, el tejido tumoral completo estuvo disponible para el análisis; por tanto, se empleó el programa analítico completo. Se usó un aumento x40 original para seleccionar los portas para la observación y un aumento x100 original durante el análisis histológico de las áreas seleccionadas de los portas.

15 Tres patólogos correspondientes llevaron a cabo la evaluación histológica de cada sección de tumor del paciente. Se alcanzaron determinaciones consensuadas donde existía desacuerdo entre los patólogos. Los mismos tres patólogos llevaron a cabo medidas morfométricas sin conocer los antecedentes clínicos y el resultado del tratamiento de cada uno de los casos (casos tratados con LI o casos del control).

20 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el análisis ANOVA de un solo factor, y un valor p menor de 0,05 (a $\alpha = 0,05$) se consideró que era estadísticamente significativo.

25 Evaluación histológica de los resultados

El grupo control de OSCC consistió en cánceres planocelulares con diversos grados de queratinización (BR1-BR3), como se ha determinado mediante la clasificación de Broder. 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). El grupo tratado con LI no difiere del grupo del control con respecto al tipo de tumor como se muestra en las Tablas III y IV. Esto se confirmó adicionalmente por los modelos de tinción de citoqueratina que revelaron una expresión muy heterogénea de CK-19 o de pan-CK en ambos grupos tumorales.

35 Tabla 3
Histología, Grupo del control

Paciente n.º	Diagnóstico	Grado	estadio	tamaño del tumor (mm)	Necrosis	Tipo de necrosis	Necrosis (%)
1	SCC	BR3	PT2N0	15 x 8	-	-	
2	SCC	BR1	PT2N0	11 x 6	-	-	
3	SCC	BR2	PT2N0	22 x 10	+	Campo	1,4
4	SCC	BR1	PT2N0	12 x 8	+	Campo	8,3
5	SCC	BR3	PT2N1	12 x 7	-	-	
6	SCC	BR3	PT2N0	7 x 5	+	Unicelular	
7	SCC	BR2	PT2N0	11 x 9	-	-	
8	SCC	BR3	PT2N2	15 x 11	+	Campo	44
9	SCC	BR2	PT2N0	10 x 5	-	-	
10	SCC	BR3	PT3N0	22 x 13	+	Campo	2
11	SCC	BR3	PT2N0	10 x 5	-	-	
12	SCC	BR3	PT2N0	14 x 10	-	-	
13	SCC	BR1	PT2N0	14 x 10	+	Microfocal	
14	SCC	BR1	PT2N0	9 x 6	-	-	
15	SCC	BR1	PT3N0	24 x 12	-	-	
16	SCC	BR3	PT2N0	12 x 3	-	-	
17	SCC	BR1	PT2N0	18 x 12	+	Campo	8,4
18	SCC	BR3	PT3N0	20 x 17	-	-	
19	SCC	BR1	PT2N0	13 x 8	+	Microfocal	
20	SCC	BR3	PT2N2	13 x 9	-	-	
21	SCC	BR3	PT2N0	17 x 10	+	Campo	12
22	SCC	BR3	PT2N0	13 x 8	-	-	
23	SCC	BR2	PT2N0	14 x 9	-	-	
24	SCC	BR1	PT2N0	10 x 2	-	-	
25	SCC	BR3	PT2N0	14 x 4	-	-	
26	SCC	BR1	PT2N0	13 x 4	+	Unicelular	
27	SCC	BR3	PT2N0	14 x 6	+	Unicelular	

SCC = carcinoma espinocelular
 BR = Clasificación de Broder (queratinización)
 tamaño = Mayor anchura x mayor profundidad en mm
 superfic.: superficial (solo una interfase aire-tumor)
 Unicelular: Solo necrosis unicelular
 Microfocal: La necrosis está presente solo en los focos microscópicos
 Campo: zonas confluentes

Tabla 4

Histología y Patología; Grupo tratado con inyección de interleuquina leucocitaria							
Paciente n.º	Diagnóstico	Grado	estadio	tamaño del tumor (mm)	Necrosis	Tipo de necrosis	Necrosis (%)
Dosis alta (HD)							
24	SCC	BR3	PT3N0	B	+	Unicelular	
29	SCC	BR1	PT2N0	10 x 15	+	Unicelular	
27	SCC		PT2N1	1 x 1	-		
26	SCC	BR3	PT3N0	B	+	Unicelular	
31	displasia				-	-	
30	SCC	BR1	PT3N1	5 x 6	-	-	
21	SCC	BR1	PT2N0	10 x 15	-	-	
Dosis media (MD)							
25	SCC	BR3	PT3N0	15 x 7,5	+	Campo	2
20	SCC	BR3	PT2N0	12 x 10	+	Campo	10
7	SCC	BR3	PT2N1	B	-	-	
13	SCC	BR1	PT2N0	B	-	-	
14	SCC	BR2	PT1N0	6 x 5	-	-	
15	SCC	BR2	PT1N0	8 x 5	+	superfic.	
23	SCC	BR3	PT3N2	B	-	-	
17	SCC	BR3	PT2N0	9 x 3	-	-	
18	SCC	BR2	PT2N0	15 x 13	+	Unicelular	
6	SCC	BR3	PT2N1	8 x 1	+	superfic.	
12	SCC	BR2	PT2N0	1 x 36	-	-	
22	SCC	BR1	PT3N1	B	-	-	
Dosis baja (LD)							
8	SCC	BR2	PT2N1	4 x 3	+	Microfocal	
4	SCC	BR1	PT2N0	9 x 5	-	-	
9	SCC	BR3	PT2N1	3 x 1,5	-	-	
3	SCC	BR3	PT2N1	B	-	-	
1	SCC	BR3	PT2N2	10 x 9	+	Campo	10
2	SCC	BR2	PT2N0	14 x 8	+	superfic.	2
5	SCC	BR2	PT2N0	14 x 3	-	-	
11	SCC	BR3	PT2N0	B	-	-	

B = solo biopsia con escisión
 scc = carcinoma espinocelular
 BR = Clasificación de Broder (queratinización)
 tamaño = Mayor anchura x mayor profundidad en mm
 superfic.: superficial (solo una interfase aire-tumor)
 Unicelular: Solo necrosis unicelular
 Microfocal.: La necrosis está presente solo en los focos microscópicos
 Campo: zonas confluentes
 HD = dosis acumulativa alta de interleuquina leucocitaria, Iny. (8000 UI, como IL-2 equivalente)
 MD= dosis media (4800 UI)
 LD= dosis baja (2400 IU)

Estroma tumoral

5

La "fragmentación" de los nidos de cáncer podría no confirmarse a pesar de los informes previos de 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); y Barrera et al., "combination Immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck", Arch. (2000). Sin embargo, se identificaron tumores ricos en estroma en 8 de 27 en el grupo del control y 6 de 17 en el grupo tratado con LI. El marcado específico de los nidos de cáncer y del estroma del tumor con la tinción del tricoma de Mallory ayudó a discriminar entre estas áreas. El porcentaje de nidos epiteliales en los grupos del control y los grupos tratados con LI se determinó usando morfometría. El análisis no reveló diferencias significativas sugiriendo

10

por tanto que el tratamiento con LI no afecta la relación tumor-estroma.

