

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 887**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2008 PCT/US2008/084789**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2009 WO09070639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08854580 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2234642**

54 Título: **Procedimiento para aumentar el efecto inmunológico**

30 Prioridad:

28.11.2007 US 990759 P
29.05.2008 US 56925 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:

IRX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
654 Madison Avenue, Suite 1601
New York, NY 10065, US

72 Inventor/es:

SIGNORELLI, KATHY, L.;
CZYSTOWSKA, MARGARETA;
EGAN, JAMES, E.;
BRANDWEIN, HARVEY;
WHITESIDE, THERESA, L. y
HADDEN, JOHN, W.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 653 887 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

Procedimiento para aumentar el efecto inmunológico.

Antecedentes de la invención

(1) Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la terapia del sistema inmunitario. En particular, la presente invención se refiere a un componente biológico derivado de células primarias y al uso del mismo.

(2) Descripción de la técnica relacionada

10 En un sistema inmunitario funcional y capaz, las células dendríticas inmaduras capturan antígenos y migran a los ganglios linfáticos, donde maduran. Las células dendríticas maduras resultantes pueden, entonces, activar células T vírgenes, creando células T citotóxicas específicas de antígeno que luego proliferan, entran en la circulación y buscan y destruyen la diana antigénica. En general, esta es una respuesta poderosa, eficaz y rápida. Por ejemplo, el sistema inmunitario puede eliminar un contagio por gripe entre 7-12 días.

15 Las dianas antigénicas solo se pueden eliminar si el sistema inmunitario es capaz. Los tumores y otras diversas dianas antigénicas han desarrollado estrategias eficaces para eludir satisfactoriamente el sistema inmunitario del anfitrión, y se han identificado varios mecanismos moleculares y celulares responsables de la elusión del tumor. Algunos de estos mecanismos se dirigen a las células efectoras antitumorales inmunitarias. Por ejemplo, la disfunción y apoptosis de estas células en el anfitrión portador del tumor crea un desequilibrio inmunitario que no puede ser corregido mediante inmunoterapias dirigidas solo a la activación de respuestas inmunitarias antitumorales.

20 La apoptosis, o muerte celular de Tipo I, es un tipo de muerte celular programada y puede ser inducida por estrés, infección o daño en el ADN. La apoptosis es un proceso integral durante el desarrollo; sin embargo, en ciertos casos, puede realmente causar daño. Por ejemplo, la apoptosis de poblaciones de linfocitos/hematopoyéticas, que incluyen las células T, puede ser un problema grave durante la quimioterapia y/o la radioterapia relacionadas con el tratamiento del cáncer. Estas células tienden a ser sensibles a la quimioterapia y la radioterapia.

25 Hay dos mecanismos importantes que controlan la apoptosis en la célula, la vía del p53 (pro-apoptótica) y la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (anti-apoptótica). Ambas rutas se desregulan a menudo en tumores, ya que el p53 se pierde habitualmente, mientras que NF- κ B se vuelve activa de forma constitutiva.

30 Se cree que la apoptosis de linfocitos inducida por tumor desempeña una función significativa en la inmunosupresión observada en pacientes con cáncer. La apoptosis de células efectoras antitumorales se ha asociado con la expresión de FasL en la superficie de las células tumorales. Esto se basa en pruebas bien documentadas de que las interacciones Fas/FasL desempeñan una importante función en la modulación a la baja de las funciones inmunitarias, que incluyen el desencadenamiento de la muerte celular inducida por activación (AICD), para mantener tolerancia central y periférica. Muchos tumores humanos expresan FasL y pueden eliminar linfocitos efectoras Fas+ activados a través de la vía Fas/FasL. Se ha demostrado que la expresión de FasL en células tumorales se correlaciona negativamente con el pronóstico del paciente. Además, se ha demostrado que los tumores pueden liberar FasL asociado a la membrana a través de la secreción de microvesículas (MV) membranosas, proporcionando de ese modo una explicación a la apoptosis espontánea de los linfocitos T observada en la circulación periférica de pacientes con cáncer.

40 Los solicitantes mostraron previamente que las MV detectadas en sueros de pacientes con carcinoma oral indujo la degradación de caspasa-3, fragmentación del ADN, liberación de citocromo c, pérdida de potencial de membrana mitocondrial (MMP) y regulación a la baja de la cadena ζ del TCR en linfocitos T activados. Además, los solicitantes demostraron que estas MV derivadas del tumor son distinguibles de las MV derivadas de células inmunitarias por su perfil molecular único y sus propiedades inmunosupresoras. Datos recientes también indican que las MV están presentes en sueros de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (H&NSCC) y que estas MV contienen FasL biológicamente activo que puede estar involucrado en mediar en la lisis de células T positivas al Fas en la circulación periférica. Por ello, la actividad de MV derivadas de tumor podría contribuir de forma significativa a la disfunción y muerte de células T efectoras en pacientes con cáncer. La pérdida de estas células podría ser responsable de una función antitumoral inadecuada y, por extensión, respuestas inmunitarias inadecuadas a las vacunas contra el cáncer.

50 Se ha demostrado de forma convincente que H&NSCC puede inducir defectos funcionales y apoptosis en células efectoras inmunitarias así como en células presentadoras de antígenos (APC) mediante diversos mecanismos. En estudios previos, los solicitantes han observado un alto nivel de apoptosis de linfocitos de infiltración en el tumor (TIL) y linfocitos T en la circulación periférica de pacientes con H&NSCC y melanoma. Los solicitantes demostraron que las células T CD8+ eran más sensibles a la apoptosis que las células CD4+, y que las subpoblaciones efectoras y específicas de tumor de las células T CD8+ se dirigen preferentemente a la apoptosis. Además, individuos con VIH en general experimentan inmunosupresión causada por reducciones drásticas de las poblaciones de células T colaboradoras. Esta reducción es causada por apoptosis de las células T colaboradoras infectadas por VIH.

Los mecanismos responsables de la disfunción de las células inmunitarias en pacientes con cáncer son numerosos y variados. Además de una amplia variedad de factores inmunosupresores solubles tales como PGE2, TGF- β , IL-10 y VEGF, y ligandos pro-apoptóticos tales como FasL (descritos anteriormente) que son liberados por las células tumorales u otras células en el microentorno tumoral, se ha demostrado que las poblaciones de células supresoras, es decir, las células T reguladoras (Treg), desempeñan una función clave en la regulación a la baja de la inmunidad antitumoral del anfitrión.

En conjunto, estos mecanismos crean un entorno nocivo, que explica el fracaso de las propuestas de inmunoterapia en el pasado. Para tener un resultado terapéutico eficaz, estos mecanismos de inmunosupresión inducidos por el tumor deben abordarse directamente. Con el recién adquirido conocimiento de las múltiples causas de la disfunción inmunitaria observada en pacientes con cáncer, cada vez es más evidente que se necesitan múltiples componentes activos para crear una inmunoterapia eficaz contra el cáncer. Sin embargo, ha habido muchas dificultades para encontrar una inmunoterapia eficaz y comprender su mecanismo de acción.

Desde las regresiones tumorales inducidas por toxinas del cáncer humano logradas por William Coley a principios del siglo XX, los terapeutas del cáncer han empleado cientos de diferentes terapias inmunológicas con respuestas clínicas relativamente raras. Debido a que hubo poca o ninguna comprensión de la causa de estas fallas, no surgió ningún mecanismo de acción coherente. Con el fin de establecer un claro mecanismo de acción, fue necesario idear una terapia que pudiera producir de manera coherente una respuesta que luego pudiera examinarse.

El cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (H&NSCC) ofrece un buen modelo ya que se sabe mucho acerca de los defectos inmunitarios observados en estos pacientes. Incluyen, por nombrar algunos, anergia y agotamiento de los linfocitos T (Whiteside, 2001; Hadden, 1995): 1) inducidos por el tumor y un mecanismo mediado por el anfitrión que incluye prostaglandinas, Treg, células supresoras mieloides, complejos antígeno-anticuerpo y citocinas como IL-10; 2) defectos funcionales de monocitos/macrófagos con prueba de supresor y cambios inflamatorios (Mantovani, 2002); y 3) defectos de células dendríticas (CD) caracterizados por histiocitosis sinusal (SH) (Dunn, 2005).

Se necesitaron esfuerzos terapéuticos eficaces para revertir estos defectos múltiples. Una extensa revisión de la bibliografía (Hadden, 1995) y una serie de experimentos preclínicos dieron como resultado el protocolo componente biológico derivado de células primarias (también conocido como IRX-2). El protocolo IRX-2, que se muestra en la Figura 1, emplea una dosis inicial de ciclofosfamida (CY) de baja dosis (300 mg/m²) por infusión intravenosa para invertir la supresión por las Treg y quizás otras formas de supresores. La CY es seguida por 10-20 inyecciones diarias de IRX-2 en la base del cráneo para alimentar las cadenas yugulares de los ganglios linfáticos regionales del cáncer.

Inicialmente, se pensó que IRX-2 actuaba mediante el aumento del número y la función de los linfocitos T. La prueba reciente indica que la inversión de la apoptosis inducida por tumor es también un mecanismo importante, como se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º 60/990.759 de Signorelli, y col., Indometacina (INDO) se administró diariamente durante aproximadamente 21 días para bloquear la producción de prostaglandinas por tumor y monocitos/macrófagos, un mecanismo conocido de supresión relacionado con el cáncer. El zinc también se administró como otro aspecto del componente inmunorrestaurador de la estrategia (Hadden, 1995).

Además, en el momento en que se desarrolló el protocolo, se desconocía la función crítica desempeñada por las células dendríticas como presentadores de antígeno tumoral a las células T. También se desconocía que la histiocitosis sinusal (SH) reflejaba un defecto de las CD, y específicamente una falla de la maduración inducida por el tumor y presentación de antígeno. Los estudios de mecanismo de acción descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 6.977.072 y 7.153.499 de los solicitantes dejaron claro que el protocolo IRX-2 invierte este defecto de las CD y produce cambios en los ganglios linfáticos regionales que reflejan una potente inmunización (Meneses, 2003). Más específicamente, estas patentes describen un procedimiento de inducción de la producción de células T vírgenes y restaurar la inmunidad de las células T mediante la administración de IRX-2, que preferiblemente incluye las citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, INF- γ y TNF- α . Esta fue una de las primeras demostraciones de que los humanos adultos pueden generar células T vírgenes a través del tratamiento molecular. La presencia de células T vírgenes disponibles para enfrentar al antígeno fue importante para restaurar la inmunidad.

La hipótesis mecanicista que apuntala IRX-2 es similar a la de una vacuna terapéutica contra el cáncer, aunque no se requiere antígeno exógeno. Cuando se administra en el cuello, se cree que el agente actúa en la cadena del ganglio linfático cervical directamente en las CD para fomentar su maduración y la posterior capacidad de presentación de antígeno tumoral endógeno a las células T vírgenes.

Los datos no clínicos con respecto al mecanismo de acción de IRX-2 han demostrado que el agente estimula y activa eficazmente las CD derivadas de monocitos humanos (Egan, 2007). El tratamiento con IRX-2 de las CD inmaduras aumentó la expresión de CD83 y CCR7 (marcadores de maduración y migración a los ganglios linfáticos, respectivamente), así como las moléculas de diferenciación que son importantes para la presentación de antígenos a las células T vírgenes. Además, IRX-2 induce CD40, CD54 y CD86, que son receptores coestimuladores que son críticos para la activación de las células T vírgenes. Los cambios funcionales en las CD tratadas con IRX-2 incluyeron un aumento en la presentación de antígenos y en la actividad de las células T. Tomado colectivamente, el

tratamiento con IRX-2 de la CD inmadura conduce a cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales que son coherentes con el desarrollo de CD maduras y activadas que pueden estimular de forma eficaz las células T vírgenes.

5 En contraste con las vacunas terapéuticas contra el cáncer basadas en antígeno definidas donde se puede medir la reactividad específica de antígeno, no se han descubierto antígenos de rechazo en H&NSCC, limitando así la capacidad de medir la reactividad específica de antígeno después de la terapia con IRX-2.

10 Aunque se demostró que IRX-2 aumentaba la función de los linfocitos T y generaba nuevas células T inmaduras, no hubo divulgación o sugerencia y, por ello, ninguna demostración concluyente de que IRX-2 impidiera la apoptosis de aquellas células T una vez generadas y no se sabía cuál era la función de las células T después de la presentación de antígeno. No hubo resultados experimentales que mostraran que la apoptosis de las células T impidiera ni aún sugiriera el mecanismo de acción. La proliferación y la apoptosis son procesos celulares separados y sería imprudente suponer que un factor que causa la proliferación necesariamente protegiera de la muerte celular programada. El mecanismo exacto mediante el cual IRX-2 restaura la respuesta antitumoral de las células T, y evita su apoptosis, no se describió ni de forma implícita ni intrínseca en la técnica anterior. Además, aunque se demostró que IRX-2 era eficaz en los mecanismos descritos anteriormente durante el tratamiento del cáncer, no ha habido ninguna prueba de que IRX-2 proporcione el mismo mecanismo de acción en otros casos de supresión inmunitaria además del cáncer.

20 No solo las citocinas individuales no han podido restaurar completamente cada parte del sistema inmunitario a través de fomentar la maduración de las CD, la generación de nuevas células T y la prevención de su apoptosis, sino que otros tratamientos que incluyen citocinas múltiples tampoco han podido hacer esto. Por ejemplo, MULTIKINE® (Cel-Sci) es eficaz solo en el tumor mismo, afectando al ciclo celular de las células tumorales. PROVENGE® (sipuleucel-T, Dendreon), GVAX® (Cell Genesys), PROMUNE® (Coley Pharmaceutical Group), Dynavax TLR 9 ISS, ONCOPHAGE® (vitespen, Antigenics), CANVAXIN® (CancerVax) y TROVAX® (Oxford BioMedica) han podido mostrar la amplificación de antígenos, el procesamiento de células dendríticas y cierta potenciación celular. TREMELIMUMAB® (Pfizer) e IPILIMUMAB® (Medarex y Bristol-Myers Squibb) solo se dirigen a la población de células T reguladoras.

30 Además, algunos agentes terapéuticos han abordado el problema de la apoptosis de las células. Existen varios agentes componente biológicos y pequeñas moléculas que se han desarrollado para impedir la apoptosis celular y de linfocitos. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO/2006/039545 de Maxim Pharmaceuticals, Inc. describe la administración de un inhibidor de PARP-1 y además un inhibidor de la producción o liberación de metabolitos de oxígeno reactivos (ROM) para proteger de apoptosis a los linfocitos tumorales, incluidos los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Se puede coadministrar una composición estimuladora de linfocitos citotóxicos que incluya diversas citocinas. Esta solicitud informa que los radicales libres producidos por los fagocitos adyacentes al tumor causan disfunción y apoptosis en linfocitos tumorales o citotóxicos.

35 La publicación de solicitud de patente internacional WO/2005/056041 de Cleveland Clinic Foundation describe TGF- β latente como un compuesto que puede usarse para proteger a un paciente de tratamientos que inducen apoptosis. El TGF- β latente induce la actividad de NF- κ B, evitando así la apoptosis.

40 La publicación de solicitud de patente internacional WO/2007/060524 de la Fundación de la Comunidad Valenciana divulga diversos compuestos anillados que son inhibidores de Apaf-1 y, por lo tanto, actúan como inhibidores de la apoptosis. Apaf-1 es un factor apoptótico de activación de la proteasa que forma parte de un apoptosoma. Capsasa-9 se activa dentro del apoptosoma e inicia señales apoptóticas.

La amifostina (ETHYOL, MedImmune) es otro compuesto que se administra para reducir las toxicidades resultantes de la quimioterapia y de la radioterapia. Más específicamente, es un agente intravenoso citoprotector de tiofosfato orgánico.

45 Hay varios inconvenientes para estos tratamientos actuales. Para los agentes componente biológicos, existe el problema de la dificultad en la fabricación y la posible dificultad en dirigirse específicamente a una población celular dada. Para moléculas pequeñas, puede haber un problema de toxicidad si se usa sistémicamente. Además, agentes con un único mecanismo de acción han mostrado falta de eficacia debido a las múltiples actividades que son necesarias para fomentar los efectos anti-apoptóticos en poblaciones celulares de linfocitos. También, ninguno de estos tratamientos aborda directamente el entorno inmunosupresor creado por el tumor. Por ello, en la técnica anterior están ausentes adyuvantes y propuestas eficaces para neutralizar la supresión inducida por tumor.

50 En esencia, el trabajo anterior de los solicitantes describió el mecanismo de acción del componente biológico derivado de células primarias con respecto a la maduración de CD y la generación de células T vírgenes, es decir, varios niveles específicos que afectan al sistema inmunitario. Presentada en el presente documento está la prueba de otro nivel de efecto del componente biológico derivado de células primarias, a saber, el fomento de la supervivencia de los linfocitos. Los datos del presente documento, tomados junto con las divulgaciones previas de los solicitantes, muestran que el componente biológico derivado de células primarias tiene un efecto correctivo y positivo sobre la generación y activación de efectores específicos, y su posterior supervivencia - cada nivel del

sistema inmunitario, es decir, cada brazo del sistema inmunitario. Las composiciones de la técnica anterior están dirigidas a solo uno de estos niveles.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de una composición que pueda potenciar eficazmente tanto la generación de efectores como la supervivencia de efectores y dirigirse a cada brazo del sistema inmunitario para restaurar el sistema inmunitario y proporcionar un mecanismo de acción completo contra la supresión inmunitaria.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere al uso de un componente biológico natural derivado de células primarias que comprende interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ), para prolongar la vida de las células T *in vitro*.