Necrosis y proliferación

- 5 Se evaluaron también el efecto del tratamiento LI sobre la necrosis tumoral como se muestra en las Tablas 3 y 4 y la proliferación de células cancerosas (Fig. 2) utilizando el análisis histológico y la identificación específica de células que ciclan detectadas por el marcador Ki-67. El análisis histológico identificó necrosis de campo o microfocal, necrosis superficial o unicelular en grupos tratados con LI y grupos del control tal como se muestra en la Tabla 5. La ausencia de cualquier tipo de necrosis en OSCC fue similar en todos los tumores de los diferentes grupos tratados con Li estudiados (57 %-63 %) como se muestra en la Tabla 5. La necrosis de campo medida en el intervalo de más de un 1 % del volumen tumoral fue también similar en los diversos grupos tumorales de las Tablas 3 y 4.

Tabla 5

Efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria sobre la presencia de necrosis en carcinoma espinocelular					
Inyección de interleuquina leucocitaria (UI >1 % de Volumen como IL-2)	Ninguno	Superficial	Unicelular	Microfocal	(Campo)
Control (No tratado)	16/27	0/27	3/27	2/27	6/27
2400	5/8	0/8	0/8	1/8	2/8
4800	7/12	2/12	1/12	0/12	2/12
8000	4/7	0/7	3/7	0/7	0/7

- 15 En la Fig. 2 se muestra la detección de células que ciclan mediante la expresión de Li-67 que identificó células cancerosas y células estromales de células hospedadoras tal como células mononucleares, fibroblastos, células endoteliales (aumento x100). El análisis morfométrico de la densidad de células cancerosas positivas para Ki-67 indicó que el tratamiento con LI indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) en las células tumorales que ciclan a la dosis de LI mayor administrada como se muestra en la Fig. 4. por otra parte, la incidencia de células hospedadoras que ciclan, se encuentra principalmente en el área estromal del tumor, disminuida con la dosis LI que aumenta (Fig. 4), y los efectos se demostró que eran significativos en el caso de las dosis más bajas y las dosis más altas ($P < 0,05$). Estos hallazgos apoyan la conclusión de que el tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® produce células cancerosas que entran en una fase del ciclo celular pero que no dan lugar a que las células inmunitarias hospedadoras o las células estromales ciclen. De acuerdo con ello, la presente invención contempla que el tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® para inducir la entrada en el ciclo celular de una elevada proporción de población de células tumorales según la expresión del antígeno Ki-67.

- 30 Los datos con respecto a la tasa de reincidencia de pacientes tratados con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® antes de la cirugía seguido por radioterapia no mostraron reincidencia del cáncer a los 24 meses después del tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. Una cohorte pequeña de 8 pacientes tratados secuencialmente con la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® no tienen ningún paciente reincente en los 24 meses del periodo de seguimiento. Por el contrario, la bibliografía proyecta que la tasa de reincidencia de estos pacientes es aproximadamente del 50 % a los 18-24 meses después de la cirugía.

- 35 El tratamiento con inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® no induce la proliferación activa del tumor que reside en las células linfoides, y de forma correspondiente, las células Ki-67+estromales disminuyeron, aunque la frecuencia de las células cancerosas Ki-67+ aumentó tras el tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine®. Por tanto, el tratamiento de LI o Multikine® induce un aumento en el número de células tumorales que ciclan que conduce a una susceptibilidad aumentada del tumor residual para el seguimiento del tratamiento con radiación y/o quimioterapia.

Infiltrados mononucleares

- 45 Se evaluaron los infiltrados mononucleares en el compartimento estromal y en los nidos de cáncer definidos como infiltrados intraepiteliales. No se identificaron diferencias claras entre los tumores extirpados procedentes del grupo del control y los del grupo tratado con LI utilizando la tinción HyE convencional. El grupo del control fue también muy heterogéneo a este respecto. En particular, determinados tumores se caracterizaron por un denso infiltrado leucocítico mientras que otros por uno plasmocítico. Se caracterizaron otros más adicionales por uno linfoide.

- 50 La densidad de macrófagos identificados por el marcador CD68 se midió intraepitelialmente y en el estroma tumoral. La densidad intraepitelial de los macrófagos fue comparable a la de los del estroma. Una densidad relativamente alta de macrófagos intraepiteliales estaba en los tumores del control de forma similar a los tratados con LI.

- 55 Se determinó también la densidad de los leucocitos neutrófilos positivos para la mieloperoxidasa en OSCC mediante morfometría. Estos estudios indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la densidad de neutrófilos estromales o intraepiteliales tras el tratamiento con LI.

- Se llevaron a cabo las medidas morfométricas en tres áreas de OSCC. Se definió una superficie tumoral como la zona 1.0. El centro del tumor se definió como la zona 2.0. La interfase tumor-estroma denominada frecuentemente el borde invasivo se definió como la zona 3.0. No se observó una diferencia significativa en la relación macrófagos o tejido conectivo para estas áreas. Sin embargo, para caracterizar el infiltrado linfoide en el OSCC, se estudió la discriminación entre estas tres zonas sin tomar en consideración la similitud o diferencia real entre las muestras.
- 5 Efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria sobre las células dendríticas en el carcinoma espinocelular oral
- 10 Se identificaron células dendríticas mediante el marcador CD1a que reveló un infiltrado rico en epitelios normales peritumorales. Este modelo de infiltrado rico disminuyó inequívocamente en nidos de células cancerosas. No se identificó presencia significativa de células dendríticas en el estroma tumoral tanto en el grupo del control como en el grupo tratado con LI. El infiltrado de células dendríticas intraepiteliales era heterogéneo en casos de cáncer sin tomar en consideración los grupos de tratamiento.
- 15 Efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria sobre el infiltrado de células linfoides en el carcinoma espinocelular oral
- 20 Se identificaron las células linfoides mediante la expresión del marcador del antígeno común de los leucocitos (1CA, CD45) en diversas zonas de OSCC indicando una presencia marcadamente más densa de linfocitos en el estroma tumoral que en los nidos de células cancerosas en una relación de aproximadamente 1:10. No hubo diferencias geográficas significativas observadas entre las diversas regiones de OSCC desde la superficie al borde invasivo en cualquier grupo de tratamiento con respecto al infiltrado linfoide. El tratamiento con LI indujo una tendencia creciente en el infiltrado linfoide estromal que no fue estadísticamente significativa, excepto a la dosis más baja estudiada como se muestra en la Fig. 3. Sin embargo, solo la dosis más baja de tratamiento con LI indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) en las células CD45 intraepiteliales como se muestra en la Fig. 5. La dosis más alta de 11 disminuyó la densidad intraepitelial de células positivas para CD45, aunque los cambios no fueron estadísticamente significativos.
- 25 Efecto del tratamiento de inyección de interleuquina leucocitaria sobre las células linfoides alfa positivas (positivas para CD25) del receptor de la interleuquina 2 en el carcinoma espinocelular oral
- 30 Aproximadamente un 10 % de las células linfoides estromales o intraepiteliales se encontró que expresan IL-2Ra en muestras de OSCC. No hubo diferencias significativas en la incidencia de células linfoides positivas para CD25 en las diversas zonas de los casos de OSCC tratados con LI. El tratamiento con LI aumentó la superficie de la zona 1 excepto el estroma y la incidencia intraepitelial de las células linfoides positivas para CD25 exclusivamente a la dosis de LI más baja ($P < 0,05$) como se muestra en las Figs. 6 y 7.
- 35 Efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria sobre la densidad de linfocitos B en el carcinoma espinocelular oral
- 40 Los linfocitos B identificados por el marcador CD20 se encontraron en el estroma tumoral exclusivamente en todos los grupos tratados con LI. No hubo diferencia en la densidad de linfocitos B en las diversas zonas en los casos del control. El tratamiento con LI indujo la redistribución de linfocitos B desde la zona superficial al borde invasivo. Sin embargo, las tendencias no fueron estadísticamente significativas.
- 45 Efecto del tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria sobre los linfocitos T en carcinoma espinocelular oral
- 50 Se identificó la subpoblación de linfocitos T del infiltrado mononuclear en OSCC mediante el marcador CD3. La densidad de linfocitos T intraepiteliales estuvo por debajo del 5 % de la densidad estromal de linfocitos T en los tumores en el grupo del control como se muestra en la Fig. B (aumento X400). Sin embargo, hubo grandes variaciones en el número y el porcentaje de linfocitos T positivos para CD3 entre los diferentes pacientes del control. Los linfocitos T positivos para CD3 fueron más prevalentes en el grupo tratado con LI como se muestra en la Fig. 9 (aumento X400).
- 55 En los tumores tratados con LI, la densidad estromal de los linfocitos T positivos para CD3 fue menor en un 30 % a 40 % en la mayoría de las zonas tumorales y las dosis de LI estudiadas como se muestra en la Fig. 10. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a las variaciones individuales como se muestra en la Fig. 10. En contraste con los hallazgos en el estroma tumoral, El tratamiento con LI indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) en la densidad de linfocitos T intraepiteliales sin una clara dependencia de la dosis de tratamiento con LI como se muestra en la FIG. 11.
- 60 En el grupo del control, aproximadamente un 50 % de los linfocitos T que se encuentran en el estroma del OSCC podrían considerarse linfocitos T citotóxicos, caracterizados por el marcador CDB. Similar a las células positivas para CD3, El tratamiento con LI indujo la reducción en la incidencia de las células positivas para CDB en el estroma del
- 65

OSCC de normalmente, 30 % - 40 %. Pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Aproximadamente un 10 % de los linfocitos T citotóxicos estromales se encontraron intraepitelialmente en los casos de OSCC del control que no habían recibido tratamiento anteriormente. Aunque el tratamiento con LI a diversas dosis y principalmente a las dos dosis más bajas indujo algo de aumento en las células CDB intraepiteliales, este aumento dependió de varias zonas en los tumores y en el caso individual estudiado y no fue estadísticamente significativo.

Detección de linfocitos citolíticos naturales

Los linfocitos NK que se infiltraron en los cánceres orales en el presente estudio no se detectaron en el grupo completo de pacientes. El fracaso en detectar los linfocitos NK en los OSCC no fue debido al fallo técnico de la inmunorreacción debido a que se detectó con éxito N-CAM (CD57) en las células nerviosas y en las células musculares en degeneración en la región adyacente al tejido tumoral estudiado.

Detección de citoblastos hematopoyéticos positivos para CD34 en carcinoma espinocelular

Informes previos indicaron que los tumores OSCC pueden contener citoblastos positivos para CD34 en su estroma. Schmidt et al., "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34+ cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", Clin Cancer Res 1:95 (1999); 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). Sin embargo, Las células mononucleares positivas para CD34 no se detectaron en el presente estudio de 54 muestras incluidas en parafina. Esto no fue debido a fallo técnico debido a que las células endoteliales positivas para CD34- en la microvasculatura del tumor se detectaron fácilmente en todos los casos de OSCC estudiados.

Discusión

Los datos del presente estudio patológico de 54 pacientes con OSCC demuestran que OSCC es un tumor inmunógeno y que el tratamiento con LI induce la infiltración linfocítica en el tumor. Como en otros tipos de cáncer, existe una variabilidad individual marcada entre las muestras de tumores obtenidas de diferentes pacientes con respecto a la composición del infiltrado mononuclear de OSCC sugiriendo que sería necesario un análisis separado para determinar cuál de los componentes del infiltrado celular juega un papel significativo en el pronóstico de la enfermedad o en la respuesta terapéutica en OSCC.

El tratamiento con interleuquina leucocitaria (LI) tiene un efecto específico sobre la composición del infiltrado mononuclear del OSCC. No se observó efecto en el estroma, los macrófagos intraepiteliales, los leucocitos neutrófilos, o las células presentadoras de antígenos tales como eD1a positivas. Por otra parte, el epitelio peritumoral normal contenía la densidad más elevada de células dendríticas en los grupos del control y en los grupos tratados con LI. Sin pretender quedar limitado a teoría alguna de la invención, esto sugiere que OSCC puede secretar factor(es) que interfieren con o inhiben la actividad de las células presentadoras de antígenos directamente en el sitio del tumor. Debido a que los pacientes con melanoma maligno tienen similar distribución de células dendríticas, esto puede ser un fenómeno general de OSCC más bien que ser un tratamiento específico. El tratamiento con LI a las dosis proporcionadas en el presente documento no tiene una influencia sobre esta característica de OSCC.

El tratamiento de la inyección de la interleuquina leucocitarias (LI) con la dosis más baja indujo una significativa acumulación de células linfoides en los nidos de células cancerosas de OSCC sin efecto significativo sobre la densidad estromal. Adicionalmente, El tratamiento con LI a 400 UI por día, tres veces a la semana aumentó la densidad de las células linfoides que expresaban eD25 en el estroma tumoral e intraepitelialmente. Existe la posibilidad de un bucle de inhibición de la retroalimentación mediante una concentración local relativamente alta de IL-2 natural en la preparación de LI.

El análisis de la población de linfocitos B de las células linfoides indicó que los linfocitos B estromales no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con LI y que los linfocitos B no estuvieron presentes intraepitelialmente. El análisis de un subconjunto de linfocitos T como una diana del tratamiento con LI no produce resultados concluyentes. Aunque el tratamiento con LI de OSCC indujo una tendencia de disminución de la densidad estromal para linfocitos T positivos para CD3 y positivos para CD8, se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en la densidad intraepitelial tras el tratamiento con LI para las células positivas para CD3 independientemente de la dosis de LI. Sin pretender quedar limitado a teoría alguna de la invención, se señala que otro subconjunto de linfocitos T tal como linfocitos T positivos para CD4 puede verse afectado por el tratamiento con LI.

El tratamiento de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) no tiene efecto sobre varias características de OSCC tal como la expresión de la citoqueratina y la clasificación de Broder. No hubo cambios en la relación del estroma tumoral tras el tratamiento con LI. No hubo cambios entre el grupo del control que no había experimentado tratamiento anteriormente y el grupo de tratamiento con LI en la incidencia de formas de necrosis macroscópica o microscópica de nidos de células cancerosas al final del ciclo con tratamiento LI y la resección quirúrgica del tumor

residual.

El tratamiento con LI indujo la entrada en el ciclo celular de una elevada proporción de población de células tumorales basada en la expresión del antígeno Ki-67. La LI indujo las células tumorales OSCC en el ciclo celular debido al efecto sinérgico de las diferentes citoquinas presentes en este fármaco en investigación (que incluye IL-1- β , IL-2, TNF- α , IFN- γ , y GM-esF) y el efecto diferencial de estas citoquinas en el sistema inmunitario del hospedador y el tumor.