- 10 Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

Se comprenderán fácilmente otras ventajas de la presente invención ya que la misma llega a comprenderse mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera junto con los dibujos que se adjuntan en donde:

La Figura 1 es una visualización del protocolo IRX-2;

- 15 La Figura 2 es una representación del mecanismo de acción de IRX-2 en combinación con un inhibidor químico y AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo);

La Figura 3 es una representación del mecanismo de acción de IRX-2;

- 20 La Figura 4A muestra células Jurkat CD8+ analizadas por la unión a Anexina V mediante citometría de flujo, la Figura 4B muestra la activación de Caspasa detectada por tinción con FITC-VAD-FMK y citometría de flujo; la Figura 4C muestra el porcentaje medio \pm desviación estándar (SD) de las células Jurkat Anexina V-positivas/7-AAD-negativas después de la incubación con diversos agentes inductores de apoptosis, y la Figura 4D muestra el porcentaje medio \pm SD de células T Jurkat FITC-VAD-FMK+ después de la incubación con diversos agentes inductores de apoptosis;

- 25 La Figura 5A muestra un análisis de curso temporal de células Jurkat CD8+, y la Figura 5B muestra un análisis de curso de concentración;

La Figura 6 muestra un gráfico del porcentaje de células positivas a FITC-VAD-FMK para diversos tratamientos de células Jurkat CD8+;

La Figura 7 es un gráfico de la activación de Caspasa en células Jurkat CD8+ después del tratamiento con IRX-2 o citocinas y la incubación con microvesículas tumorales (MV);

- 30 La Figura 8A es un gráfico de células CD4+ preactivadas de la sangre periférica humana y la Figura 8B es un gráfico de células CD8+ preactivadas de la sangre periférica humana tratadas con MV tumorales (15 μ g) y tratadas previamente con las citocinas indicadas o IRX-2;

- 35 La Figura 9A es un gráfico de células CD4+ previamente activadas de la sangre periférica humana activada y la Figura 9B es un gráfico de células CD8+ preactivadas de la sangre periférica humana tratadas con Ab CH-11 (400 ng/ml) después del tratamiento previo con las citocinas indicadas o IRX-2;

La Figura 10A muestra la activación de caspasas-3 y -7 en células Jurkat CD8+ evaluadas mediante citometría de flujo para la unión caspasa 3/7-FAM, y la Figura 10B muestra transferencias Western que muestran la activación de caspasa-3 en células Jurkat CD8+;

- 40 La Figura 11A muestra que las células Jurkat CD8+ fueron analizadas mediante citometría de flujo para una disminución en la fluorescencia roja del colorante catiónico JC-1, indicando una pérdida de MMP, y la Figura 11B es un gráfico del porcentaje de células negativas al JC-1 rojo;

- 45 La Figura 12A es una microscopía de fluorescencia de células Jurkat CD8+ que no se trataron (a), se incubaron durante 24 horas con IRX-2 solo (b) o MV solo durante 24 horas (c), o se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 horas y, posteriormente, se trataron con MV durante 24 horas (d) y luego se tiñeron por el procedimiento TUNEL para revelar rupturas de cadena de ADN (núcleos rojos) indicativas de apoptosis, y la Figura 15B es un gráfico del porcentaje de células Jurkat CD8+ TUNEL-positivas en los anteriores cultivos conjuntos;

La Figura 13 muestra transferencias Western de células Jurkat CD8+ con diversos tratamientos;

- 50 La Figura 14A es un gráfico que muestra que el pretratamiento de células con IRX-2 invierte los cambios inducidos por MV en las proporciones de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, y la Figura 14B es un gráfico de puntos representativo y el histograma correspondiente que muestra que ese tratamiento con IRX-2 modula la expresión de

proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas;

La Figura 15A es una transferencia Western de células Jurkat CD8+ con diversos tratamientos, y la Figura 15B es un gráfico del porcentaje de células positivas a FITC-VAD-FMK;

La Figura 16 es un gráfico de la respuesta a la dosis *in vivo* para IRX-2;

5 La Figura 17 es un gráfico del porcentaje de supervivencia en cuatro grupos de pacientes;

La Figura 18 es un gráfico del porcentaje medio de infiltración de linfocitos en cuatro grupos de pacientes;

La Figura 19 es una fotografía de tinción con H & E para linfocitos;

La Figura 20 es una fotografía de tinción con H & E para la infiltración de linfocitos;

10 La Figura 21 es un gráfico de la densidad de infiltración linfoide en pacientes que responden al tratamiento, y la Figura 26B es un gráfico de la densidad de infiltración linfoide en los que no responden al tratamiento;

La Figura 22 es un gráfico de la ubicación de infiltrados de linfocitos intratumorales/peritumorales;

La Figura 23 es una fotografía de tinción de IHC para células T de memoria CD45RO+;

La Figura 24 es una fotografía de imágenes fusionadas con exploración PET/CT con FDG el día 0 y el día 21;

La Figura 26 es un gráfico de supervivencia global para pacientes de la Fase IVa;

15 La Figura 27A es un gráfico del tamaño del ganglio, la Figura 27B es un gráfico del área de células T, la Figura 27C es un gráfico de la histiocitosis sinusal, y la Figura 27D es un gráfico de la densidad de células T en comparación con controles, controles H&NSCC y pacientes con H&NSCC administrados con IRX-2;

20 La Figura 28A es una fotografía de tinción con H & E de un típico ganglio linfático en un paciente con cáncer de cabeza y cuello con histiocitosis sinusal. La Figura 28B es una fotografía de tinción con H & E y CD68 de un típico ganglio linfático en un paciente con cáncer de cabeza y cuello con histiocitosis sinusal. La figura 28C es una fotografía de tinción con H & E de un ganglio linfático con congestión de eritrocitos en un paciente con cáncer de cabeza y cuello con histiocitosis sinusal, y la figura 28D es un gráfico que muestra que el tratamiento con IRX-2 aumenta el número de células dendríticas activadas en los ganglios linfáticos;

25 Las Figuras 29A-C son fotografías de la tinción con H & E de muestras tumorales de pacientes con cáncer de cabeza y cuello que muestran una falta de infiltración de linfocitos;

Las Figuras 29D-F son fotografías de tinción con H & E de muestras tumorales de pacientes con cáncer de cabeza y cuello después del tratamiento con IRX-2 que muestran una falta de infiltración de linfocitos;

La Figura 30 es un gráfico de fibrosis y necrosis en pacientes que responden al tratamiento y en los que no responden;

30 La Figura 31A es una fotografía de la fragmentación tumoral, la Figura 31B es una fotografía de la infiltración de linfocitos, y las Figuras 31C-D son fotografías de células T asesinas;

La Figura 32 es una visualización del mecanismo de la función de las células dendríticas que restauran IRX-2 mediante la regulación al alza de los receptores clave de activación;

35 La Figura 33A es un gráfico del aumento de presentación de antígeno (HLA-DR) por IRX-2, y la Figura 33B es un gráfico de aumento de la estimulación conjunta (CD86) por IRX-2;

La Figura 34A es un gráfico de regulación al alza de CD40 por IRX-2, y la Figura 34B es un gráfico de regulación al alza de CD54 por IRX-2;

La Figura 35 es un gráfico de la expresión de CD83 con IRX-2;

40 La Figura 36 es un gráfico de la estimulación de células T mediadas por células dendríticas después del tratamiento con IRX-2;

La Figura 37A es un gráfico de hipersensibilidad de tipo retardado y la Figura 37B es un gráfico del aumento de IFN- γ con IRX-2;

La Figura 38 es un gráfico de la hipersensibilidad de tipo retardado comparada a través de los tratamientos;

La Figura 39 es una visualización de la prueba de acción sobre las células inmunitarias en la circulación periférica;

45 La Figura 40 es un gráfico de recuentos de Treg con tratamiento con IRX-2; y

La Figura 41A es una imagen de un pretratamiento tumoral con IRX-2, y la Figura 46B es una imagen de un postratamiento del tumor con IRX-2.

Descripción detallada de la invención

5 En general, la presente invención se dirige a la aplicación del mecanismo de acción de un IRX-2 componente biológico derivado de células primarias naturales con respecto a la prolongación de la vida de los linfocitos *in vitro*.

Definiciones

10 Como se usa en el presente documento, el término "diana inmunitaria" se refiere a cualquier fuente antigénica o entidad que pueda convertirse en antigénica y afecte al paciente anfitrión. En general, tales dianas, tales como patógenos inmunogénicos y tumores, muestran antígeno de superficie que, de otro modo, induciría una respuesta inmunitaria en un paciente inmunitario capaz. Además, el antígeno exógeno puede hacer que, de otro modo, una diana inmunitaria no inmunogénica sea susceptible de ataque inmunitario en un paciente inmunitario capaz. Considerando específicamente la presente invención, la diana inmunitaria es inmunogénica o potencialmente inmunogénica a la que el sistema inmunitario no responde debido a la incapacidad inmunitaria por cualquier causa. En la presente invención, la diana inmunitaria está "dirigida" por el sistema inmunitario que se hace capaz por el
15 componente biológico derivado de células primarias que invierte la supresión inmunitaria y restaura el funcionamiento del sistema inmunitario.

20 La incapacidad inmunitaria puede ser causada por defectos genéticos en los componentes del sistema inmunitario (deficiencias inmunitarias intrínsecas o primarias). La supresión inmunitaria también puede ser causada por factores extrínsecos (deficiencias inmunitarias secundarias). Por ejemplo, enfermedades como el SIDA o el VIH, la irradiación (radioterapia), la quimioterapia, la malnutrición, las quemaduras, las infecciones y el cáncer (tumores) pueden causar la supresión inmunitaria.

25 Como se usa en el presente documento, "apoptosis" se refiere a la muerte celular. Como se indicó anteriormente, la apoptosis (muerte celular de Tipo I) es un tipo de muerte celular programada que se produce por diversas razones, como estrés, infección o daño en el ADN. La apoptosis de linfocitos puede ser inducida por diversos fenómenos, tales como, pero sin limitarse a ellos, las terapias relacionadas con el cáncer (quimioterapia y radiación) y los propios tumores, que producen factores que inducen apoptosis.

30 Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de componente biológico derivado de células primarias que se necesita para lograr el resultado deseado de la presente invención, a saber, proteger contra la apoptosis a linfocitos y otros componentes hematopoyéticos así como activar el sistema inmunitario para atacar una diana inmunitaria. El experto en la materia puede determinar la cantidad eficaz del componente biológico derivado de células primarias que se debe administrar a un paciente en particular.

35 Como se usa en el presente documento, "aumentar el efecto inmunológico" se refiere al proceso de cambiar un sistema inmunitario incapaz por un sistema inmunitario capaz. La función de un único componente del sistema inmunitario se invierte de incapaz a capaz, y preferiblemente, la función de múltiples componentes se invierte de incapaz a capaz. Por lo tanto, aumenta el efecto que tiene el sistema inmunitario sobre una diana inmunitaria. Se requiere un sistema inmunitario capaz para destruir eficazmente tumores y otras dianas inmunitarias. No solo activando sino impidiendo la descomposición para que haya fortalecimiento de la inmunidad.

40 Como se usa en el presente documento, "linfocitos" se refiere a un glóbulo blanco presente en el sistema inmunitario e incluye linfocitos granulares grandes (células asesinas naturales (NK)) y linfocitos pequeños (células T y células B).

45 Un "componente biológico derivado de células primarias", como se usa en el presente documento, es una combinación de citocinas, preferiblemente citocinas naturales y no recombinantes, también conocidas previamente como una mezcla de citocinas naturales (NCM). Preferiblemente, el componente biológico derivado de células primarias es IRX-2 (citoplurikin) como se describe a continuación, y los dos términos se pueden usar indistintamente a lo largo de esta aplicación sin desviarse del significado pretendido.

50 "IRX-2", también conocido como "citoplurikin", es un componente biológico derivado de células primarias natural derivado de leucocitos producido por glóbulos blancos humanos purificados (células mononucleares) estimulados por fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina (CIPRO). Los principales componentes activos son interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y γ -interferón (IFN- γ). Preferiblemente, el IRX-2 utilizado en la presente invención incluye estas seis citocinas críticas. IRX-2 también se ha denominado anteriormente como "NCM", una mezcla de citocinas naturales, definida y expuesta en las patentes de Estados Unidos N.º 6.977.072 y 7.153.499.

55 En resumen, IRX-2 se prepara en presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y con la presencia continua o pulsada de un mitógeno, que en la realización preferida es PHA. Sin embargo, también pueden usarse otros mitógenos. El IRX-2 producido para administración a pacientes contiene una concentración de IL-1 β que varía de 60-6.000 pg/ml, más preferiblemente, de 150-1.800 pg/ml; una concentración de IL-2 que varía de 600-60.000

pg/ml, más preferiblemente, de 3.000-12.000 pg/ml, y concentraciones de IFN- γ y TNF- α que varían de 200-20.000 pg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pg/ml.

5 IRX-2 también puede contener una concentración de IL-6 que varía de 60-6.000 pg/ml, más preferiblemente, de 300-2.000 pg/ml; una concentración de IL-8 que varía de 6.000-600.000 pg/ml, más preferiblemente de 20.000-180.000 pg/ml; una concentración de TNF- α que varía de 200-20.000 pg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pg/ml. Pueden usarse citocinas recombinantes, naturales o pegiladas, o IRX-2 puede incluir una mezcla de citocinas recombinantes, naturales o pegiladas. El IRX-2 de la presente invención puede incluir además otras citocinas recombinantes, naturales o pegiladas tales como IL-7, IL-12, IL-15, GM-CSF (a una concentración que varía de 100-10.000 pg/ml, más preferiblemente de 500-2.000 pg/ml) y G-CSF. El procedimiento para preparar IRX-2 se describe en las patentes citadas anteriormente así como en la solicitud de patente provisional de EE. UU N.º 61/044.674.

10 El "escape tumoral" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mecanismo por el cual los tumores escapan del sistema inmunitario del anfitrión.

El mecanismo global del componente biológico derivado de células primarias

15 La presente invención se refiere al uso del componente biológico derivado de células primarias que comprende interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ) para prolongar la vida de los linfocitos *in vitro*.

Bloqueo de la destrucción inmunitaria

20 La destrucción inmunitaria es bloqueada protegiendo a las células T activadas contra la apoptosis. Uno de los mecanismos de escape tumoral implica la eliminación dirigida de las células T efectoras CD8+ a través de la apoptosis mediada por microvesículas (MV) derivadas de tumor. Se han encontrado MV inmunosupresoras en lesiones neoplásicas, sueros, ascitis y derrames pleurales obtenidos de pacientes con cáncer y se han relacionado con apoptosis y alteraciones del TCR en células T efectoras en estos pacientes. La eliminación impulsada por MV de las células T efectoras, que son necesarias para la defensa antitumoral del anfitrión, contribuye al escape del tumor y a la progresión del cáncer. Por lo tanto, la protección de las células efectoras antitumorales de los deterioros funcionales y la muerte es un objetivo principal de la terapia inmunitaria. Los datos clínicos y experimentales muestran que ciertas citocinas, especialmente las citocinas de supervivencia que usan la cadena γ de receptor común, pueden proteger a las células T activadas de muerte inducida por tumor y potenciar su actividad antitumoral.

30 Más específicamente, hay varias formas en que IRX-2 protege a las células T contra la apoptosis. La expresión de moléculas de señalización anti-apoptóticas (es decir, JAK-3 y fosfo-Akt) es regulada al alza y la expresión de moléculas pro-apoptóticas (es decir, SOCS-2) es regulada a la baja. La activación de caspasas en los linfocitos T CD8+ y CD4+ disminuye y la expresión de cFLIP aumenta. La inhibición de la vía de supervivencia PI3K/Akt es contrarrestada por IRX-2. Las células T están protegidas tanto contra la apoptosis extrínseca (apoptosis inducida por MV e inducida por FasL) como contra la apoptosis metabólica intrínseca (estrés celular o relacionado con daño del ADN).

35 La protección contra la apoptosis extrínseca inducida por MV se logra adicionalmente evitando la regulación a la baja de JAK3, CD3- ζ , y STAT5; inhibiendo la desfosforilación de Akt-1/2; y manteniendo proporciones equilibradas de Bax/Bcl-2, Bax-Bcl-xL y Bim/Mcl-1. La protección contra la apoptosis inducida por MV también se logra al evitar la inducción de la actividad de caspasa-3 y caspasa-7. Más específicamente, la inducción de la forma degradada activa de caspasa-3 es bloqueada, al igual que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. La fragmentación del ADN nuclear es inhibida. La protección de la apoptosis intrínseca por IRX-2 se muestra por su protección de las células T activadas contra la apoptosis inducida por estaurosporina.

De manera significativa, las citocinas de IRX-2 protegen a las células T activadas contra la apoptosis de una manera sinérgica. En otras palabras, la combinación de las citocinas en IRX-2 produce un efecto mayor del que se observa administrando citocinas individuales por sí solas.