Una cohorte pequeña de 8 pacientes tratados con LI secuencialmente procedentes de un centro de estudio que no han tenido un paciente individual recurrente en los 24 meses del periodo de seguimiento. Debido a que un aumento en el ciclo de células tumorales presenta el riesgo de crecer más rápidamente y de que el tumor reincida más rápidamente, se estudió la tasa de reincidencia en los pacientes tratados con LI frente al grupo del control (no tratados con LI). Los datos preliminares con respecto a la tasa de reincidencia en pacientes tratados con LI antes de la cirugía que habían continuado tanto con radioterapia como con observación con cautela no presentan un aumento en la tasa de reincidencia a los 24 meses después del régimen de tratamiento.

Un reciente estudio en fase III multicéntrico, aleatorizado, de 202 pacientes de OSCC realizado por Stefani et al., indicó que la administración perilinfática de dosis bajas (5000 UI/día) de IL-2 recombinante humana durante 10 días antes de la cirugía en la cadena ipsilateral de ganglios linfáticos del cuello del útero, daba como resultado un aumento significativo ($P < 0,01$) en la supervivencia exenta de enfermedad, que a su vez dio como resultado una supervivencia global más larga ($p < 0,03$). Sin embargo, la población diana principal del tratamiento con LI es la de los linfocitos T positivos para CD3. Por tanto, el tratamiento con LI indujo un desplazamiento de los linfocitos T infiltrantes estromales hacia el intraepitelio tumoral que es importante para la actuación y destrucción antitumoral.

El tratamiento con LI no parece inducir la proliferación activa del tumor que reside en las células linfoides. De forma correspondiente, las células estromales positivas para Ki-67 disminuyeron mientras que la frecuencia de las células cancerosas positivas para Ki-67. Por tanto, el tratamiento con LI parece que induce la migración de los linfocitos T antitumorales comprometidos hacia el nido de células cancerosas y el aumento del número de células tumorales que conducen a una susceptibilidad aumentada del tumor residual al tratamiento de seguimiento con radioterapia, quimioterapia o ambos.

Seguridad del fármaco, eficacia piloto y composiciones

Se ha ensayado la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en 190 pacientes de cáncer, e infectados con VIH y VIH/VPH, sin efectos secundarios graves relacionados con la administración de LI o Multikine® como notificó Harris et al., "Immunologic approaches to the treatment of prostate cancer", *Semin Oncol.* agosto de 1999;26(4):439-7; Timár et al., "The effect of Leukocyte Interleukin, Injection on the peri- and intratumoral subpopulation of mononuclear cells and on tumor epithelia - A possible new approach to augmenting sensitivity to radiation and chemotherapy in oral cancer. A multi- center Phase I/II clinical trial", *The Laryngoscope* [1 13 diciembre 2003]; Brown et al., "A Phase I Open-Label Study of Leukocyte Interleukin, Injection in HIV-I infected individuals: preliminary evidence for improved delayed-type hypersensitivity responses to recall antigens", *Antiviral Therapy* 5 (supplement) 18, 2000; Taylor et al., "Immunotherapy with Leukocyte Interleukin, Injection for human papilloma virus (HPV) induced cervical dysplasia in HIV patients", Annual Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research, Cleveland, OH, octubre de 2001; Taylor et al., "Immunotherapy with Leukocyte Interleukin, Injection for human papilloma virus (HPV) induced cervical dysplasia in HIV patients", 33rd SGO Conference, Miami, FL, marzo de 2002. Multikine® se mostró también que era seguro en estudios toxicológicos en ratones, ratas, cobayas y perros. Adicionalmente, se ensayó Multikine(R) para, y ha demostrado una eficacia piloto, en el cáncer de cabeza y cuello y en la displasia de cuello de útero.

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® puede utilizarse como un componente de una composición inmunomoduladora junto con uno o más transportadores o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, tanto profiláctica como terapéuticamente. Cuando se proporciona para uso profiláctico, la composición inmunomoduladora se proporciona por adelantado de cualquier evidencia de infección o enfermedad. Aunque es posible administrar la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en una forma pura o sustancialmente pura, se puede usar también una composición, formulación o preparación farmacéutica.

Las formulaciones de la presente divulgación, para su uso tanto clínico como humano, pueden comprender la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® como se ha descrito anteriormente junto con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos, especialmente adyuvantes inmunológicos terapéuticos. El transportador o transportadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatible con los ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el receptor de los mismos.

En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha el principio activo con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, llevar el producto en la formulación deseada. El término "transportador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier transportador, diluyente, excipiente, agente suspensor, agente lubricante,

adyuvante, vehículo, sistema de administración, emulsionante, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, aromatizante, o edulcorante. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitarias y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, o intraperitoneal, nasal, etc., comprenden convenientemente soluciones acuosas estériles del (de los) principio(s) activo(s) con soluciones que son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor. Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse también por vía oral, parenteral, mediante pulverizador de inhalación, tópica, rectal, bucal, vaginal o mediante depósito implantado en formulaciones farmacéuticas que contienen transportadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por vía intratecal, intraventricular, intraesternal e intracraneal o técnicas de infusión.

15 Dichas formulaciones pueden prepararse convenientemente disolviendo principios activos sólidos en agua conteniendo sustancias compatibles tales como cloruro de sodio (por ejemplo, 0,1-2,0 M), glicina, y similares, y que tienen un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa y volver la solución estéril. Estas pueden estar presentes en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales precintados.

20 Los compuestos de la presente divulgación también se pueden administrar en forma de preparaciones inyectables estériles, por ejemplo, como suspensiones inyectables acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia haciendo uso de agentes dispersantes o hidratantes y agentes suspensores adecuados. Las preparaciones estériles inyectables pueden ser también soluciones o suspensiones inyectables estériles en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable desde el punto de vista parenteral, por ejemplo, como soluciones en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente, aceites fijos estériles en forma de disolventes o como medio de suspensión. Con este fin, se puede emplear cualquier aceite blando fijo incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos, incluyendo aceite de oliva y aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas son útiles en la preparación de inyectables. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden también contener diluyentes o dispersantes alcohólicos de cadena larga.

35 Los compuestos de esta divulgación se pueden administrar por vía tópica, especialmente cuando las condiciones dirigidas al tratamiento implican áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica que incluyen trastornos del ojo, la piel, o del tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas.

40 Para la aplicación tópica en el ojo, o el uso oftálmico, los compuestos se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, de pH ajustado, o preferentemente, como soluciones salinas estériles isotónicas, de pH ajustado, tanto con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, los usos oftálmicos de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se pueden formular en una pomada tal como vaselina blanca.

45 Para aplicar a la piel por vía tópica, los compuestos se pueden formular con una pomada adecuada que contiene el compuesto suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de lo siguiente: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, los compuestos se pueden formular en una loción o crema adecuada que contiene el principio activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, ésteres de cetilo de cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

55 La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales transportadores para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular. Algunos factores incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, el estado de salud general, sexo, y la dieta de los pacientes; el momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, y la gravedad de la enfermedad concreta que se está tratando y la forma de administración.