45 El componente biológico derivado de células primarias, es decir, IRX-2, administrado, es preferiblemente como se describió anteriormente. Preferiblemente, se administra un inhibidor químico, ciclofosfamida a dosis bajas antes de administrar el IRX-2, que invierte la supresión por linfocitos Treg. También se puede administrar diariamente un AINE (preferiblemente indometacina) y zinc durante el régimen IRX-2. La dosificación de IRX-2 se describe con más detalle a continuación.

50 Otras realizaciones

La presente invención contempla un procedimiento de protección de las células T activadas contra la apoptosis, que incluye las etapas de administrar una cantidad eficaz de un componente biológico derivado de células primarias (IRX-2) y de proteger las células T activadas contra la apoptosis. Esencialmente, el procedimiento para proteger las células T activadas contra la apoptosis mejora su actividad antitumoral, porque las células T viven más tiempo para realizar sus funciones necesarias.

La presente invención contempla también un procedimiento para mejorar la actividad antitumoral de las células T, incluyendo las etapas de administrar una cantidad eficaz de un componente biológico derivado de células primarias, estimulando la producción de células T vírgenes, activando las células T vírgenes, protegiendo las células T activadas contra la apoptosis y mejorando la actividad antitumoral de las células T. Las células T vírgenes son producidas en respuesta a la administración de IRX-2, como se describe en las patentes de EE. UU. N.º 6.977.072 y 7.153.499. Estas células T vírgenes se activan y maduran en la presentación de antígeno al tumor. Según la presente invención, el IRX-2 puede ahora proteger estas células T activadas contra la apoptosis. Esta protección se realiza como se describió anteriormente.

La presente invención contempla también un procedimiento para prolongar la vida de los linfocitos, que incluye las etapas de administrar una cantidad eficaz de un componente biológico (IRX-2) derivado de células primarias, y prolongar la vida de los linfocitos. Los linfocitos que están afectados por IRX-2 son preferiblemente células T. IRX-2 puede además prolongar la vida de otras células que pudieran verse afectadas de apoptosis, tal como células B y poblaciones hematopoyéticas (células dendríticas, monocitos y células mieloides). IRX-2 evita que las células T, de otro modo, mueran, prolongando así sus vidas y permitiéndoles adquirir y ejercer los efectos antitumorales para los que están programados, p. ej., actividad citolítica o actividad T colaboradora. En otras palabras, el IRX-2 impide la apoptosis de las células T, prolongando así la vida de las células T.

Hay varias ventajas de la presente invención en lo que se refiere a la apoptosis. En primer lugar, el componente biológico derivado de células primarias utilizado en la presente invención es un componente biológico bien definido que se fabrica en una manera robusta y consecuente (IRX-2). Esto es diferente de los compuestos de la técnica anterior descritos previamente que pueden proteger a las células T contra la apoptosis, pero que no se fabrican de manera robusta. Además, las citocinas en el componente biológico derivado de células primarias utilizadas en la presente invención actúan sinérgicamente sobre múltiples tipos de células del sistema inmunitario dando como resultado una respuesta inmunitaria coordinada a dosis mucho más bajas que las necesarias para lograr resultados similares utilizando citocinas simples y recombinantes como monoterapias, como se evidencia a continuación en los ejemplos.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, se determinó que IRX-2 puede proteger a las células T contra la apoptosis mediada por MV derivadas del tumor. Se sabe que algunas de las citocinas presentes en el IRX-2 tal como IL-2 tienen efectos anti-apoptóticos; por ello, era razonable evaluar si el IRX-2 tenía efectos protectores así como también estimuladores sobre las células T. Los efectos combinados de la mejora de la supervivencia de las células T y la estimulación funcional subyacen a los efectos sinérgicos aparentes de IRX-2 *in vivo*. utilizando un modelo *in vitro* previamente establecido de apoptosis inducida por tumor, en el presente documento se demuestra que IRX-2 proporciona una fuerte protección a las células T contra la apoptosis mediada por MV derivadas del tumor a través de la activación de las rutas de supervivencia, contrarrestando de ese modo eficazmente la inmunosupresión relacionada con el cáncer. Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación en los ejemplos. Por ello, se muestra en el presente documento que IRX-2 es eficaz contra un nuevo brazo del sistema inmunitario y puede restaurar ese brazo del sistema inmunitario, es decir, impedir la apoptosis de linfocitos.

Las microvesículas (MV) derivadas del tumor que expresan una forma de membrana de FasL se purificaron a partir de los sobrenadantes de la línea celular PCI-13 de tumor y se incubaron conjuntamente con células Jurkat CD8⁺ o células T de la sangre periférica (PB) activada. FasL, el ligando Fas, es una proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Las interacciones FasL-receptor desempeñan una importante función en la regulación del sistema inmunitario y en la progresión del cáncer. La apoptosis es inducida tras la unión y la trimerización del FasL con su receptor (FasR), que abarca la membrana de una célula dirigida a la muerte.

La incubación de células T Jurkat CD8⁺ y células T activadas de la PB con las MV derivadas del tumor indujo apoptosis significativa, como se evidencia por el aumento de la unión a anexina (64,4 % ± 6,4), activación de caspasas (58,1 % ± 7,6), una pérdida de potencial de membrana mitocondrial (MMP) (82,9 % ± 3,9) y fragmentación del ADN.

La incubación previa de las células T con IRX-2 suprimió la apoptosis de una manera dependiente de la dosis y del tiempo ($p < 0,001$ a $p < 0,005$). Los efectos protectores observados sobre las células T CD8⁺ de IRX-2 fueron comparables a los efectos citoprotectores de la IL-2 recombinante o de la IL-15 sola, pero fue superior para la IL-7; sin embargo, IRX-2 tuvo mejores resultados en la protección de las células T CD4⁺ contra la apoptosis. IRX-2 no contiene IL-7 o IL-15 y el hecho de que está protegiendo las células T CD4⁺ contra la apoptosis más eficazmente que las cantidades equivalentes de IL-2 recombinante significa que los componentes únicos de IRX-2 actúan de forma sinérgica para proteger las células T contra la apoptosis.

IRX-2 suprimió la regulación a la baja de JAK3 inducida por MV y la cadena- ζ asociada a TCR e indujo la fuerte activación de Stat5 en las células T. El análisis por citometría de flujo mostró que IRX-2 revirtió el desequilibrio inducido por las MV de las proteínas pro- y anti-apoptóticas en las células T al suprimir la regulación al alza mediada por MV de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bim ($p < 0,005$ a $p < 0,05$), y al mismo tiempo restaurar la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, FLIP y Mcl-1 ($p < 0,005$ a $p < 0,01$). Además, el tratamiento con IRX-2 contrarrestó la inhibición inducida por MV de la vía de supervivencia de PI3K/Akt. Un inhibidor de Akt específico

(Akti-1/2) anuló el efecto protector de IRX-2, demostrando que la vía PI3K/Akt desempeña una función clave en la señalización de supervivencia mediada por IRX-2. La vía PI3K/Akt es un componente clave en impedir la apoptosis, y la activación de esta vía evitaría muchos diferentes inductores de apoptosis. Estos estudios muestran que un corto pretratamiento *ex vivo* con IRX-2 proporciona una potente protección de las células T contra la apoptosis inducida por tumor. Como las células T efectoras resistentes a las influencias inmunosupresoras del microentorno del tumor son esenciales para la defensa antitumoral del anfitrión, la utilización de IRX-2 mejora significativamente la efectividad de los biotratamientos contra el cáncer.

Ventajas del componente biológico derivado de células primarias

En general, IRX-2 no suprime y potencia todos los aspectos de los brazos celular y humoral del sistema inmunitario para atacar varias dianas inmunitarias. Cualquier estado patológico sin capacidad inmunitaria (cáncer, SIDA y otros como previamente se describió anteriormente) ahora puede revertirse por la no supresión y la potenciación del sistema inmunitario por IRX-2. IRX-2 funciona como una "sinfónica" más que solo como un único "instrumento" en el sentido de que la combinación específica de citocinas de IRX-2 afecta a varias partes del sistema inmunitario, a diferencia de la terapéutica de la técnica anterior que, aunque sean combinaciones de componentes, o bien aumenta la generación de efectores o impide su apoptosis, es decir, solo trabajan en una única parte del sistema inmunitario. Cada parte del sistema inmunitario es un guardián de un resultado experimentado por la administración de IRX-2. Cada una de estas partes del sistema inmunitario es necesaria para atacar una diana inmunitaria. Las Figuras 2 y 3 representan los procesos potenciados por la terapia con IRX-2. Las células dendríticas inmaduras deben llegar a madurar para activar las células T vírgenes. La producción de células T vírgenes también debe ser inducida de manera que puedan ser presentadas con antígeno por las células dendríticas maduras. Tanto las células T vírgenes como las células dendríticas deben migrar al ganglio linfático regional para que el antígeno sea presentado a las células T vírgenes por las células dendríticas. Una vez activadas, las células T deben ser protegidas contra la apoptosis para que puedan diferenciarse en células T asesinas y atacar a la diana inmunitaria. Las células B también maduran en células plasmáticas para ayudar a atacar la diana inmunitaria. La administración de IRX-2 aumenta todos estos procesos, proporcionando un sistema inmunitario capaz que esté listo para atacar a cualquier diana inmunitaria.

Dosificación y administración

Como se muestra a continuación, IRX-2 inhibe la apoptosis en un intervalo de concentraciones: de dilución 1:1 a 1:10 del líquido IRX-2 (es decir, dilución del IRX-2 en el medio en el que se produjo). Los compuestos de la presente invención (incluido IRX-2) se administran y dosifican para fomentar la protección contra la apoptosis. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los fines del presente documento se determina por ello mediante consideraciones tales como las conocidas en la técnica. Debe observarse que los compuestos se pueden administrar como los compuestos mismos o como un derivado farmacéuticamente aceptable y se pueden administrar solos o como un ingrediente activo en combinación con portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos, farmacéuticamente aceptables. Los datos presentados muestran la actividad del IRX-2 en células derivadas de humanos y, por lo tanto, los datos del presente documento son todos directamente relevantes y aplicables a humanos. Los portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los portadores de implantes, se refieren generalmente a cargas inertes, sólidas o líquidas, no tóxicas, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención. El portador puede ser un medio disolvente o dispersante que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Vehículos no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y ésteres, como miristato de isopropilo, también pueden usarse como sistemas disolventes en composiciones de compuestos. Además, se pueden añadir varios aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluidos los conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y soluciones amortiguadoras. Impedir la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares.

La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines de ilustración, y no están destinados a ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la presente invención no debe interpretarse en modo alguno como limitada a los siguientes ejemplos, sino que más bien debe interpretarse para abarcar cualquiera y todas las variaciones que se hacen evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Ejemplos

Materiales y Procedimientos

Todas las etapas relacionadas con el cultivo celular se realizan en condiciones estériles. Los procedimientos generales de inmunología celular no descritos en el presente documento se realizan como se describe en las

referencias generales para técnicas de inmunología celular tales como Mishell y Shiigi (Selected Methods in Cellular Immunology, 1981) y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Anticuerpos y reactivos:

5 Los siguientes anticuerpos monoclonales se utilizaron para el análisis por citometría de flujo: anti-CD3-ECD, -CD8-PC5, -CD4-PE (Beckman Coulter, Miami, FL); anti-Bcl-2-FITC, -Bcl-2-PE, -Fas-FITC, -FasL-PE (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-Bax-FITC, -Bcl-xL-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anticuerpo anti-Bid (Abcam Inc., Cambridge, MA). Los anticuerpos policlonales fueron: anti-Bim (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-FLIP (GenWay Biotech, San Diego, CA) y anti-Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology). La Anexina V conjugada con FITC se adquirió de Beckman Coulter. La IgG anti-conejo conjugada con FITC se adquirió de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) y los controles de isotipo (IgG₁-FITC, IgG_{2a}-FITC e IgG_{2b}-FITC e IgG₂-PE) se adquirieron de BD Biosciences. Los anticuerpos adquiridos para el análisis de transferencia Western incluían: fosfo-Akt policlonal (Ser473), Akt total policlonal, fosfo-STAT5 monoclonal (Tyr694) y STAT5 total monoclonal (Señalización de células), Bcl-2 monoclonal, CD3-ζ monoclonal, JAK3 monoclonal, SOCS-2 policlonal y Mcl-1 policlonal (Santa Cruz Biotechnology), caspasa-3 policlonal, anticuerpo-3 policlonal FasL (BD Biosciences) y β-actina monoclonal (Sigma Aldrich, San Luis, MO). El anticuerpo monoclonal agonístico anti-Fas (CH-11), el control del isotipo IgM para CH-11, el anticuerpo monoclonal bloqueante de anti-Fas, el clon ZB4 y el control del isotipo IgG1 para ZB4 se adquirieron todos de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Todos los reactivos de cultivo celular que incluyen medio AIM V, medio RPMI 1640, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), suero de ternera fetal inactivado por calor (ΔFCS), estreptomycin, penicilina, l-glutamina, enzima recombinante tipo tripsina (TrypLE) y colorante azul de tripano se adquirió de Gibco/Invitrogen (Grand Island, NY). Las citocinas recombinantes humanas, rhIL-2, rhIL-7 y rhIL-15, se adquirieron de Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ). La albúmina de suero bovino (BSA), saponina, etopósido y estaurosporina eran de Sigma Aldrich. La 7-amino-actinomicina D (7AAD) y el inhibidor de todas las caspasas, z-VAD-FMK, se obtuvieron de BD Biosciences. El inhibidor selectivo de Akt1/Akt2 se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA) y los inhibidores selectivos para caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 de R & D Systems (Minneapolis, MN).

Preparación de componente biológico derivado de células primarias (IRX-2):

El procedimiento para preparar el componente biológico derivado de células primarias se describe en general en la solicitud de patente provisional de los EE. UU. N.º 61/044.674. Las células mononucleares (MNC) se purifican para eliminar las células contaminantes mediante la carga de leucocitos en el medio de separación de linfocitos (LSM) y centrifugación del medio para obtener MNC purificadas con un sistema automatizado de procesamiento y lavado de células. Las MNC se almacenan después durante la noche en una bolsa de almacenamiento de linfocitos FEP. Se estimula una mezcla de inducción de las MNC con un mitógeno, preferiblemente fitohemaglutinina (PHA), y ciprofloxacina en un dispositivo desechable de cultivo celular y se produce un componente biológico derivado de células primarias a partir de las MNC. El mitógeno se elimina de la mezcla de inducción por filtración y modo de filtración de flujo tangencial, y luego se incuba la mezcla de inducción. La mezcla de inducción se clarifica por filtración para obtener un sobrenadante componente biológico derivado de células primarias. Finalmente, el sobrenadante componente biológico derivado de células primarias se elimina del ADN y de los agentes adventicios mediante la aplicación de cromatografía de intercambio aniónico y filtración de 15 nanómetros y opcionalmente una inactivación adicional por ultravioleta C (UVC). El producto final puede entonces ser puesto en un vial y almacenado para una futura administración a un paciente.

Células y líneas celulares:

La línea celular PC-13 de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (H&NSCC) se estableció en el laboratorio de los solicitantes y se mantuvo como se describió previamente. Se transfirió retroviralmente con el gen FasL humano obtenido del Dr. S. Nagata (Osaka Biosciences Institute, Osaka, Japón) como se informó anteriormente. Los sobrenadantes de las células PCI-13 transfectadas (PCI-13-FasL), que contenían tanto sFasL como la forma membranosa de FasL de 42 kDa, se utilizaron como una fuente de microvesículas (MV) derivadas de tumor. Las células Jurkat se obtuvieron de American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se transfectaron con CD8. Las células Jurkat CD8+ se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina y antibióticos. Se aislaron linfocitos T humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenida de donantes normales convenidos. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), se lavaron y se sembraron durante 1 hora a 37 °C en matraces de cultivo (T162) en una atmósfera de CO₂ al 5 % para eliminar monocitos CD14+. La fracción de linfocitos T no adherentes se recogió y se usó inmediatamente para experimentos o se crioconservaron. Las células T CD8+ o las células T CD4+ se purificaron mediante selección positiva utilizando MicroBeads CD8 o MicroBeads CD4, respectivamente (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) utilizando el sistema AutoMACS según las instrucciones del fabricante. Las células T CD8+ o CD4+ purificadas se cultivaron después durante 2-3 días en medio AIM V suplementado con 10 % de FBS en presencia de perlas revestidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (kit de activación/expansión de células T, Miltenyi Biotec). Todas las células utilizadas para los experimentos descritos anteriormente estaban en la fase logarítmica del crecimiento.

60 Aislamiento de microvesículas:

Se aislaron microvesículas (MV) a partir de sobrenadantes de cultivo de la línea celular PCI-13 transfectada con FasL como se describió previamente. En resumen, los sobrenadantes del cultivo celular concentrado se fraccionaron por un procedimiento de dos etapas, que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño y ultracentrifugación. Los sobrenadantes de PCI-13-FasL se concentraron al menos 10 veces utilizando Centriprep Filters (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). A continuación, se aplicaron alícuotas de 10 ml de sobrenadantes concentrados a una columna de Sepharose 2B (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (1,5×35 cm) equilibrada con PBS. Se recogieron fracciones de un mililitro y se controló el contenido de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm. El material de máximo de exclusión, que contiene proteínas de >50 millones de kDa, se centrifugó luego a 105.000 × g durante 2 horas a 4 °C. El sedimento se suspendió de nuevo en 300-500 µl de PBS estéril. La concentración de proteínas en cada preparación de MV se estimó mediante un ensayo de proteínas de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con seroalbúmina bovina (BSA) utilizada como estándar.