60 Se pueden emplear también los métodos farmacéuticos para controlar la duración de la actuación. Se pueden conseguir preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímero para complejar o absorber el péptido. Se puede ejercitar la administración controlada seleccionando las macromoléculas adecuadas (por ejemplo, poliéster, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilenvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas, así como los métodos de incorporación con el fin de controlar la liberación.

65 Por ejemplo, Se puede incorporar la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® en una matriz polimérica hidrófoba para la liberación controlada durante un periodo de días. Dichas películas de liberación controlada don

bien conocidas en la materia. Particularmente preferidos son los sistemas de administración transdérmicos. Otros ejemplos de polímeros comúnmente empleados para este fin que se pueden usar en la presente invención incluyen un copolímero de etileno-acetato de vinilo no degradable y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico que se pueden usar externa o internamente. Determinados hidrogeles tales como poli(hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol

5 vinílico) pueden ser también útiles, pero para ciclos de liberación más cortos, entonces, los otros sistemas de liberación de polímeros, tal como los mencionados anteriormente.

Como alternativa, en vez de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas de administración de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas o en macroemulsiones,.

10

Para ser terapéuticamente eficaz como dianas del sistema nervioso central, La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® debe también penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica cuando se administra periféricamente. Los compuestos que no pueden penetrar la barrera hematoencefálica pueden administrarse eficazmente mediante una ruta intraventricular u otro sistema de administración adecuado para la administración al cerebro.

15

La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® puede también suministrarse en la forma de un kit, solo, o en la forma de una composición farmacéutica como se describe anteriormente. La administración de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se puede llevar a cabo mediante métodos convencionales. Por ejemplo, La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se puede usar en un diluyente adecuado tal como solución salina o agua, o adyuvantes completo o incompleto. La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se puede administrar mediante cualquier ruta adecuada para la estimulación del sistema inmunitario, tal como intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, nasal, oral, rectal, vaginal, y similares.

20

25

Tal como se ha indicado anteriormente, La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® puede ser tanto para fines profilácticos como terapéuticos. Cuando se proporciona profilácticamente, La inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se proporciona antes de cualquier evidencia o por adelantado de cualquier síntoma debido a enfermedad. Cuando se proporciona terapéuticamente, la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® se proporciona durante (o después) del inicio de la enfermedad o al inicio de cualquier síntoma de la enfermedad. La administración terapéutica de la inyección de interleuquina leucocitaria (LI) o Multikine® sirve para atenuar la enfermedad y mejora los resultados del tratamiento convencional.

30

35

Una vez descrita la divulgación de esta manera; será evidente que la misma puede variarse de muchas maneras.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad terapéuticamente activa de una mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno para la fabricación de un medicamento para presensibilizar tumores de carcinoma espinocelular antes de un tratamiento terapéutico, en donde dicha mezcla de citoquinas comprende las relaciones específicas de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF a interleuquina 2 (IL-2) como sigue:
- 5 (a) IL-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 0,4 - 1,5;
 (b) TNF- α a IL-2 en un intervalo de relación de 3,2 - 11,3;
 10 (c) IFN- γ a IL2 en un intervalo de relación de 1,5 - 10,9; y,
 (d) GM-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,2 - 4,8,
- en donde la mitad de dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar peritumoralmente en un margen perimetral de la masa tumoral y la otra mitad de dicha mezcla se va a administrar en la cadena linfática submandibular ipsilateral respecto a la masa tumoral tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1600 UI en donde UI representa unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 15 2. Uso de una cantidad terapéuticamente activa de una mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno para la fabricación de un medicamento para presensibilizar tumores de carcinoma espinocelular antes de un tratamiento terapéutico, en el que dicha mezcla de citoquinas comprende las relaciones específicas de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y GM-CSF a interleuquina 2 (IL-2) como sigue:
- 20 (a) IL-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 0,4 - 1,5;
 (b) TNF- α a IL-2 en un intervalo de relación de 3,2 - 11,3;
 (c) IFN- γ a IL2 en un intervalo de relación de 1,5 - 10,9; y,
 25 (d) GM-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,2 - 4,8,
- 30 en donde dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar perilinfáticamente tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas entre aproximadamente 20 UI a 1600 UI en donde UI representa las unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 35 3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho tratamiento terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que la mitad de dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar peritumoralmente en un margen perimetral de la masa tumoral y la otra mitad de dicha mezcla se va a administrar en la cadena linfática submandibular ipsilateral respecto a la masa tumoral tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 40 UI a 800 UI en donde UI representa unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 40 5. El uso de la reivindicación 1, en el que la mitad de dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar peritumoralmente en un margen perimetral de la masa tumoral y la otra mitad de dicha mezcla se va a administrar en la cadena linfática submandibular ipsilateral respecto a la masa tumoral tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas a 400 UI en donde UI representa unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 45 50 6. El uso de la reivindicación 1, en el que la mitad de dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar peritumoralmente en un margen perimetral de la masa tumoral y la otra mitad de dicha mezcla se va a administrar en la cadena linfática submandibular ipsilateral respecto a la masa tumoral tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas a 800 UI en donde UI representa unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 55 7. El uso de la reivindicación 1, en el que la mitad de dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar peritumoralmente en un margen perimetral de la masa tumoral y la otra mitad de dicha mezcla se va a administrar en la cadena linfática submandibular ipsilateral respecto a la masa tumoral cinco veces a la semana durante un periodo de dos semanas a 800 UI en donde UI representa unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 60 65

- 5 8. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar perilinfáticamente tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas entre aproximadamente 40 UI a 800 UI en donde UI representa las unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 10 9. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar perilinfáticamente tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas a aproximadamente 400 UI en donde UI representa las unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 15 10. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar perilinfáticamente tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas a aproximadamente 800 UI en donde UI representa las unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 20 11. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha mezcla de citoquinas exenta de suero y exenta de mitógeno se va a administrar perilinfáticamente cinco veces a la semana durante un periodo de dos semanas a aproximadamente 800 UI en donde UI representa las unidades internacionales para la interleuquina 2 proporcionadas en el 1^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la IL-2 Humana, 86/504.
- 25 12. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la mezcla de citoquina comprende, además
- (a) una relación de IL-3 a IL-2 en un intervalo de relación de 0,38 - 0,68, preferentemente a 0,53+/- 0,15;
 - (b) una relación de IL-6 a IL-2 en un intervalo de relación de 37,2 - 53,8, preferentemente a 46+/- 5,9;
 - (c) una relación de IL-8 a IL-2 en un intervalo de relación de 261 - 561,5, preferentemente a 411+/- 10,6;
 - (d) una relación de IL-1 a IL-2 en un intervalo de relación de 0,56 - 0,94, preferentemente a 0,75+/- 0,19;
 - (e) una relación de IL-10 a IL-2 en un intervalo de relación de 2,82 - 3,22, preferentemente a 3,0+/- 0,18;
 - (f) una relación de IL-16 a IL-2 en un intervalo de relación de 1,16 - 2,84, preferentemente a 1,84+/- 0,68;
 - (g) una relación de G-CSF a IL-2 en un intervalo de relación de 2,16 - 3,78, preferentemente a 2,97+/- 0,81;
 - (h) una relación de TNF- β a IL-2 en un intervalo de relación de 1,17 - 2,43, preferentemente a 1,8+/- 0,63;
 - (i) una relación de MIP-1 α a IL-2 en un intervalo de relación de 15,7 - 37,16, preferentemente a 22,7+/- 7,0;
 - (j) una relación de MIP-1 β a IL-2 en un intervalo de relación de 17,1 - 28,5, preferentemente a 22,8+/- 5,7;
 - (k) una relación de RANTES a IL-2 en un intervalo de relación de 2,3 - 2,7, preferentemente a 2,5+/- 0,13;
 - (l) una relación de EGF a IL-2 en un intervalo de relación de 0,267 - 0,283, preferentemente a 0,275+/- 0,008;
 - (m) una relación de PGE a IL-2 en un intervalo de relación de 3,63 - 5,42, preferentemente a 4,5+/- 0,87; y/o
 - (n) una relación Tx_{B2} a IL-2 en un intervalo de relación de 23,47 - 25,13, preferentemente a 24,3+/- 0,83.
- 35