Ensayos de transferencia Western:

Para determinar las formas totales o fosforiladas de Akt, Bcl-2, CD3ζ, caspasa-3, JAK3, STAT5, FLIP y Mcl-1, las células Jurkat CD8+ o las células T CD8+ o CD4+ activadas purificadas se incubaron conjuntamente con MV a la concentración indicada y/o con IRX-2 (dilución final 1:3) durante el periodo de tiempo indicado a 37 °C. Las células se lavaron luego, se centrifugaron a 4 °C y se lisaron en volúmenes iguales de solución helada amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 0,5 %) y cóctel inhibidor de proteasa (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Después de la lisis, los homogeneizados se clarificaron por centrifugación. Los sobrenadantes se aislaron, y se hirvieron durante 5 minutos en 5 × solución amortiguadora de muestra Laemmli. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se electrotransfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5 % o BSA al 5 % en TTBS (Tween 20 al 0,05 % en solución salina amortiguada con Tris) durante 1 hora a temperatura ambiente (T_a) y luego se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos apropiados. Después de lavar (3×15 minutos) con TTBS a T_a, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante a una dilución de 1:150.000 (Pierce Chemical Co) durante 1 hora a T_a. Después de los lavados, las membranas se desarrollaron con un sistema de detección quimioluminiscente SuperSignal (Pierce Chemical Co). Para resondear con otro anticuerpo primario, las membranas se incubaron en solución amortiguadora de separación (NaCl 0,5 M, ácido acético glacial al 3 % (v/v)), se lavaron y luego se utilizaron para un estudio posterior.

30 Incubación conjunta de células Jurkat CD8+ o linfocitos T normales activados con MV e IRX-2:

Se sembraron células Jurkat CD8+ o linfocitos T normales activados a $0,3 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se trataron previamente o no con IRX-2 o con citocinas humanas recombinantes a una concentración final de 10 ng/ml o 100 UI/ml durante 24 horas (a menos que se indique lo contrario). A continuación, se añadieron MV (10 µg de proteína por $0,3 \times 10^6$ células) durante 3-24 horas. En algunos experimentos, en primer lugar las células se incubaron conjuntamente con MV durante 3-24 horas, luego se lavaron y se trataron adicionalmente con IRX-2 o citocinas o se trataron durante el periodo de tiempo indicado con MV e IRX-2 agregados simultáneamente. En experimentos de bloqueo seleccionados, el anticuerpo monoclonal neutralizante anti-Fas, ZB-4, el inhibidor Z-VAD-FMK de todas las caspasas, o el inhibidor de Akt específico o inhibidores específicos de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 fueron agregados en las concentraciones indicadas antes de la incubación conjunta de MV.

40 Tinción de la superficie de la célula:

Células Jurkat CD8+ o linfocitos T activados incubadas conjuntamente con MV y/o IRX-2 (al menos 300.000 células/tubo) se lavaron dos veces en solución amortiguadora de tinción (BSA al 0,1 % p/v y NaN₃ al 0,1 % p/v). Las células se tiñeron para marcadores de superficie celular como se describió previamente. En resumen, las células se incubaron con la dilución óptima de cada anticuerpo durante 20 minutos a T_a en la oscuridad, se lavaron dos veces con solución amortiguadora de tinción y finalmente se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 1 % (v/v) en PBS. Los siguientes anticuerpos se utilizaron para la tinción de la superficie: anti-CD3-ECD, anti-CD4-PE, anti-CD8-PC5, anti-Fas-FITC y anti-FasL-PE.

Citometría de flujo:

Se realizó una citometría de flujo de cuatro colores utilizando un citómetro de flujo FACScan (Beckman Coulter) equipado con el software Expo32 (Beckman Coulter). Los linfocitos se filtraron en función de la morfología, y los residuos, las MV así como los monocitos y los granulocitos se excluyeron, y se recogieron datos en al menos 10^5 células. Para el análisis de los linfocitos T primarios activados, los filtros se restringieron a los subconjuntos de células T CD3⁺CD8⁺ o CD3⁺CD4⁺. Los datos se analizaron utilizando el software de análisis Coulter EXPO 32vl.2.

Ensayo de unión a Anexina V:

55 La unión de Anexina V (ANX) a células Jurkat CD8+ o linfocitos T activados incubados conjuntamente con MV y/o IRX-2 se midió por citometría de flujo para evaluar la apoptosis espontánea o inducida *in vitro*. Después de la tinción superficial con anticuerpos para CD3, CD8 o CD4, las células se suspendieron de nuevo en solución amortiguadora

de unión a Anexina y se incubaron con Anexina V conjugada con FITC durante 15 minutos en hielo. Se realizó una tinción adicional con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) para discriminar células muertas y vivas. Las células se analizaron mediante citometría de flujo en los 30 minutos de la tinción.

Medida de activación de las caspasas:

- 5 La actividad total celular de Caspasas se ensayó mediante tinción intracelular de caspasas activadas utilizando un inhibidor de todas las caspasas, Marcador *in situ* CASPACE FITC-VAD-FMK (Promega, Madison, WI). Las células se suspendieron de nuevo en PBS y se añadió FITC-VAD-FMK a una concentración final de 5 μ M. Las células se incubaron durante 20 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂ y se lavaron con PBS. A continuación, las células se tiñeron para los receptores de la superficie celular, se fijaron con paraformaldehído al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo. La activación específica de caspasa-3 y caspasa-7 se midió utilizando el kit de ensayos caspasa-3 y -7 VYBRANT FAM de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se suspendieron de nuevo en PBS y se tiñeron con una dilución 150x del inhibidor de FMK-caspasa marcado con carboxifluoresceína (FAM) durante 60 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se lavaron en solución amortiguadora de lavado y se fijaron con paraformaldehído al 1 %. Las células se analizaron mediante citometría de flujo con la fluoresceína medida en el canal FL1.

Medición del potencial de membrana mitocondrial:

- La pérdida del potencial de membrana mitocondrial (MMP) como un sello distintivo de la apoptosis se midió utilizando el kit de ensayo MITOPROBE JC-1 de Invitrogen (Carlsbad, CA). El colorante catiónico JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) existe en células sanas como un monómero verde en el citosol y también se acumula como agregados rojos en la mitocondria. En células apoptóticas y necróticas, JC-1 permanece solo en el citoplasma debido a la despolarización mitocondrial, lo cual puede detectarse mediante citometría de flujo como una disminución en la proporción de intensidad de fluorescencia roja/verde. Las células Jurkat CD8+ o los linfocitos T activados se incubaron en PBS que contenía 2 μ M de JC-1 durante 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Una alícuota de las células se trató con 50 μ M del desacoplador mitocondrial carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP) durante el período de tinción como un control positivo para la despolarización mitocondrial. Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo inmediatamente después de la tinción.

Evaluación de proteínas relacionadas con apoptosis:

- Se investigó la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, FLIP y Mcl-1 y las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bim y Bid en células Jurkat CD8+ o linfocitos T primarios activados utilizando citometría de flujo multicolor. Las células se tiñeron primero para marcadores de células T superficiales como se describió anteriormente. Para la tinción intracelular de las proteínas relacionadas con la apoptosis las células se fijaron con paraformaldehído al 1 % (v/v) en PBS a T_a durante 10 minutos y luego se permeabilizaron con saponina (0,1 % v/v en PBS) durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, las células se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con Bcl-2, Bax y Bcl-xL antihumanos conjugados con FITC o PE, o anticuerpos no conjugados para FLIP, Bim, Bid o Mcl-1, seguido de un lavado con 0,1 % de saponina. Las muestras teñidas con anticuerpos no conjugados se incubaron adicionalmente con una IgG de cabra anti-conejo conjugada con FITC durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con saponina 0,1 %, las células se fijaron en paraformaldehído al 1 % (v/v). Se utilizaron anticuerpos emparejados con control isotipo para los controles tanto de superficie como intracelulares y todos los anticuerpos se titularon previamente en PBMC recientes.

- 40 Ensayo TUNEL:

- La fragmentación del ADN se midió utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ*, rojo TMR (Roche, Indianapolis, IN). En resumen, las preparaciones de citospina (100.000 células/lámina) de células T tratadas con MV e IRX-2 se secaron al aire y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) en PBS durante 1 hora a T_a. Las láminas se enjuagaron con PBS y se incubaron con solución de permeabilización (Triton X-100 al 0,1 % en citrato de sodio al 0,1 %) durante 2 minutos en hielo. A continuación, las láminas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 20 μ l de la mezcla de reacción TUNEL durante 1 hora a 37 °C en una cámara humidificada en la oscuridad. A continuación, las muestras se lavaron a fondo con PBS y se incubaron en un medio con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories, CA) para rastrear los núcleos celulares. Las láminas se evaluaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-800 bajo una ampliación x200. Para el análisis digital de imágenes, se utilizó Adobe Photoshop 6.0. Un mínimo de 300 células se contaron aleatoriamente en un campo microscópico para determinar el porcentaje de células con fragmentación de ADN.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. Los valores de p<0,05 se consideraron significativos.

- 55 Ejemplo 1

Ejemplo 1

IRX-2 protege tanto a las células T Jurkat como a los linfocitos T primarios de muerte celular mediada por diversos agentes inductores de apoptosis.

Para determinar si IRX-2 protege las células T contra la apoptosis mediada por microvesículas (MV) derivadas de tumor, las células Jurkat sensibles a FasL CD8+ se incubaron previamente con una dilución 1:3 de IRX-2 (aproximadamente 4 ng/ml o 90 UI/ml de IL-2) durante 24 horas y posteriormente se trataron con 10 µg de MV derivadas de tumor (10 µg), CH-11 (400 ng/ml) o estaurosporina (1 µg/ml) durante 3 horas. Como se muestra en los estudios previos de los solicitantes, la incubación conjunta de células Jurkat con MV causó notable apoptosis, demostrada por una mejorada unión a Anexina V (Figuras 4A y 4C) y unión de FITC-VAD-FMK indicativa de activación de caspasa (Figuras 4B y 4D). Se excluyeron las células muertas (7-AAD+) y el filtro se estableció en células Jurkat CD8+ negativas para 7-AAD. Tras la incubación previa de células Jurkat T con IRX-2, la apoptosis inducida por MV, como se detectó en ambos ensayos, se redujo significativamente (Figuras 4A-4D).

Curiosamente, se descubrió que IRX-2 era eficaz no solo contra la apoptosis inducida por MV, sino que también proporcionaba protección de células T Jurkat contra la apoptosis inducida por FasL (CH-11-Ab) y la inducida por fármacos citotóxicos (estaurosporina). Las Figuras 12C-12D muestran que IRX-2 reducía significativamente la apoptosis inducida por cada uno de estos agentes, medida por la disminuida unión a Anexina V (Figura 4C) y por la reducida activación de caspasas (Figura 12D). Los resultados mostrados en la Figura 4C y en la Figura 4D son representativos de 3 experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,002).

También se observó protección mediada por IRX-2 cuando se usan linfocitos T CD8+ y CD4+ primarios derivados de la sangre. Los datos en la Tabla 1 ilustran el efecto protector de IRX-2 sobre ambas apoptosis inducidas por MV y por CH-11 como se indica por las disminuciones en la activación de caspasas en estas células (Tabla 1). Se observaron disminuciones similares de la unión a Anexina V con IRX-2 (datos no mostrados). Las células T CD8+ mostraron una sensibilidad significativamente mayor a la apoptosis inducida por MV que las células T CD4+, pero en ambos de estos subconjuntos, el tratamiento previo con IRX-2 proporcionó una fuerte protección contra la apoptosis inducida por MV, determinada por una disminución total en el porcentaje de células T con activación de caspasa. IRX-2 también protegía ambos subconjuntos de células de la apoptosis inducida por Ab CH-11 (Tabla 1). Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que IRX-2 protege eficazmente las células T primarias y las líneas celulares de la apoptosis inducida por MV o Ab CH-11 Anti-Fas, así como de la apoptosis intrínseca asociada con los cambios mitocondriales inducidos por estaurosporina. Tales resultados refuerzan el argumento de que IRX-2 proporciona una protección significativa contra varios tipos diferentes de estímulos apoptóticos, incluidos los derivados de tumores, así como los mecanismos intrínsecos que pueden ser inducidos por quimioterapia, radioterapia o infección vírica, por ejemplo.

Tabla 1. IRX-2 protege a los linfocitos T CD8+ y CD4+ de sangre periférica activada contra la apoptosis^a inducida por MV y Fas

	Células CD8+		Células CD4+	
	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ ± SD	valor ^b de p	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ ± SD	valor ^b de p
Células sin tratar	14,8 ± 4,8		12,6 ± 2,3	
sin IRX-2 + Ab CH-11	52,8 ± 4,9		41,2 ± 9,8	
+IRX-2 + Ab CH-11	15,0 ± 3,5	0,0010	15,4 ± 6,1	0,0510
sin IRX-2 + MV	68,9 ± 10,4		49,8 ± 8,0	
+IRX-2 + MV	26,5 ± 10,3	0,0006	13,9 ± 6,4	0,0211

^a Células CD8+ o CD4+ activadas se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 horas (a una dilución final de 1:3, contiene 90 UI/ml de IL-2, véase Materiales y Procedimientos para detalles adicionales de conc. de citocinas) y luego se trataron con 10 µg de MV o anticuerpo (Ab) CH-11 (400 ng/ml) durante unas 24 horas adicionales. Las células se analizaron en cuanto a la activación de caspasas mediante tinción con FITC-VAD-FMK por citometría de flujo. Los resultados son el porcentaje medio ± SD de 3 experimentos independientes.

^b Los valores de p son para las diferencias entre las células sin tratar con IRX-2 y tratadas con +IRX-2.

Ejemplo 2

La protección mediada por IRX-2 contra la apoptosis depende del tiempo y de la concentración.

Para comprender mejor los efectos protectores de IRX-2 sobre las células T, las células Jurkat CD8+ se incubaron previamente con IRX-2 (dilución fija de 1:3 = 90 UI/ml de IL-2) durante periodos de tiempo progresivamente más largos (0-24 horas) o con concentraciones crecientes de IRX-2 (como se indica) durante un período fijo de 24 horas y posteriormente se trataron con MV (10 µg) durante 3 horas (Figuras 5A y 5B, respectivamente). La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo utilizando tinción con FITC-VAD-FMK de caspasas activadas. Se descubrió que

IRX-2 bloqueaba la apoptosis inducida por MV, y esta inhibición dependía del tiempo, ya que la prolongación del tiempo de la incubación previa con IRX-2 intensificaba sus efectos protectores. Se observó una inhibición máxima después de 24 horas de tratamiento con MV (Figura 5A). La incubación previa de células T con diferentes concentraciones de IRX-2 mostró una inhibición, dependiente de la dosis, de la apoptosis causada por MV (Figura 5). A la concentración más alta posible (es decir, IRX-2 sin diluir), IRX-2 inhibió completamente la inducción de apoptosis por MV (Figura 5B). Los resultados son el porcentaje medio \pm SD de 4 experimentos independientes. El hecho de que la inhibición mediada por IRX-2 sea dependiente tanto del tiempo como de la concentración demuestra farmacológicamente que los efectos son específicos del fármaco.

También se deseaba determinar si IRX-2 podría proteger a las células T de la muerte celular apoptótica una vez que se hubiera iniciado la cascada apoptótica. Para abordar esta cuestión, las células Jurkat CD8+ no se trataron, se trataron con IRX-2 (dilución 1:3) durante 24 horas (+IRX), MV durante 3 horas (+MV), se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 horas y luego se trataron con MV (10 μ g) durante 3 horas (+IRX \rightarrow MV) o primero se incubaron con MV y luego se trataron con IRX-2 (+MV \rightarrow IRX-2) o se incubaron con ambos agentes simultáneamente (+MV e IRX) durante 3 horas o 24 horas, respectivamente. La activación de las caspasas se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados son el porcentaje medio \pm SD de un experimento representativo de 3 realizados (* $p < 0,002$ en comparación con la muestra tratada con MV). En comparación con los efectos del tratamiento con IRX-2 antes de la adición de MV, la apoptosis se redujo en aproximadamente un 50 % después de la incubación conjunta simultánea de células T con MV + IRX-2 (Figura 6). Cuando IRX-2 se añadió 3 horas después del tratamiento con MV, el efecto protector de IRX-2 se anuló por completo. Dado que IRX-2 obviamente no pudo superar la cascada apoptótica ya iniciada por MV, actúa a través de un mecanismo de protección más que a través de una inversión de los procesos apoptóticos en curso iniciados por las MV.

Ejemplo 3

Comparación del efecto protector de IRX-2 con el efecto de las citocinas de supervivencia IL-7 e IL-15: activación de caspasa en células Jurkat CD8+ después del tratamiento con MV de tumor.

Se sembraron células Jurkat CD8+ a una densidad de 300.000 células/100 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas con IRX-2 (concentración final 1:3), IL-7 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml), o ambas citocinas (10 ng/ml cada una), respectivamente. Las células se trataron durante 3 horas con PCI-13/FasL-MV (15 μ g). Las células Jurkat CD8+ calentadas durante 10 minutos a 56 grados C (centígrados) se utilizaron como control positivo. Las células se recolectaron, se lavaron en 1 ml de PBS, se suspendieron de nuevo en 500 μ l de PBS y se tiñeron con 5 μ M de VAD-FITC a 37 grados C durante 20 minutos. Luego las células se lavaron en PBS y se tiñeron durante 15 minutos para CD8-PE-Cy5. Después del lavado, las células se fijaron en 1 % de PFA y se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica.

El porcentaje de células Jurkat CD8+ de unión a caspasa-VAD-FITC se determinó para cada grupo de tratamiento como se muestra en la Figura 7. La apoptosis inducida por MV (carril sin IRX-2; 50 % de células que experimentan apoptosis) se vio drásticamente inhibida por tratamiento previo con IRX-2 solo (11 % de células apoptóticas = 4,5 veces de disminución) o con una mezcla de IL-7 e IL-15 (5 % de células apoptóticas = 10 veces de disminución). Por separado, ni IL-7 ni IL-15 solos pudieron disminuir el nivel de apoptosis por debajo del nivel de control inducido por MV. IRX-2 no contiene ni IL-7 ni IL-15, los cuales son reconocidos como potentes factores de "supervivencia" de las células linfoides. Esto demuestra que la actividad inhibidora de apoptosis de IRX-2 es el resultado de una combinación sinérgica de componentes biológicamente activos y no puede ser reproducida por una sola citocina recombinante.

Ejemplo 4

Efecto protector de IRX-2 y citocinas de supervivencia IL-7 e IL-15: Activación de caspasa en células T CD8+ y CD4+ activadas después del tratamiento con inductores de apoptosis.

Se descongelaron células no adherentes de unidades de leucocitos (capas leucocitarias), se activaron 60×10^6 células (en 60 ml de FCS al 10 %, medio RPMI) con perlas Dynal CD3/CD28 (1 perla/célula) durante 3 días. Después de la activación, las células se lavaron y las células CD8+ y CD4+ se aislaron por separación magnética (selección positiva, Miltenyi MicroBeads). Se sembraron 300.000 células en placas de 96 pocillos en 100 μ l/pocillo y se incubaron con IRX-2 (1:3) o las citocinas IL-7 e IL-15 (100 ng/ml) durante 24 horas. Las células se trataron luego durante 24 horas adicionales con PCI-13/FasL-MV (15 μ g) (Figuras 8A, 8B) o Ab CH-11 (400 ng/ml) (Figuras 9A, 9B) para inducir la apoptosis.

Después de la incubación, las células se recolectaron, se lavaron en 1 ml de PBS, se suspendieron de nuevo en 300 μ l de PBS y se tiñeron con VAD-FITC 3 μ M a 37 grados C durante 20 minutos. Las células se lavaron en PBS y se tiñeron durante 15 minutos para CD8-PE-Cy5 o CD4-PE-Cy5, como se indicó. Después del lavado, las células se fijaron en PFA al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica.

En respuesta a la inducción de apoptosis a través de la línea celular tumoral PCI-13/FasL-MV, se determinó el porcentaje de células que se unen a caspasa-VAD-FITC (indicador de células que experimentan apoptosis) para células CD4+ (Figura 8A) o células CD8+ (Figura 8B) derivadas de sangre periférica humana previamente activadas

que se habían incubado previamente con IRX-2 solo o con las citocinas recombinantes indicadas. Estos datos muestran que IRX-2 puede inhibir la apoptosis como se observó anteriormente en las células Jurkat CD8+ (Figuras 4-6), sin embargo, el grado de inhibición parece ser inferior al observado en las células Jurkat. En esta situación experimental donde se emplean células T humanas primarias (sin línea celular), IL-7 e IL-15 fueron igualmente eficaces en comparación con IRX-2, ya sea solo o combinado. Esta aparente diferencia se relaciona más probablemente con el uso de una población heterogénea de células T a partir de sangre periférica en lugar de la línea celular Jurkat homogénea clonada. Sin embargo, en cualquier situación y en ambas poblaciones CD4+ y CD8+, IRX-2 de hecho inhibió la apoptosis en respuesta a las MV derivadas de tumor.

En una ampliación de los hallazgos anteriores, se llevó a cabo un experimento similar para evaluar el porcentaje de unión de caspasa-VAD-FITC de células CD4+ (Figura 9A) o CD8+ (Figura 9B) derivadas de sangre periférica humana preactivadas en este caso tratadas con un inductor de apoptosis alternativo, el anticuerpo anti-Fas (CH-11). En este contexto, IRX-2 es el más eficaz para inhibir la inducción de apoptosis en comparación con IL-7 o IL-15 o ambos combinados. Esto fue cierto tanto para las poblaciones de CD4+ como para las de CD8+ tomadas de donantes de sangre normales. Tales resultados refuerzan el argumento de que IRX-2 proporciona una protección significativa contra varios tipos diferentes de estímulos apoptóticos, incluido el derivado de tumores.

Ejemplo 5

Las señales de supervivencia fomentadas por IRX-2 mayores que los efectos protectores de otras citocinas de supervivencia recombinantes

Como IL-2 es una citocina principal en IRX-2 (~90 UI/ml de IL-2 en la dilución 1:3 utilizada), la actividad anti-apoptótica observada de IRX-2 podría ser en parte dependiente de IL-2. Por otro lado, la sinergia con otras citocinas presentes en IRX-2 podría fomentar la supervivencia. Las células T CD8+ y CD4+ activadas se incubaron con 100 UI/ml de IL-2 humana recombinante, una dosis que se aproxima a la presente en la dilución 1:3 de IRX-2, o IRX-2 (~90 UI/ml a 1:3) y se compararon en cuanto a la capacidad para inhibir la apoptosis inducida por MV o por el anticuerpo CH-11. Como se muestra en la Tabla 2A, IL-2 tenía un efecto protector similar contra la apoptosis inducida por MV como IRX-2 en las células T CD8+, pero tenía un efecto protector menor en las células T CD4+. En términos de protección contra la apoptosis inducida por Ab CH-11, la IL-2 fue significativamente mucho menos eficaz que IRX-2 en la mejora de la supervivencia de las células T CD4+ y casi no tenía efecto en las células T CD8+ (Tabla 2B). Estos hallazgos indican que el potencial mejorador de la supervivencia de IRX-2 es mayor que el de su principal citocina IL-2 y que el apoyo de otras citocinas que están presentes en IRX-2 a concentraciones fisiológicas muy bajas contribuye a estos efectos.

Es probable que los efectos citoprotectores de IL-2 en IRX-2 se mejoren por la presencia de IFN γ y GM-CSF, que en combinación, podrían mediar en los efectos inmunopotenciadores. La función de otros componentes de IRX-2 (p. ej., IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF α) en la promoción de la supervivencia de células T es menos claro, aunque estudios han demostrado que, dependiendo de la ubicación y concentración del tejido, algunas de estas citocinas proinflamatorias también pueden apoyar respuestas inmunitarias antitumorales. Es importante observar que previamente se describió una sinergia funcional entre los diversos componentes de IRX-2, demostrando, por ejemplo, que IRX-2 podía inducir la maduración de células dendríticas en mayor medida que los niveles comparables de TNF α solo.

Además, el efecto protector de IRX-2 se comparó con la actividad de IL-7 e IL-15 recombinantes, ambas potentes citocinas de supervivencia para linfocitos, que no están presentes en la mezcla de IRX-2. La incubación previa de células T con estas citocinas a una concentración de 10 ng/ml, solas o en combinación, proporcionó protección contra la apoptosis inducida por MV o inducida por Ab CH-11 en todos los casos, aunque en diferentes grados (Tabla 2A y B). La IL-7 sola solo inhibió débilmente la apoptosis inducida tanto por Ab CH-11 como por MV en ambos subconjuntos de células en comparación con IRX-2. La IL-15 sola fue tan potente como IRX-2 en protección contra la apoptosis inducida por MV pero proporcionó una señal de supervivencia más débil contra la apoptosis inducida por Ab CH-11. Una combinación de ambas citocinas bloqueó la apoptosis en los subconjuntos de células CD8+ y CD4+, y el nivel de inhibición de la apoptosis fue similar al mediado por IRX-2, pero solo en el caso de apoptosis inducida por MV (Tabla 2A y B). Así, los efectos protectores de IRX-2 fueron comparables o en algunos casos (p. ej., protección de células CD8+) incluso más fuertes que los de las citocinas de supervivencia recombinantes, IL-7 e IL-15 en la protección de células CD4+. Se encontró que IRX-2 era significativamente más eficaz que la IL-7 recombinante para proteger las células T CD4+ y CD8+ activadas de la apoptosis inducida por MV y Ab CH-11 y tenía efectos protectores similares a la IL-15. Entre las citocinas probadas, IRX-2 tuvo la mayor potencia de supervivencia cuando se utilizaba Ab CH-11 para inducir apoptosis, lo que implica protección contra la apoptosis mediada por receptor. Cabe señalar que las concentraciones de IL-7 e IL-15 utilizadas en estos experimentos son relativamente altas y no niveles fisiológicos, sugiriendo de nuevo una fuerte sinergia entre los componentes de IRX-2.

Tabla 2. Efectos antiapoptóticos de IRX-2 en comparación con IL-2, IL-7 e IL-15 en células T primarias apoptóticas (a) inducidas por MV o (b) inducidas por Ab CH-11.

A. Apoptosis inducida por MV				
	Células CD8+		Células CD4+	
	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ \pm SD	valor ^b de p	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ \pm SD	valor ^b de p
Control	21,8 \pm 3,9		14,3 \pm 5,0	
sin IRX-2 + MV	63,2 \pm 4,5		52,8 \pm 8,7	
+IRX-2 + MV	20,6 \pm 0,8	0,0006	10,2 \pm 0,4	0,0038
+IL-7 + MV	49,5 \pm 3,5	0,0004	34,5 \pm 1,9	0,0124
+IL-15 + MV	16,8 \pm 6,2	0,0044	16,7 \pm 2,1	0,0072
+IL-7/IL-15 + MV	11,8 \pm 6,2	0,0036	11,9 \pm 0,8	0,0031
+IL-2 + MV	21,9 \pm 2,7	0,0002	22,2 \pm 2,7	0,0113

B. Apoptosis inducida por Ab CH-11				
	Células CD8+		Células CD4+	
	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ \pm SD	valor ^b de p	% promedio de células FITC-VAD-FMK+ \pm SD	valor ^b de p
control	12,3 \pm 2,8		11,4 \pm 1,3	
sin IRX-2 + MV	50,0 \pm 0,2		46,8 \pm 3,0	
+IRX-2 + MV	13,4 \pm 3,0	0,0007	12,0 \pm 1,7	0,0001
+IL-7 + MV	37,7 \pm 1,4	0,0015	31,8 \pm 10,6	
+IL-15 + MV	28,8 \pm 3,1	0,0020	21,1 \pm 5,3	0,0086
+IL-7/IL-15 + MV	24,2 \pm 4,9	0,0028	20,2 \pm 0,1	0,0010
+IL-2 + MV	44,2 \pm 6,9		31,7 \pm 3,0	0,0128

^a Células T primarias CD8+ y CD4+ activadas se incubaron previamente con IRX-2 (dilución 1:3, incluye ~90 UI/ml de IL-2, véase Materiales y Procedimientos), IL-2 humana recombinante (100 UI/ml), IL-7 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml) o IL-7 e IL-15 (ambos 10 ng/ml) durante 24 horas y luego se trataron con 10 μ g de MV o 400 ng/ml de anticuerpo (Ab) CH-11 durante 24 horas adicionales. La activación de las caspasas se analizó mediante citometría de flujo. Los datos son porcentajes medios de células FITC-VAD-FMK+ \pm SD.

^b Los valores de p se refieren a las diferencias significativas entre las células previamente tratadas con IRX-2 en comparación con la MV sola o las células previamente tratadas con la citocina indicada en comparación con los tratamientos previos con IRX-2

10 Ejemplo 6

IRX-2 proporciona protección contra la apoptosis inducida por MV en varias etapas en la vía apoptótica.

Habiendo mostrado que la protección mediada por IRX-2 se extiende a las células T primarias así como a la línea celular Jurkat y a varios agentes inductores, se continuó evaluando la capacidad de IRX-2 para inhibir las etapas aguas abajo en el proceso apoptótico utilizando la incubación conjunta de células Jurkat con MV. Las células Jurkat CD8+ no se trataron, se incubaron con 10 μ g de MV durante 3 horas o se trataron previamente durante 24 horas con IRX-2 (dilución 1:3) y luego se incubaron con MV durante 3 horas. Las células Jurkat CD8+ también se incubaron conjuntamente con MV y 20 μ M del inhibidor Z-VAD-FMK (zVAD) de todas las caspasas o se incubaron conjuntamente con MV y el mAb ZB4 neutralizante anti-Fas (10 μ g/ml) (controles). Los resultados son la MFI promedio \pm SD de 3 experimentos independientes. Como se muestra en la Figura 13A, el tratamiento con MV de células Jurkat condujo a un aumento muy fuerte en la intensidad fluorescente media (MFI) de caspasa-3/-7-FAM, un colorante que se une específicamente a caspasa-3 y caspasa-7 activadas, las caspasas efectoras principales de la apoptosis mediada tanto por receptor como mitocondrial. El pretratamiento con IRX-2 impidió completamente la inducción inducida por MV de la actividad caspasa-3 y caspasa-7 así como el inhibidor zVAD irreversible de caspasa y el anticuerpo monoclonal (mAb) ZB4 neutralizante anti-Fas. La activación de caspasa-3 por MV también se detectó mediante análisis de transferencia Western, donde se observó una disminución drástica en el nivel de proteína de la proforma inactiva de caspasa-3 y un aumento simultáneo de la forma degradada activa en células T Jurkat tratadas con MV durante 24 horas (Figura 10B, carriles 3 y 4). El pretratamiento con IRX-2 bloqueó eficazmente la inducción de la forma degradada activa (Figura 10B, carriles 5 y 6). Las células no se trataron, se trataron con IRX-2 (dilución 1:3) durante 24 horas (+IRX), se trataron con MV (10 μ g) durante 3 horas (+MV 3 horas) o 24 horas (+MV 24 horas) o se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 horas y luego se trataron con MV (10 μ g) durante 3 horas o 24 horas (+IRX \rightarrow MV). Los lisados celulares completos de las células se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a

membranas de PVDF para posterior transferencia Western. La activación de caspasa-3 se muestra como una disminución en la pro-forma inactiva y la aparición de las subunidades activas p17 y p10. Los resultados son representativos de 3 transferencias Western.

5 Además, IRX-2 bloqueó la pérdida inducida por las MV del potencial de membrana mitocondrial (MMP) en células T Jurkat (Figuras 11A y 11B). Este bloque era comparable al proporcionado por los dos inhibidores z-VAD y ZB4 (Figura 11B). Las células Jurkat CD8+ se analizaron mediante citometría de flujo para una disminución en la fluorescencia roja del colorante catiónico JC-1, indicando una pérdida de MMP. El porcentaje de células negativas al JC-1 rojo se determinó en cultivos de células Jurkat CD8+ después de ningún tratamiento, 24 horas de tratamiento con MV (10 µg) solo (sin IRX) o pretratadas durante 24 horas con IRX-2 (dilución 1:3) o MV en combinación con el inhibidor Z-VAD-FMK de apoptosis (inhibidor de todas las caspasas; conc.) o ZB4 (mAb neutralizante anti-Fas, conc./dosis). Las células tratadas con 50 µM de carbonilcianuro de 3-clorofenilhidrazona (CCCP), un protonóforo que disipa el gradiente de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna, se utilizaron como control positivo. Los resultados son media ± SD de 3 experimentos independientes (*p<0,005; **p<0,002 en comparación con la muestra sin IRX-2).

15 Finalmente, el pretratamiento con IRX-2 redujo significativamente la fragmentación de ADN nuclear inducida por MV como se detectó mediante el ensayo TUNEL (Figuras 12A y 12B), que representa la etapa final en el proceso apoptótico (p<0,0002: Figura 12B). Las células Jurkat CD8+ no se trataron (a), se incubaron durante 24 horas solo con IRX-2 (b), o solo con MV durante 24 horas (c), o se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 horas y posteriormente se trataron con MV durante 24 horas (d), y luego se tiñeron mediante el procedimiento TUNEL para revelar roturas de cadenas de ADN (núcleos rojos) indicativas de apoptosis. Se contó con un mínimo de 300 células Jurkat CD8+ para cada grupo de tratamiento. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio ± SD de dos experimentos independientes (*p<0,0002 en comparación con la muestra tratada con MV). Este dato confirma, por lo tanto, que IRX-2 presenta efectos protectores en cada una de las etapas relevantes que culminan en la muerte de las células T.

25 Ejemplo 7

IRX-2 protege las células T de la regulación a la baja inducida por MV de la expresión de JAK3 y STAT5.

30 Se ha observado previamente que las MV derivadas de sueros de pacientes con cáncer regulan a la baja la expresión de moléculas que median en la vía de señalización del receptor de citocina de la cadena γ común, incluyendo JAK3 y STAT5. Dado que esta vía es esencial para el desarrollo, mantenimiento y supervivencia de los linfocitos, y en particular de las células CD8+, a continuación se examinaron los efectos de las MV e IRX-2 sobre la expresión de JAK3 y STAT5 en las células Jurkat CD8+.