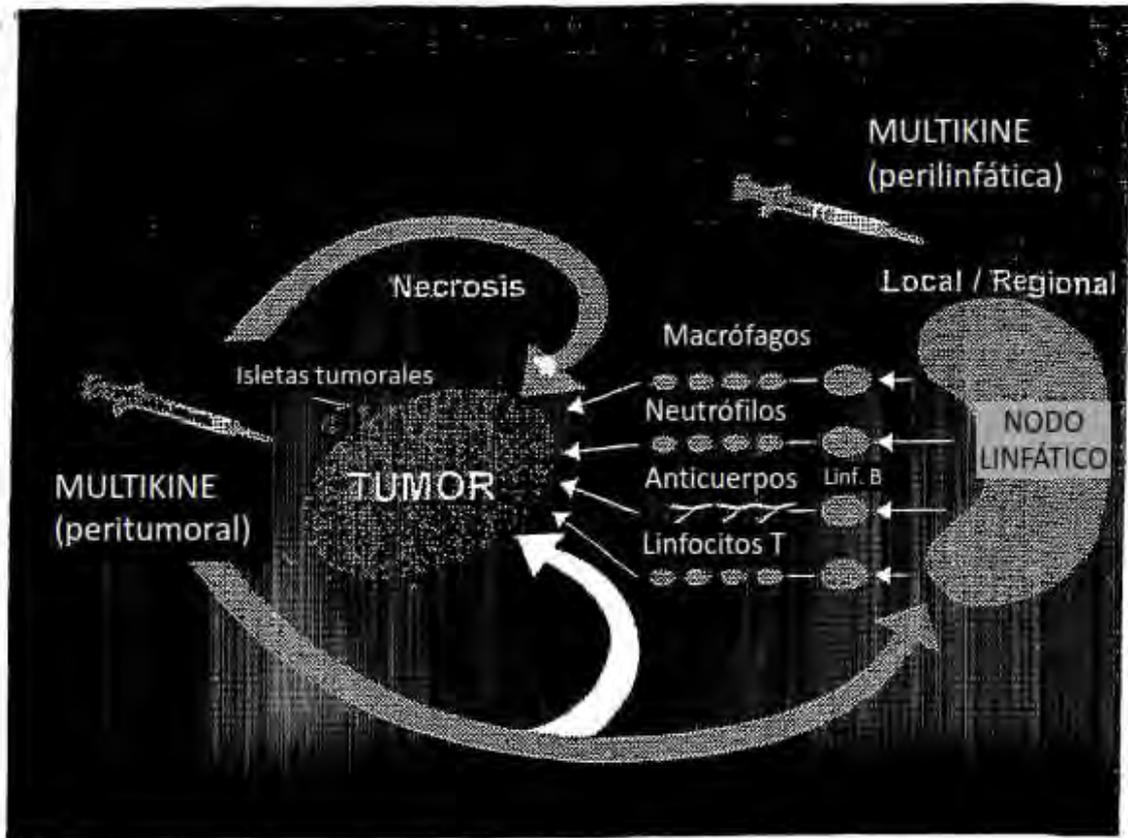


Fig. 1

Fig. 2

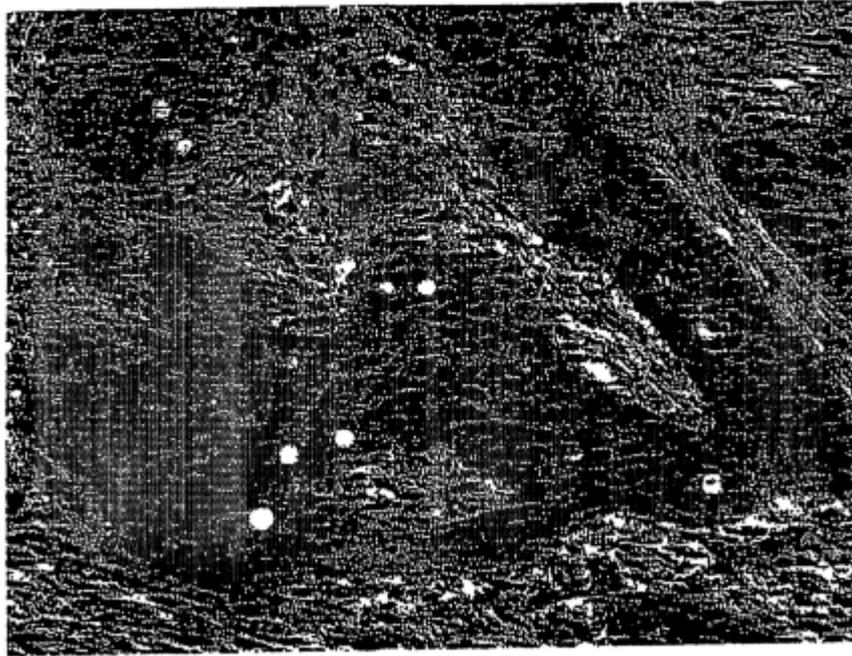


Fig. 3

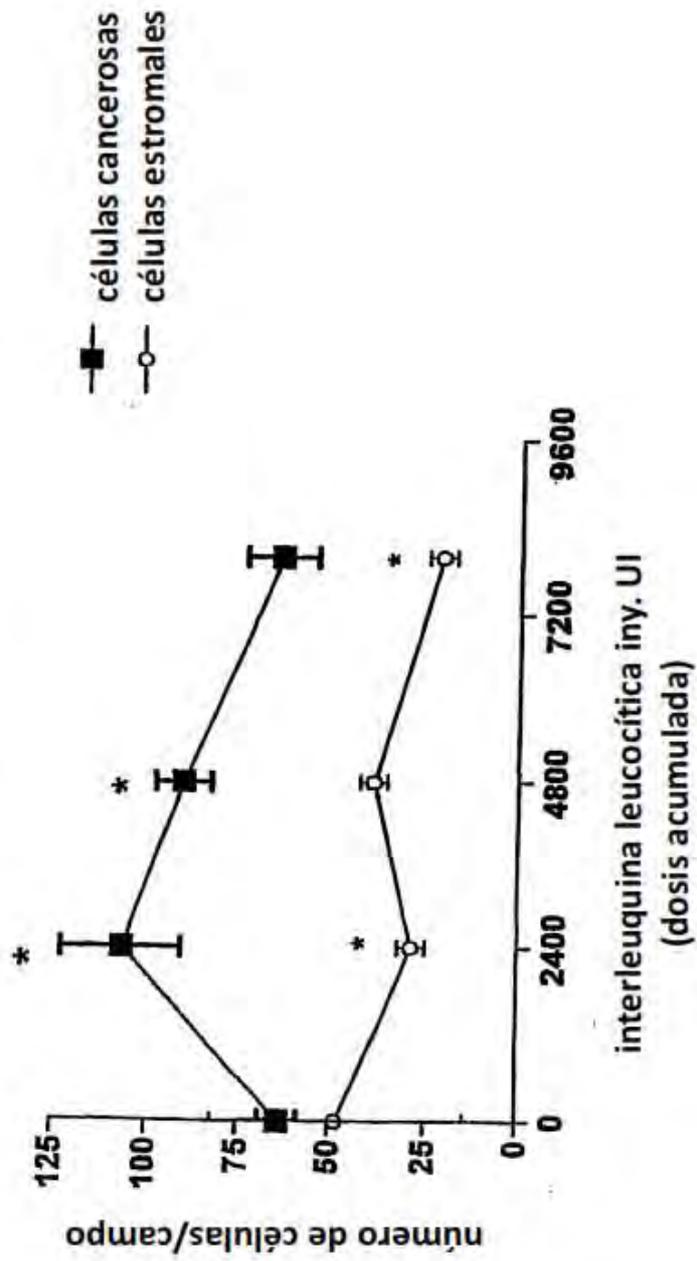


Fig. 4