35 Las células Jurkat CD8+ no se trataron o se trataron con IRX-2 (dilución 1:3) y MV en diferentes combinaciones. Los lisados celulares completos de las células de cada grupo de tratamiento se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF para posterior transferencia Western. Los niveles de expresión de JAK3, STAT5, fosforilado y total, CD3ζ y FLIP se analizaron por sondeo de membrana con anticuerpos específicos. El nuevo sondeo con anticuerpo β-actina confirmó igual carga proteínica.

40 Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos realizados. Como se observó anteriormente, MV causó una regulación a la baja significativa de JAK3 en células T (Figura 18, panel 1, compárense los carriles 1 y 3), que se intensificó con el tiempo prolongado de incubación conjunta (Figura 18, panel 1, carriles 3 y 4). Mientras que IRX-2 solo no aumentaba la expresión de JAK3 (Figura 18, panel 1, compárense los carriles 1 y 2), podía revertir completamente la regulación a la baja de JAK3 inducida por MV y restaurar su expresión (Figura 18, panel 1, compárense los carriles 3, 4 con los carriles 5, 6). Además, IRX-2 provocaba una fuerte activación de STAT5, un transductor de señal JAK3, como se indica mediante la fosforilación de esta proteína (Figura 18, panel 2, carril 5). Esta activación drástica de STAT5 se mantuvo incluso después de una incubación prolongada (24 horas) con MV (Figura 18, panel 2, carril 6). Además, se observó una pérdida en la expresión de CD3-ζ en las células T después del tratamiento con MV. Aquí de nuevo, incubación previa con linfocitos T protegidos con IRX-2 a partir de la regulación a la baja de CD3-ζ mediada por MV (Figura 18, panel 4, compárense los carriles 3, 4 con los carriles 5, 6).

50 Todos estos cambios son consistentes con la protección mediadora de IRX-2 de la apoptosis a través de las citocinas presentes en IRX-2, especialmente a través de la citocina primaria IL-2 que se sabe que señala a través del receptor de IL-2 y las moléculas de señalización intracelular aguas abajo Jak3/Stat5. Estos datos explican las dianas moleculares aguas abajo de IRX-2 que son centrales para enviar señales de supervivencia y estimulación en células linfoides.

Ejemplo 8

55 IRX-2 invierte el desequilibrio inducido por MV de las proteínas pro- y anti-apoptóticas.

Para examinar adicionalmente los mecanismos a través de los cuales IRX-2 fomentaba la protección de las células T contra la apoptosis, se midieron los niveles de expresión de diversas proteínas pro- y anti-apoptóticas en linfocitos T

y células Jurkat CD8+ activados, tratados con MV en presencia o ausencia de IRX-2 por citometría de flujo cuantitativa. La Tabla 3 muestra los niveles de expresión de varias proteínas relacionadas con la apoptosis como intensidad de fluorescencia promedio (MFI) en células CD8+ activadas antes y después del tratamiento con MV. La incubación de células T con MV causó una significativa regulación al alza de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bim, y una regulación a la baja simultánea de Bcl-2, Bcl-xL, FLIP y Mcl-1 anti-apoptóticas (Tabla 3A). Esto es consistente con los hallazgos previos de los solicitantes que indican que las MV inducen la apoptosis de las células T. Si bien los niveles absolutos de proteínas son importantes, es la proporción de niveles proteicos pro-/anti-apoptóticos presentes en la célula lo que realmente determina el destino celular. Así, los cambios en estas proporciones son mucho más informativos del estado celular (Tabla 3B). Se observaron cambios drásticos de las proporciones Bax/Bcl-2, Bax/Bcl-xL y Bim/Mcl-1 tras los tratamientos con MV o IRX-2+ MV. Se produjo un significativo cambio pro-apoptótico en estas proporciones se produjo en células CD8+ tras la incubación con MV. Por el contrario, el tratamiento previo de las células T con IRX-2 provocó una drástica disminución de estas proporciones haciéndolas congruentes con las presentes en las células no tratadas. (Tabla 3B), como se muestra en la Figura 14A. Las células CD8+ de sangre periférica (PB) activada se incubaron previamente con IRX-2 (a una dilución 1:3) durante 24 h y luego se trataron con 10 µg de MV durante 24 h adicionales. Los niveles de expresión (intensidad media de la fluorescencia) de diferentes proteínas pro- y anti-apoptóticas se midieron mediante citometría de flujo cuantitativa. Como se muestra en la Figura 14B, el tratamiento con IRX-2 puede mantener los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 después del tratamiento con MV y regula a la baja la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. MV e IRX-2 tenían poco o ningún efecto sobre la expresión de FasL y Bid pro-apoptóticos (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares después de la incubación con IRX-2 y el tratamiento con MV de células CD4+ primarias activadas y células Jurkat CD8+.

El equilibrio de proteínas pro-apoptóticas frente a las anti-apoptóticas determina si la célula completará el proceso apoptótico dando como resultado la muerte de la célula. IRX-2 invierte el cambio inducido por MV hacia la apoptosis que conduce a la protección de la apoptosis. El hecho de que IRX-2 funcione para regular al alza las proteínas centrales anti-apoptóticas como BCL-2, demuestra que es un inhibidor general de la apoptosis en células linfoides y es beneficioso en la protección de estas células de una amplia variedad de factores derivados de tumores.

Tabla 3. MV e IXR-2 modulan la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas. La intensidad media de la fluorescencia ± SD (a) y las proporciones (b) de proteínas pro- y anti-apoptóticas de células^a CD8+ activadas tratadas con MV- e IRX-2 se indican a continuación.

30 A.

	sin tratar		+MV		+IRX-2 + MV	
	intensidad media de la fluorescencia ± SD	intensidad media de la fluorescencia ± SD	valor de p (en comparación con muestra sin tratar)	intensidad media de la fluorescencia ± SD	valor p (en comparación con muestra tratada con MV)	
Bcl-2	7,7 ± 0,4	1,9 ± 0,1	0,0008	4,8 ± 0,6	0,0049	
Bax	17,9 ± 1,2	40,0 ± 1,5	0,0001	26,8 ± 2,3	0,0003	
Bcl-xL	20,1 ± 0,1	8,2 ± 0,4	0,0001	11,0 ± 0,8	0,0019	
FLIP	42,4 ± 0,6	17,5 ± 0,6	0,0002	25,5 ± 2,0	0,0030	
Bim	8,1 ± 0,3	16,7 ± 1,6	0,0016	9,2 ± 0,3	0,0020	
Mcl-1	37,5 ± 3,8	7,1 ± 1,1	0,0004	35,1 ± 1,6	0,0003	

B.

	Proporción Bax/Bcl-2		Proporción Bax/Bcl-xL		Proporción Bim/Mcl-1	
	Media ± SD	valor ^b de p	Media ± SD	valor ^b de p	Media ± SD	valor ^b de p
sin tratar	2,3 ± 0,6		0,89 ± 0,3		0,22 ± 0,3	
+MV	18,6 ± 1,2	0,0004	4,32 ± 0,5	0,0001	2,35 ± 0,2	0,0011
+IRX-2 + MV	5,58 ± 0,9	0,0002	2,44 ± 0,4	0,0003	0,26 ± 0,1	0,0009

^a Células CD8+ de sangre periférica (PB) activada se incubaron previamente con IRX-2 (a dilución 1:3, que contiene

~4 ng/ml o 90 UI/ml de IL-2), durante 24 horas y luego se trataron con 10 µg de MV durante 24 horas adicionales. Los niveles de expresión (intensidad media de la fluorescencia) de diferentes proteínas pro- y anti-apoptóticas se midieron mediante citometría de flujo. Los datos son medias ± SD obtenidos en 3 diferentes experimentos.

5 ^b Los valores de p indican cambios significativos en las proporciones entre células sin tratar y tratadas con MV o con IRX-2 + MV.

Ejemplo 9

La vía Akt/PI3K es la principal diana aguas abajo de la actividad anti-apoptótica de IRX-2.

10 La vía de señalización Akt/PI3K se reconoce como una de las rutas más críticas en la regulación de la supervivencia celular. Dado que nuestros resultados mostraron una influencia sustancial de IRX-2 en varias proteínas clave de la familia Bcl-2, que podrían ser reguladas por Akt/PKB, se midió la activación de Akt-1/2 en respuesta a MV y/o IRX-2 utilizando un anticuerpo específico para uno de los dos principales sitios reguladores de la fosforilación, fosfoserina 473. Las células Jurkat CD8+ no se trataron o se trataron con IRX-2 y MV (10 µg) en diferentes combinaciones como se indica. Los lisados celulares completos de las células de cada grupo de tratamiento se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF para posterior transferencia Western. La activación de Akt-1/2 se analizó 15 mediante transferencia con mAb anti-fosfo Akt específico de Ser473. Volver a sondear con un anticuerpo Akt total confirmó igual carga proteínica. Los resultados mostrados son representativos de un experimento de 3 realizados.

20 En células Jurkat CD8+ sin tratar (control) se fosforiló Akt-1/2 de manera constitutiva a un nivel característico de células Jurkat (Figura 20A, panel 1, carril 1). La incubación previa con IRX-2 no mejoró la fosforilación de Akt basal (Figura 15A, panel 1, carril 2). Sin embargo, cuando las células se trataron con MV, se observó una drástica desfosforilación de Akt-1/2 dependiente del tiempo (Figura 20A, panel 1, carriles 3 y 4). Un estudio de curso temporal con 10 µg de MV mostró que la desfosforilación de Akt comenzó a las 3 horas de incubación y se intensificó con el tiempo (datos no mostrados). El tratamiento previo de células Jurkat con IRX-2 inhibió completamente la desfosforilación inducida por MV de Akt-1/2 a las 3 y 24 horas de tratamiento (Figura 215A, panel 1, carriles 5 y 6).

25 Este pronunciado efecto pro-supervivencia de IRX-2 sobre células Jurkat CD8+, que contrarrestó claramente la inactivación de Akt inducida por MV, indicó que Akt podría servir como la diana principal aguas abajo de la señalización de IRX-2. Para confirmar esta hipótesis, las células Jurkat CD8+ se incubaron previamente antes del tratamiento con IRX-2 y MV con un inhibidor de molécula pequeña específico para Akt, Akti-1/2, y midieron los niveles de apoptosis de las células T. Las células Jurkat CD8+ se incubaron previamente con IRX-2 durante 24 30 horas o se dejaron sin tratar. A continuación, las células se trataron con un inhibidor de Akt, Akti-1/2 a diferentes concentraciones (0-5 µM) durante 1 hora antes de la adición de MV durante 3 horas adicionales. El nivel de apoptosis se midió mediante tinción con FITC-VAD-FMK y análisis de citometría de flujo. Los resultados son el porcentaje medio ± SD obtenido en 3 experimentos individuales (*p<0,05; **p<0,01 en comparación con la muestra tratada con MV sin IRX-2 e inhibidor de Akt).

35 Como se muestra en la Figura 15B, el tratamiento previo de las células con el inhibidor de Akt dio como resultado una anulación gradual del efecto anti-apoptótico de IRX-2. A una concentración del inhibidor relativamente baja de 1 µM, la protección contra la apoptosis proporcionada por IRX-2 solo se inhibió ligeramente. Sin embargo, se bloqueó completamente a la concentración del inhibidor de 5 µM. A estas concentraciones del inhibidor, la viabilidad celular no se vio afectada (datos no mostrados). Este hallazgo muestra que Akt es el principal coordinador aguas 40 abajo de la señal de supervivencia proporcionada por IRX-2.

Conclusiones de los Ejemplos 1-9

45 Confirmando los hallazgos previos de los solicitantes, se demostró inicialmente que la incubación de células Jurkat CD8+ o linfocitos T activados con MV indujo un significativo nivel de apoptosis. Las MV derivadas de tumor expresando una forma de membrana de FasL se purificaron a partir de sobrenadantes de la línea celular tumoral PCI-13 y se incubó conjuntamente con células Jurkat CD8+ o células T de sangre periférica (PB) activada. FasL, el ligando Fas, es una proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Las interacciones FasL-receptor desempeñan una importante función en la regulación del sistema inmunitario y en la progresión del cáncer. La apoptosis se induce tras la unión y la trimerización de FasL con su receptor (FasR), que abarca la membrana de una célula destinada a la muerte. FasL + MV indujo no solo la vía apoptótica extrínseca 50 mediada por el receptor, sino también la vía mitocondrial intrínseca en las células T activadas, acompañada de una regulación al alza de los miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptótica, Bax y Bim. La incubación previa de las Jurkat CD8+ o de las células T primarias activadas con IRX-2 suprimieron ambas rutas apoptóticas de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. Además, el pretratamiento de células T con IRX-2 proporcionó protección no solo contra la muerte celular inducida por MV, sino también contra la apoptosis inducida por Ab CH-11 y por estaurosporina. Dado que el primero induce apoptosis principalmente a través de la vía del receptor de la muerte y el último activa solo la vía mitocondrial, estos hallazgos muestran además que el IRX-2 puede proteger las células T de 55 la activación de las rutas de muerte tanto extrínseca como intrínseca.

Ejemplo 10 (no según la invención)

5 La selección de la dosis y el programa para el régimen de IRX-2 que se utilizará en los experimentos se basó en estudios realizados por IRX Therapeutics. El estudio de IRX Therapeutics se realizó en ratones inmunizados con el conjugado de péptido antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y se evaluó como un aumento en la hinchazón de la almohadilla plantar. La Figura 21 muestra estos datos y la curva característica "en forma de campana".

El estudio se realizó en cuatro grupos de pacientes, como se muestra en la Tabla 4 siguiente. El gráfico de infiltración de linfocito de tumor y la supervivencia de estos grupos se presentan en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

Tabla 4

Régimen	N	Dosis de inyección de IRX-2 (Unidades)	Inyección/día	nº de días	Dosis acumulativa de IRX-2 (Unidades)
1	4	~38 U	1	10	380 U
2	15	~115 U	1	10	1.150 U
3	10	~115 U	2	20	4.600 U
4	6	~660 U	2	20	26.400 U

10 En este estudio, se logró la máxima infiltración linfoide en los pacientes tratados con los 10 días de equivalencia de 115 U de IL-2/día. La supervivencia fue insuficiente en los cuatro pacientes que recibieron la dosis más baja (régimen 1). De manera similar, se observó una supervivencia más insuficiente en seis pacientes tratados con la dosis más alta. Mientras que la supervivencia parecía ser comparable en los regímenes 2 y 3, los pacientes del régimen 2 experimentaron la respuesta histológica más significativa medida por infiltración linfoide.

15 La dosis de IRX-2 a estudiar adicionalmente se seleccionó posteriormente como intermedia entre las dos dosis más activas investigadas (regímenes 2 y 3), una dosis claramente adecuada para lograr cambios histológicos significativos en el tumor y en los ganglios linfáticos. Basándose en la inconveniencia adicional de 20 frente a 10 días de tratamiento y la infiltración linfoide menor en los pacientes que recibieron la mayor dosis de IRX-2, se seleccionó un protocolo de inyección el día 10 con inyección bilateral (de aproximadamente un total de 2.300 U de IRX-2) para los estudios adicionales discutidos a continuación.

Ejemplo 11 (no según la invención)

25 Se realizó un estudio del protocolo de IRX-2 en pacientes con H&NSCC antes de la cirugía y/o radioterapia y/o quimiorradioterapia como se describe en la Figura 1. IRX-2 se administró de forma bilateral en 115 Unidades/sitio. Veintisiete pacientes fueron tratados; sus datos demográficos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Número de pacientes tratados	32
Edad media (intervalo)	66 (34-86)
Proporción V:H	25:7
Intervalo de la KPS	70-100
Características del paciente	
- Bucal	15
- Laringe	13
- Otro	4
Fase del diagnóstico	
- I	1
- II	5
- III	10
- IV	15

NA	1
Fase del tumor primario	
T1	1 (4)
T2	15 (56)
T3	6 (22)
T4	5 (19)
TX	0
Fase ganglionar	
N0	5 (19)
N1	8 (30)
N2	14 (52)
N3	0
NX	0

Se realizaron estudios radiológicos (CT o MRI) al comienzo y antes de la cirugía y se revisaron centralmente (Perceptive, Waltham, MA). La sangre se analizó centralmente (Immunosite, Pittsburgh, PA) al inicio y antes de la cirugía para varias poblaciones de leucocitos (Tabla 6 y 7). Las muestras quirúrgicas se enviaron a un laboratorio central de referencia (Phenopath, Seattle, WA) para la evaluación de los cambios histológicos y el rendimiento de la inmunohistoquímica para varios marcadores de leucocitos (Tabla 8). Se realizaron mediciones de laboratorio y clínicas apropiadas para evaluar la toxicología, y la mejora sintomática a través de la supervivencia sin enfermedad y global continúa siendo supervisada.

Resultados clínicos:

Tres pacientes tenían respuestas tumorales objetivas (2PR; 1MR). Cuatro pacientes mostraron respuestas radiológicas (>12,5 % de disminución); cinco pacientes (N2, N2, N1, N1, N1) se estadiaron a la baja ya que los ganglios detectados como positivos para el tumor en los sitios y centralmente se demostró que eran negativos en las muestras quirúrgicas. Cuatro tumores se ablandaron (un signo positivo), 14 pacientes tuvieron mejora sintomática/reducción del dolor y de la sensibilidad, mejor ingestión y menos hemorragia. Los efectos secundarios relacionados con el tratamiento fueron generalmente leves (grado I o II) e infrecuentes, incluyendo náuseas, vómitos, sequedad en la boca, estreñimiento, dolor en el lugar de la inyección, dolor de cabeza, mialgia, anemia y contusión. Se observó un único ejemplo de dispepsia grado III. Se están supervisando la supervivencia sin enfermedad y global. La mayoría de los pacientes se han eliminado un año y las curvas de supervivencia son muy similares a las observadas previamente por los solicitantes en los estudios en el Instituto Nacional del Cáncer de México y parecen mejores que los controles de los EE.UU. y de Méjico en los que coinciden los casos.

Ejemplo 12 (no según la invención)

Se recolectó sangre heparinizada para estudios de inmunofenotipado para determinar números de subconjuntos de células inmunitarias incluyendo las células B, T, NK y T virgen, T de memoria y T efectoras. Se utilizaron anticuerpos monoclonales etiquetados fluorescentemente para los marcadores de superficie celular indicados (o el control de isótopo correspondiente) para la tinción de toda la sangre de nueva aptación no fraccionada.

Las muestras teñidas y fijadas se adquirieron luego y se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500 y un software de análisis CXP TM. Se ha demostrado que la enumeración de subconjuntos de linfocitos T absolutos utilizando este procedimiento de plataforma única (solo citometría de flujo) que emplea perlas Flow Count TM es más precisa que las técnicas de plataforma dual (instrumentos de hematología y citometría de flujo) (Reimann y col., 2000). La Tabla 6 a continuación presenta una lista de los marcadores inmunitarios analizados por ImmunoSite y su función en una inmunización.

Tabla 6 - Marcadores inmunitarios analizados y Función de la respuesta inmunitaria

Celula	Marcador	Función
Célula T	CD3	Media en la inmunidad celular
Célula B	CD3-, CD19+ y CD14-	Media en la inmunidad humoral
Célula T colaboradora	CD3+ y CD4	Prepara citocinas, proporciona "ayuda" a las células B

Celula	Marcador	Función
Célula T citotóxica	CD3+ y CD8	Mata las células tumorales
Célula T Virgen (T _N)	CD3+, CD45RA+ y CCR7+	Antígeno virgen o estimulación posprimaria muy temprana; capacidad de migración al ganglio linfático
Célula T de memoria central (T _{CM})	CD3+, CD45RA- y CCR7+	Célula de memoria de larga vida, baja función efectora; migra a los ganglios linfáticos
Célula T de memoria efectora (T _{EM})	CD3+, CD45RA- y CCR7-	Intermediar en la función efectora; vida media más corta <i>in vivo</i> ; siembra tejidos/tumores sobre los ganglios linfáticos
Célula T efectora (T _{EMRA})	CD3+, CD45RA+ y CCR7-	Función efectora más alta (p. ej., citólisis); localiza mejor a los tejidos/tumor

Para los fines de la presente invención, solo se analizan en el presente documento las poblaciones celulares directamente relevantes para evaluar la hipótesis de si se produjo o no una inmunización.

5 Las rutas de desarrollo para los linfocitos T, especialmente las células T CD8+, se han estudiado intensamente durante la última década con un enfoque particular sobre las células T CD8+ ya que están más estrechamente asociadas con la inmunidad antitumoral eficaz. Tanto las células T colaboradoras CD4+ como las células T citotóxicas CD8+ se pueden subdividir en subpoblaciones recíprocas CD45RA+ y CD45RO+. Las células CD45RA+ se han denominado previamente células T vírgenes; sin embargo, un trabajo más reciente indica que estas células T en sangre comprenden células T vírgenes, así como efectores más completamente diferenciados a menudo denominados T_{EMRA} (Lanzavecchia, 2005; Kaech, 2002). Las células T de memoria CD45RO+ (CD45RA-) también se pueden subdividir en T de memoria central (T_{CM}) y T de memoria efectora (T_{EM}). Estas subclasificaciones se basan en la expresión superficial de marcadores adicionales que incluyen CCR7 (Sallusto, 1999; Tomiyama, 2004). Las rutas de desarrollo de estos diversos subconjuntos de células T y sus proporciones de linaje siguen siendo complejas. Los datos y las pruebas de significancia se presentan a continuación en la Tabla 7.

15 Tabla 7 - Resumen de evaluaciones de inmunología y pruebas de significancia

Población celular	N	Promedio de células/ml ³	Desviación típica	Diferencia entre la base de referencia y el día 21	Desviación típica	Grados de libertad	Valor t	Valor p
Base de referencia								
Filtro de linfocitos	25	1.177,5	442,4	-69,6	260,7	24	-1,33	0,1946
Célula B	18	275,4	132,2	-74,3	74,8	17	-4,22	0,0006
Célula T colaboradora	25	817,0	330,7	-65,4	184,0	24	-1,78	0,0884
Célula T citotóxica	25	351,9	193,3	-4,4	87,9	24	-0,25	0,8061
Célula T virgen	25	55,6	89,8	-38,2	76,9	24	-2,49	0,0203
Célula T de memoria central	25	56,9	84,5	-22,8	48,6	24	-2,34	0,0280
Célula T de memoria efectora	25	689,0	354,7	41,2	223,4	24	0,92	0,3651
Célula T de memoria RA efectora	25	395,0	250,2	-35,2	132,7	24	-1,33	0,1968

20 Consistente con la hipótesis de que IRX-2 actúa tanto sobre las células T como las CD para favorecer la activación, maduración y mejorar la presentación de antígeno de tumor endógena a las células T vírgenes, se observó que la población de linfocitos T vírgenes (CD3+, CD45RA+ y CCR7+) disminuyó entre la base de referencia y el día 21. Las células T vírgenes se activan inicialmente mediante el reconocimiento del antígeno cuando se presentan en las moléculas apropiadas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) por las CD maduras. Las etapas posteriores de generar memoria de células T y función efectora completa no están perfectamente definidas, pero está claro que diferentes subpoblaciones de células T tal como se definen por varios marcadores, es decir, CD45RA/RO y CCR7 tienen propiedades funcionales distintas. Por ejemplo, la expresión de CCR7 confiere la capacidad de las células T para migrar a los ganglios linfáticos donde se produce el cebado antitumoral más eficaz.

25 Se observó una disminución significativa en la población de células T vírgenes (CD3+, CD45RA+ y CCR7+) con niveles de población de 55,6 células/ml³ en la base de referencia que cayeron a 17,4 células/ml³ en el día 21

($p = 0,02$). Una pérdida de células T vírgenes resulta de aquellas células que encuentran y son estimuladas por sus respectivos antígenos afines y la diferenciación en una población funcional alternativa, cualquiera de las dos poblaciones de memoria o de efectores completos.

5 Además, la población de células T de la memoria central (CD3+, CD45RA- y CCR7+) con CCR7+ confirió propensión a la migración al ganglio linfático, cayó de 56,9 células/ml³ en la base de referencia a 34,1 células/ml³ en el día 21 ($p = 0,028$). Esto también es un indicador de que la inmunización a antígenos tumorales está teniendo lugar en respuesta a la terapia con IRX-2. Los estudios muestran que la población de T_{CM} de células T representa la población de memoria más antigua, más “como una célula madre”, que tras la reestimulación, migra preferentemente al ganglio linfático donde puede obtener más función efectora, p. ej., citolítica. La disminución significativa observada en esta población es consistente con estas células T_{CM} que salen del torrente sanguíneo y migran a los ganglios linfáticos que drenan donde se activarán más.

10 Después de una inmunización, se esperaría que otras células inmunitarias se sumarían al ataque contra el transgresor portador de antígeno. Se observó un apoyo adicional a la hipótesis de la inmunización en el sentido de que se observó una caída significativa ($p < 0,01$) en las células B. Las células B se identifican en los ganglios linfáticos donde están expuestas al antígeno y luego salen para encontrarse en el tumor donde supuestamente producen anticuerpos que pueden atacar el tumor directamente o que apoyan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

15 Los cambios y tendencias estadísticamente significativos observados en la presente documento muestran en gran medida que se está produciendo una inmunización de células T vírgenes debido a la administración de IRX-2. Como no se observaron otras intervenciones primarias en estos pacientes, es poco probable que estos cambios se produzcan al azar.

20 La hipótesis de que el tratamiento con IRX-2 induce la inmunización contra antígenos tumorales autógenos también está apoyada por la información publicada por los solicitantes sobre la respuesta del ganglio linfático en H&NSCC después del tratamiento con IRX-2 en comparación con los pacientes con control normal no aleatorizado y con H&NSCC (Meneses, 2003). Las características destacadas de la respuesta del ganglio linfático asociadas con el tratamiento con IRX-2 fueron la reabsorción ganglionar y la expansión de linfocitos, particularmente los linfocitos T, que se mostró que se agotaban en los ganglios linfáticos de pacientes con H&NSCC no tratados (Verastegui, 2002). La expansión ganglionar que se produce durante una inmunización supuestamente debida a IRX-2 también se observó que estaba asociada con una reversión de la histiocitosis sinusal, un defecto funcional aparente de las células dendríticas. Estos cambios son consistentes con una inmunización. Un estudio previo confirma que la inmunización al antígeno tumoral se produce a nivel del ganglio linfático regional, no del tumor en sí (Maass, 1995).

Histología

35 Cuando se produce una inmunización en los ganglios linfáticos, se cree que las nuevas células T de memoria asesinas se desarrollan y luego salen de los ganglios a través de los vasos sanguíneos, y fluyen hacia los tejidos para patrullar por la diana antigénica (es decir, la diana inmunitaria). Si se identifica la diana antigénica, la célula T de memoria asesina se infiltrará en el tejido para destruir la diana. Cuando se inicia una respuesta inmunitaria celular, se captan otras células inmunitarias para participar en el proceso de destrucción y limpieza.

40 La infiltración de linfocitos T en tumores, particularmente de células T CD45RO+ y CD8+, es prueba de una inmunización por antígenos tumorales y dicha infiltración se correlaciona con una mejorada supervivencia en diversos cánceres incluidos H&NSCC, melanoma, colorrectal y ovárico (Wolf, 1986; Pages, 2005; Galon, 2006).

45 En el presente documento se planteó la hipótesis de que una inmunización inducida por IRX-2 en los ganglios linfáticos daría como resultado un infiltrado linfocítico en el tumor y la alteración del tumor y la presencia de células inmunitarias específicas en el tumor proporcionaría la evidencia de una respuesta inmunitaria antitumoral. También se planteó la hipótesis de que una respuesta inmunitaria al tumor sería evidenciada por un infiltrado linfocítico difuso, abarcando el área periférica del tumor hasta su área intratumoral.

50 La formalina fijó bloques incorporados en parafina o láminas no teñidas de la biopsia de tumor primario y los especímenes de resección se sometieron por los centros clínicos a PhenoPath Laboratories (Seattle, WA) a hematoxilina y eosina ("H & E") y a tinción inmunohistoquímica ("IHC"). Se presentaron muestras emparejadas de 26 sujetos del estudio con IRX-2, 25 fueron evaluables y un espécimen quirúrgico no tenía prueba histológica de tumor. Se recogieron dos grupos comparativos *ad hoc* de especímenes quirúrgicos al final del estudio para la comparación H & E: 25 especímenes quirúrgicos del MD Anderson y 10 especímenes quirúrgicos del Stony Brook Health Sciences Center, seleccionadas al azar de especímenes quirúrgicos H&NSCC sin tratar.

La tinción inmunohistoquímica se realizó solo en las muestras tratadas con IRX-2 para determinar la presencia de marcadores inmunitarios en el tumor. Sus marcadores se enumeran en la Tabla 8.

55 Tabla 8 - Inmunomarcadores analizados por IHC

Célula	Marcador	Función en la respuesta inmunitaria
Célula T	CD3	Median en la inmunidad celular
Célula B	CD20	Producen anticuerpos
Células T colaboradoras	CD4	Originan citocinas; ayudan a las células B
Célula T citotóxica	CD8	Destruyen el tumor
Célula del plasma	CD138	Producen anticuerpos
Macrófago	CD68	Ayudan a la célula T y destruyen el tumor
Célula T virgen/efectora	CD45RA+	Célula T virgen/ efectora
Célula T de memoria	CD45RO (RA-)	Célula T comprometida con el antígeno

5 La presencia de marcadores teñidos con IHC se evaluó con baja potencia y se graduó utilizando una escala analógica visual (EVA) definida prospectivamente de 0-100 mm, donde 0 representaba el 0 % de presencia y 100 representaba el 100 % de las células con tinción positiva para el marcador. La reacción de peroxidasa utilizada para resaltar el marcador sobrevalora el área o densidad de la infiltración de linfocitos en comparación con la tinción con H & E, haciendo así no fiables las determinaciones de densidad basadas en IHC, pero la IHC sigue siendo útil para explicar las relaciones relativas entre los tipos de células.

Estudios de H & S: Procedimientos y Análisis

10 Se realizaron tres análisis comparando las láminas teñidas con H & E. Dos de los análisis fueron extracciones con características ciegas de 25 especímenes quirúrgicos tratados con IRX-2 y 25 sin tratar de MD Anderson, uno para las características del tumor y uno para las características de la respuesta inmunitaria. El tercer análisis fue una extracción de la característica de respuesta inmunitaria idéntica pero no mezclada de las 10 láminas teñidas con H & E de Stony Brook. En cada caso, las características se extrajeron y cuantificaron utilizando una EVA en los formularios de informes de los casos.

15 Se realizaron dos evaluaciones para cada una de las características de respuesta inmunitaria, la primera evaluación fue la presencia global del marcador en todo el espécimen quirúrgico y la segunda fue el grado en que la ubicación del infiltrado era periférica o intratumoral.

20 Se realizó una evaluación global teniendo en cuenta: infiltración de linfocitos, su densidad, su equilibrio entre tumor e infiltración y otras características que comprenden la impresión gestalt (de la fisonomía) del tumor. Las otras características secundarias incluyen la extensión de la fibrosis y la necrosis, sugiriendo dónde estaba el tumor pero ya no existe y, en el caso de cáncer de células escamosas bien diferenciado, una concentración de perlas de queratina con mínimo o ningún tumor circundante es otro signo de destrucción del tumor. Una "Respuesta Inmunológica Activa" incluye evidencia de la infiltración linfoide del daño creado por el sistema inmunitario, y el grado en que el tumor ya no es viable y es alterado, en resumen, la extensión y el proceso por el cual el anfitrión está combatiendo el tumor. Un ejemplo de la característica secundaria de la infiltración de linfocitos de la "Respuesta Inmunológica Activa" se presenta en las Figuras 19 y 20.

30 Una de las características secundarias dominantes en la variable Respuesta Inmunológica Activa es la localización e intensidad de la infiltración de linfocitos (LI) que se observan en pacientes tratados con IRX-2. Los especímenes quirúrgicos que demuestran esta reacción tanto en pacientes tratados con IRX-2 como en los grupos de comparación *ad hoc* demostraron aumentos marcados en la densidad de LI total, LI peritumoral y LI intratumoral.

Basado en el punto crítico especificado previamente de 50 mm o mayor en la EVA, el análisis mostró diferentes tasas de Respuesta Inmunológica Activa entre los tres grupos de especímenes quirúrgicos como se muestra a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

Grupo	Paciente con AIR	Pacientes totales	Tasa de Respuesta Inmunológica Activa
1. Tratado con IRX-2	11	25	44,0 %
2. MD Anderson	6	1	24,0 %
3. Stony Brook	1	10	10,0 %

35 El aumento en la frecuencia de aquellos pacientes que demuestran una Respuesta Inmunitaria Activa pasó desde el 20 % en los grupos combinados MD Anderson y Stony Brook hasta el 44 % en el grupo tratado con IRX-2 ($p < 0,05$ mediante la prueba Chi-cuadrado).

Determinación de LI peritumoral frente a intratumoral

También se evaluó la ubicación de las células inmunitarias en el tumor. En el presente documento se planteó la hipótesis de que una respuesta inmunitaria antitumoral activa incluiría un infiltrado linfático que se expandió desde el área periférica hasta incluir el área intratumoral.

5 Basándose en el análisis de EVA para la Respuesta Inmunitaria Activa en los pacientes tratados con IRX, 11 mostraron reacciones intensas (≥ 50 , denominados pacientes que responden al tratamiento) y 14 mostraron reacciones menos intensas (< 50 , denominados pacientes que no responden al tratamiento). Una comparación de la LI de estos dos grupos se muestra en las Figuras 21A y 21B.

10 Como se puede ver, los pacientes que responden al tratamiento mostraron un aumento marcado en la LI (tanto área como densidad) de la sección típica y en comparación con los no pacientes que responden al tratamiento, el aumento en la LI intratumoral es proporcionalmente mucho mayor que el cambio peritumoral.

15 La inmunohistoquímica para la ubicación de varios marcadores ayuda a aclarar qué células dominan en cada región. La Figura 22 muestra estos resultados. El infiltrado peritumoral, que representa aproximadamente el 25 % de la LI en el espécimen, estaba dominado por linfocitos T CD45RA+, CD3+, CD4+ y linfocitos B CD20+. Mientras que el infiltrado intratumoral, que representa aproximadamente el 75 % de la LI en el espécimen, estaba dominado por linfocitos CD45RO+, CD3+ y CD8+ (es decir, el fenotipo de células T efectoras "asesinas") y macrófagos CD68+. La Figura 23 proporciona un ejemplo gráfico de tinción de IHC para las células T de memoria CD45RO+ en un espécimen quirúrgico tratado con IRX-2. La Tabla 10 muestra los resultados de la presencia de cada población celular en el tumor.