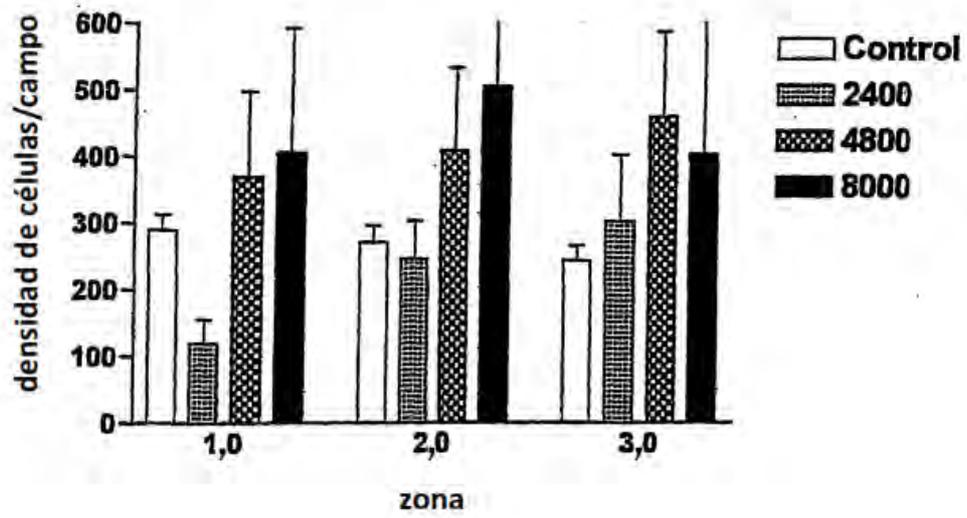


Fig. 5

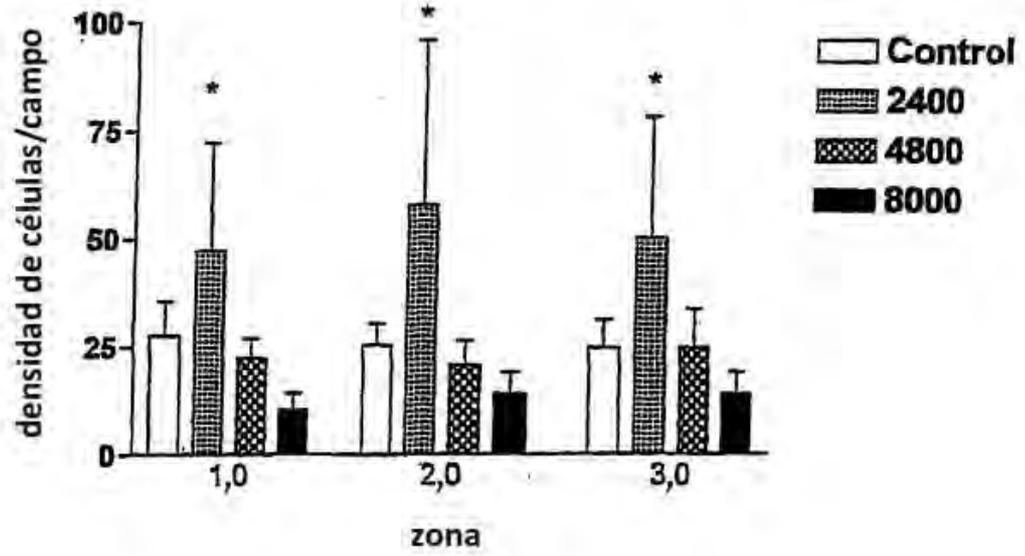


Fig. 6

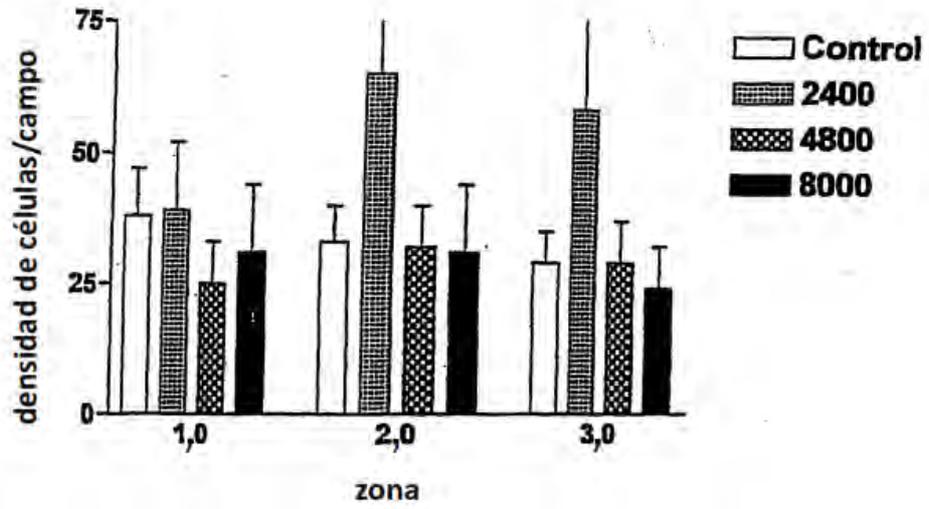


Fig. 7

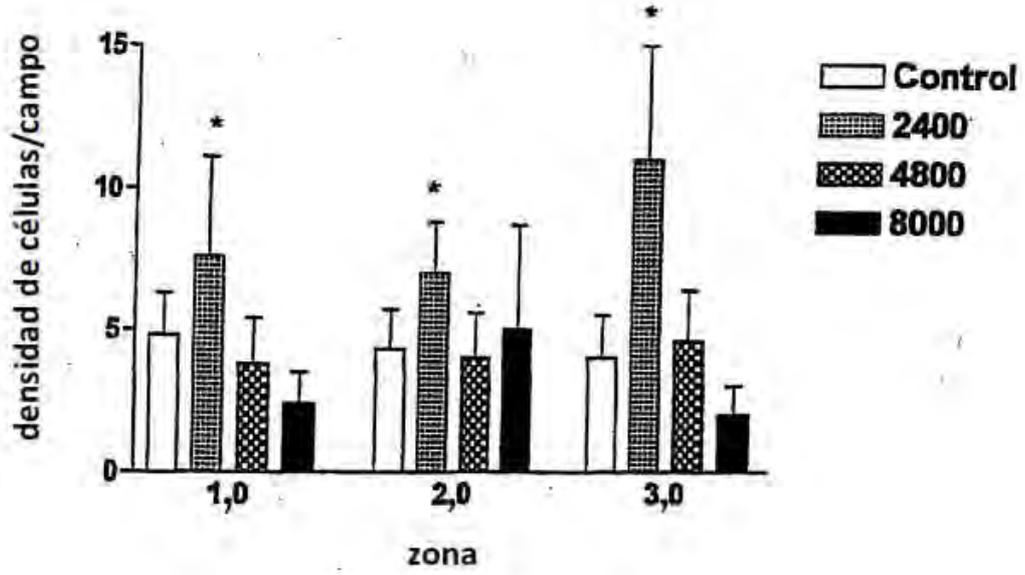


Fig. 8

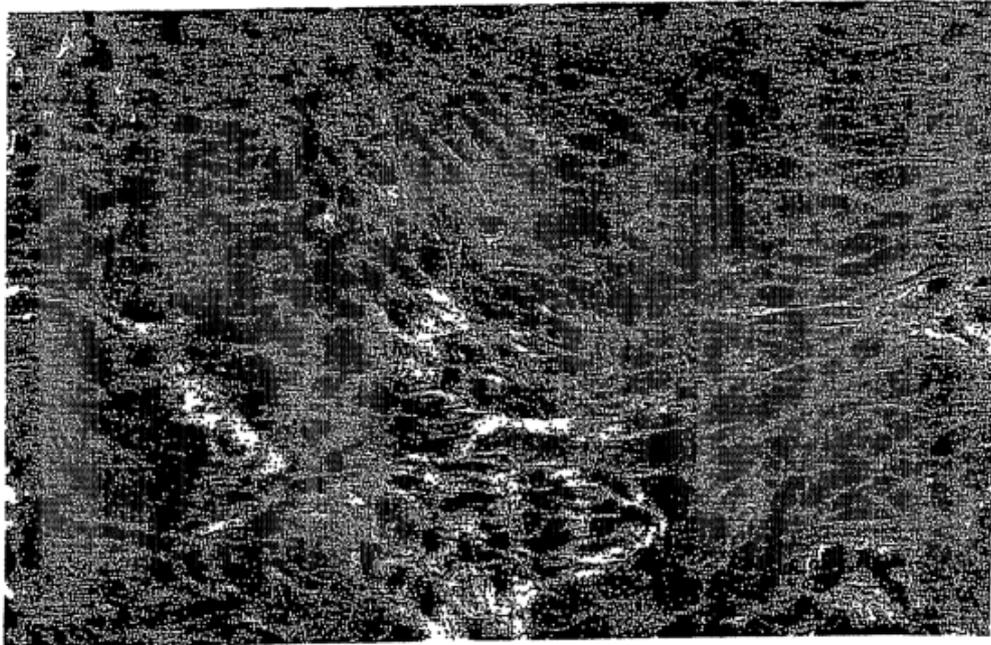


Fig: 9

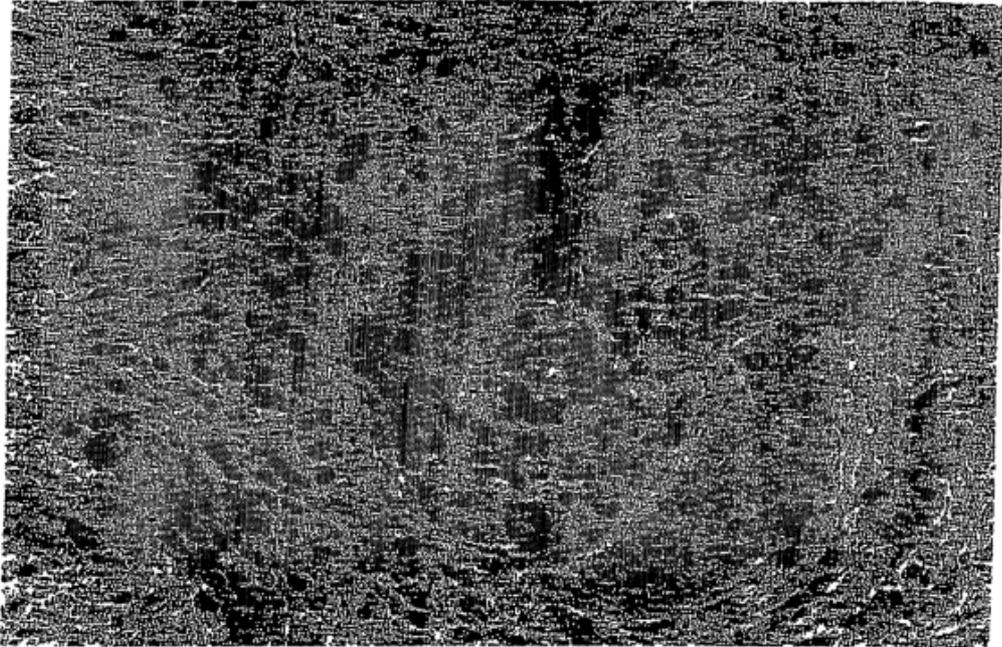


Fig. 10

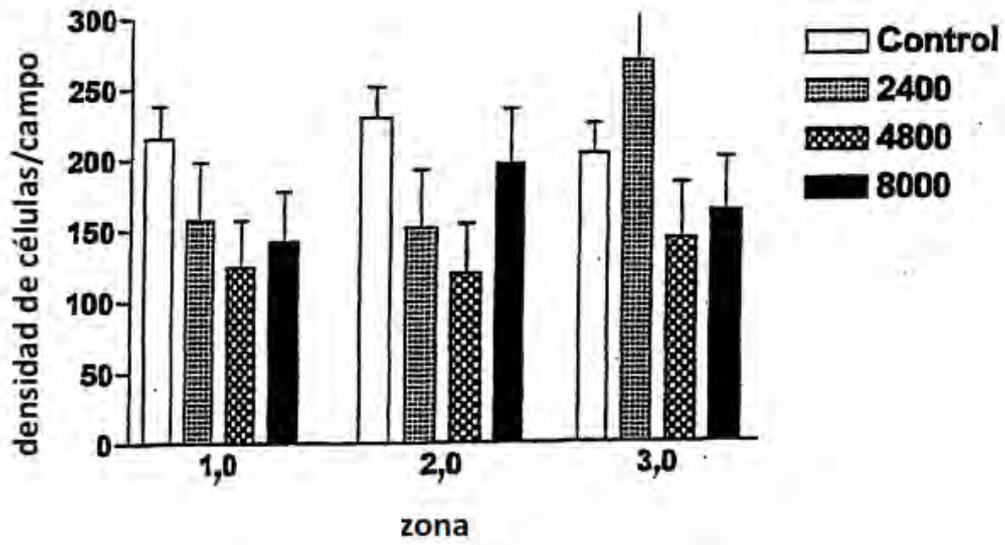


Fig. 11