20 Tabla 10

Población de células	N	Presencia en el tumor*	
		Media global	Media intratumoral
Célula T (CD3)	24	52,3	76,5
Célula B (CD20)	24	11,0	21,2
Célula T colaboradora (CD4)	24	15,5	53,1
Célula T citotóxica (CD8)	24	37,8	85,7
Macrófago (CD68)	24	42,1	91,5
Célula T efectora (CD45 RA)	24	7,4	18,4
Célula T de memoria (CD45 RO)	24	65,4	87,3

*Medidas basadas en evaluaciones de Escala Analógica Visual (EVA) de 100 mm

25 El soporte más fuerte para esta hipótesis de inmunización se deriva del examen de la infiltración de linfocitos para la infiltración en y alrededor del tumor y la imagen del rechazo del tumor que indica necrosis, fibrosis y tumor reducido. Los patrones de rechazo son característicos de la inmunidad tanto humoral como celular con el aumento de linfocitos B y macrófagos activados dentro del tumor, respectivamente. Cambiando el equilibrio a la inmunospección superando la inmunosupresión observada en pacientes con cáncer y restaurando la función inmunitaria, el tratamiento con IRX-2 hace que el anfitrión rechace el tumor y se inmunice contra el tumor llevando a una recurrencia reducida y a una supervivencia aumentada.

30 Ejemplo 13 (no según la invención)

En un paciente, se compararon exploraciones con FDG de las PET/TC fusionadas el día 0 y el día 21, como se muestra en la Figura 24. Se midieron la actividad glicolítica total y el volumen y se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

	Actividad glicolítica total		
	Base de referencia	Día 21	% de cambio
Tumor	68,91	31,36	-54,49 %
Ganglio 1	72,54	4,97	-93,15 %
Ganglio 2	14,35	3,15	-78,05 %
	155,80	39,48	-74,66 %

	<u>Volumen</u>		
	<u>Base de referencia</u>	<u>Día 21</u>	<u>% de cambio</u>
Tumor	12,16	7,33	-39,72 %
Ganglio 1	9,46	1,44	-84,78 %
Ganglio 2	2,28	1,24	-45,61 %
	23,90	10,01	-58,12 %

Ejemplo 14 (no según la invención)

La supervivencia global se determinó tanto para la totalidad de los pacientes (Figura 25) como para los pacientes en la Fase IVa (Figura 26). La Figura 25 muestra tres gráficos de Kaplan Meir de supervivencia global. La línea superior es el estudio de Fase 2 multicéntrico finalizado recientemente (mediana del seguimiento de 18,6 meses), la línea media es el estudio de Fase 1/2 central único finalizado hace 10 años y en comparación con el mejor comparador disponible, el ensayo aleatorizado del RTOG 9501 emparejado con el sitio. En ambos grupos tratados con IRX-2, la supervivencia está por encima de los datos del ensayo del RTOG 9501 emparejado con el sitio anatómico. Los datos sugieren que la inmunización impulsada por IRX-2 es duradera y conduce a una mejorada supervivencia. La Figura 26 muestra los tres gráficos de Kaplan Meier de supervivencia global, la cohorte de la Fase IVa. La línea superior es el estudio de Fase 2 multicéntrico finalizado recientemente (mediana del seguimiento de 18,6 meses), la línea media es el estudio de Fase 1/2 central único finalizado hace 10 años y en comparación con el mejor comparador disponible, el ensayo aleatorizado del RTOG 9501 emparejado con el sitio. En ambos grupos tratados con IRX-2, la supervivencia está por encima de los datos del ensayo aleatorizado del RTOG 9501 emparejado con el sitio anatómico. Los datos sugieren que la inmunización dirigida por IRX-2 es duradera y conduce a una mejorada supervivencia en pacientes en la Fase IVa.

Ejemplo 15 (no según la invención)

Se demostró que IRX-2 aumentaba el tamaño del ganglio linfático regional, el área y la densidad de las células T e invertía la histiocitosis sinusal. Controles, controles H&NSCC y pacientes con H&NSCC administrados con IRX-2 se comparan en las Figuras 27A-D. Veinte pacientes de un total de 50 con H&NSCC tratados con el protocolo IRX-2 se seleccionaron como que tienen ganglios linfáticos regionales no implicados adecuados para la evaluación. Todos mostraron respuestas clínicas, ya fueran respuestas parciales (PR, >50 % de reducción del tumor) o respuestas menores (MR, <50 %>25 % de reducción tumoral). Los pacientes que respondían completamente al tratamiento (3/50) y los que no (5/50) fueron excluidos por razones obvias. Se seleccionaron aleatoriamente diez especímenes de LN con control H&NSCC como grupo de control (control H&NSCC) y se seleccionaron aleatoriamente 10 biopsias de LN de control sin cáncer (grupo de control). Las patologías LN obvias se excluyeron del grupo de control. En general, el 95 % de los LN con IRX-2, el 80 % de los controles sin cáncer y el 60 % de los controles H&NSCC se consideraron estimulados. En general, los LN de los pacientes tratados con IRX-2 mostraron un alto porcentaje de estimulación con un cambio hacia la reactividad de las células T. El tamaño medio de los LN de los controles H&NSCC fue significativamente más pequeño que el grupo de control y los de los pacientes con H&NSCC tratados con IRX-2 fueron significativamente más grandes que el control con cáncer y sin cáncer ($p < 0,01$) (Figura 27A). El área de los LN de "otras células" de células no T y B por sustracción y por tinción PAS era aproximadamente 25 % del total y correspondía principalmente al grado de histiocitosis sinusal (Figura 5). Debe observarse que la histiocitosis sinusal se marcó en el control H&NSCC pero no en los otros grupos. En 9 de los 10 controles de H&NSCC, pero en ninguno de los otros casos, también se observó congestión sinusal con eritrocitos; sin embargo, la eritrofagocitosis por los his-linfocitos, ya sean B o bien PC, o linfocitos T, se calcularon y se correlacionaron con el área del ganglio linfático que transporta las poblaciones linfoides correspondientes (Figura 27C). El área de las células T de los controles H&NSCC se redujo modestamente ($p = NS$) y la densidad se redujo significativamente ($p < 0,01$), en comparación con los controles sin cáncer (Figura 27B). El área de las células T de pacientes tratados con IRX-2 se incrementó en comparación con los controles sin cáncer ($p = NS$) y de manera significativa sobre los controles H&NSCC ($p < 0,01$). La densidad de las células T de los LN tratados con IRX-2 fue significativamente mayor que ambos controles ($p < 0,01$) (Figura 27D).

Ejemplo 16 (no según la invención)

Figuras 28A-D: La histiocitosis sinusal se caracteriza porque la mayoría de las células son grandes, granulares, PAS-positivas y una minoría de células T CD3+ de tamaño variable. La Figura 28A representa un ejemplo típico de un control de HN SCC con Histiocitosis Sinusal. La Figura 28B muestra la tinción con CD68+ de un ganglio linfático con Sinus. El tratamiento con IRX-2 se asoció con una reversión de la histiocitosis sinusal aparente en los controles HNSCC. La Figura 28C muestra un ejemplo típico de un ganglio linfático con histiocitosis sinusal y congestión de eritrocitos. La Figura 28D es un gráfico de barras que muestra la inversión de la histiocitosis sinusal en pacientes tratados con IRX-2.

Ejemplo 17 (no según la invención)

Figuras 29A-F: El panel superior muestra ejemplos de la biopsia del tratamiento previo de tres pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (H&NSCC). Las biopsias promedian 80 % de tumor y 20 % de estroma con una leve aspersión de linfocitos en el estroma. El panel inferior muestra secciones típicas del tumor después del tratamiento con el régimen IRX-2. Es notable la gran infiltración de linfocitos con desplazamiento del tumor. En este ensayo en INCAN 22/25 pacientes (88 %) mostraron la respuesta.

Ejemplo 18 (no según la invención)

La Figura 30 muestra la intensidad de necrosis y fibrosis en el espécimen quirúrgico de 11 pacientes que responden completamente al tratamiento (44 %) frente a 14 pacientes que no responden al tratamiento tratados con el régimen con IRX-2 en el ensayo de Fase 2 de los EE. UU.

Ejemplo 19 (no según la invención)

Se muestra que IRX-2 estimula la infiltración de células T asesinas que causa la destrucción del tumor, como se muestra en las Figuras 31A-D. Las Figuras 31A-D son tinciones de H & E e IHC (inmunohistoquímica) de especímenes de resección de pacientes tratados con IRX-2. A pesar de la heterogeneidad de los tumores, se observa una frecuencia incrementada del infiltrado rápido representado en la Figura 31B e indicado por la flecha como un lago de linfocitos. Ilustrado en la Figura 31D, la tinción de inmunohistoquímica confirma que el infiltrado es el fenotipo CD45RO de células T asesinas de la memoria. Cada vez hay más pruebas de que la infiltración de linfocitos en los tumores predice un mejor resultado en el cáncer colorrectal, ovárico, de mama, y de cabeza y cuello. El infiltrado linfocítico proporciona un vínculo sobre por qué los pacientes parecen vivir más tiempo de lo esperado sin enfermedad, el resultado de la memoria inmunitaria que puede atacar micro metástasis y, de ese modo, retrasar o impedir la recurrencia y mejorar la supervivencia.

Ejemplo 20 (no según la invención)

Se realizó inmunohistoquímica para comparar infiltrados intratumorales frente a peritumorales. Los datos del resumen de la evaluación de presencia global y ubicación de las células inmunitarias en el espécimen de resección del tumor basada en tinción inmunohistoquímica se presentan a continuación en la Tabla 12. La presencia combinada de células B en el área periférica del tumor y el infiltrado linfocítico intratumoral difuso que es principalmente CD8+ y CD45 RO+ (es decir, el fenotipo de células T efectoras "asesinas") copresente con macrófagos CD68+ activados sugiere la estimulación antigénica y una respuesta inmunitaria antitumoral.

Tabla 12

	Paciente que responde al tratamiento	Paciente que no responde al tratamiento	Valor de p
CD3	85:15	69:31	<0,05
CD4	59:41	49:51	NS
CD8	93:7	80:20	<0,05
CD45RO	97:3	79:21	<0,01
CD45RA	32:68	2:98	<0,02
CD20	30:70	17:83	NS
CD68	96:4	88:12	<0,01

Ejemplo 21 (no según la invención)

Células dendríticas

Uno de los tipos de células clave sobre las que actúa IRX-2 es la célula dendrítica. Los pacientes con cáncer tienen una función reducida de las células dendríticas como resultado de la reducción de la captación de antígenos, la presentación de antígenos y la expresión de las moléculas de señalización necesarias para la estimulación eficaz de las células T.

Como se muestra en la Figura 32, las moléculas de señalización claves para la estimulación de las células T y adhesión sobre las células dendríticas son CD86, CD40 y CD54. En pacientes con cáncer, los componentes de la mecanismo de presentación de antígeno están regulados a la baja en las células dendríticas, dando como resultado una reducción de la presentación eficaz del antígeno a las células T. IRX-2 puede activar y madurar las células dendríticas tanto fenotípicamente como funcionalmente. Al aumentar la expresión del mecanismo de presentación de antígeno, IRX-2 actúa para restaurar la función de presentación del antígeno.

En la Figura 33 se muestran datos de citometría de flujo estadísticamente muy significativos que muestran las acciones de IRX-2 en el mecanismo de presentación de antígenos de la célula dendrítica y la capacidad de estimulación de las células T. Las células dendríticas requieren la regulación al alza de HLA-DR para presentar antígeno en el surco del MHC de Clase II. CD86 es el receptor coestimulador de las células T vírgenes, que es una de las señales necesarias para la activación de las células T y la creación de células T de memoria asesinas. Las células dendríticas que no expresan CD86 son tolerantes con las células dendríticas y funcionan creando células T reguladoras supresoras específicas de antígeno. Al administrar IRX-2 y aumentar las proteínas coestimuladoras, es posible cambiar este equilibrio desde tolerar las células dendríticas hasta activar las células dendríticas, y se inicia una respuesta inmunitaria coordinada y robusta contra la diana inmunitaria.

La Figura 34 muestra datos de citometría de flujo estadísticamente muy significativos que muestran las acciones de IRX-2 sobre la potencial capacidad estimuladora de las células T de las células dendríticas. Los aumentos en la expresión de CD40 son necesarios para generar una activación sostenida de las células T y la generación de células T de memoria. CD54 también se denominó ICAM-1, y está involucrado en las interacciones entre células T y células dendríticas y proporciona una segunda de las señales requeridas para la activación de las células T. Así, regulación al alza de estas moléculas en células dendríticas asegura que la respuesta inmunitaria celular iniciada por IRX-2 es sostenida y robusta.

La Figura 45 muestra datos que comparan diversas diluciones de IRX-2 y TNF recombinante y su capacidad respectiva para regular al alza la expresión de CD83, un marcador de células dendríticas maduras. Los múltiples componentes activos en IRX-2, presentes en cantidades fisiológicas, actúan sinérgicamente para aumentar la expresión de CD83 en aproximadamente 4 veces la magnitud de la cantidad equivalente de TNF presente en IRX-2. Para lograr resultados similares con TNF solo, se requirieron de 10 a 25 veces la concentración, cantidades que claramente excederían la concentración en tejido o ganglio linfático (suprafisiológico/farmacológico).

La Figura 36 muestra datos de un ensayo para determinar la capacidad de las células dendríticas para inducir la proliferación de células T, una evaluación funcional de la capacidad de una célula dendrítica para activar células T vírgenes. IRX-2 mejora la actividad estimuladora de la célula T de CD. Las CD inmaduras (GM-CSF/IL4 × 7d) se estimularon con IRX-2 o solo medio de control X-VIVO 10 (círculos cerrados o abiertos, respectivamente). Después de 48 h, las CD se recogieron, se lavaron a fondo y se cultivaron conjuntamente con células T purificadas alogénicamente con lana de nailon (2×10^5 /pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo en las proporciones indicadas de estimulador (CD) a paciente que responde al tratamiento (T). El día 5 del cultivo conjunto, las células se pulsaron con BrdU y el BrdU incorporado se midió 18 horas más tarde mediante un ensayo colorimétrico ELISA anti-BrdU. Este gráfico muestra los resultados de un donante representativo de 6 donantes individuales evaluados, expresados como índice de estimulación media (S.I.) (\pm SEM) a las 4 proporciones CD:T ensayadas. S.I. se define como [(D.E. Célula T estimulada por CD. - D.E. CD sola)/D.E. Célula T en reposo]. La S.I. media de los 6 donantes en todo el intervalo de las proporciones CD:T mostró una mejora estadísticamente significativa cuando las CD tratadas con IRX-2 se utilizaron como estimuladoras ($p < 0,05$, por ANOVA). Hubo un aumento significativo en la capacidad de las células dendríticas tratadas con IRX-2 para inducir la proliferación de las células T, una confirmación de que los cambios en las células dendríticas fenotípicas inducidas por IRX-2 también daban como resultado una célula dendrítica funcionalmente activa que puede causar de manera eficaz la estimulación y proliferación de las células T.

Ejemplo 22 (no según la invención)

IRX-2 mejora la producción de IFN- γ específica de péptido y DTH

Los ratones se inmunizaron con dosis variables de péptidos de PSMA con y sin IRX-2. La respuesta de las células T después de la exposición a péptido o conjugado se evaluó mediante respuesta DTH (Figura 37A) o producción de IFN- γ (Figura 37B) en respuesta a un péptido posterior. La vacuna de conjugado +IRX-2 aumenta la respuesta de células T celular específica de antígeno *in vivo* (DTH) y *ex vivo* (producción de IFN- γ por linfocitos de bazo). Esto es importante porque una respuesta celular es un requisito esencial en una vacuna eficaz contra el cáncer. Además, las respuestas de las células T *in vivo* y *ex vivo* están ambas relacionadas con la dosis de la vacuna utilizada con IRX-2. La respuesta a la dosis confirma que la respuesta es impulsada por el antígeno de la vacuna y no solo debido a IRX-2.

Ejemplo 23 (no según la invención)

IRX-2 es superior a otros adyuvantes en la mejora de DTH específico del péptido

La nueva naturaleza de la actividad de IRX-2 se confirmó comparando IRX-2 con otros adyuvantes que se seleccionaron para representar diversos mecanismos de acción. El alumbre se evaluó porque es un adyuvante ampliamente aprobado por la FDA, CpG porque es un agonista de TLR que se dirige a las células presentadoras de antígenos y el Sistema Adyuvante RIBI (RAS) porque contiene múltiples actividades adyuvantes y es una alternativa más segura que el adyuvante de Freund. Como se muestra en la Figura 38, todos los adyuvantes ensayados causaron una respuesta DTH cuando se enfrentaron con el conjugado; sin embargo, solo IRX-2 mejoró la respuesta DTH específica del péptido a la vacuna del conjugado mientras que alumbre, CpG o RAS no se mostraron en la

Figura 43. Los estudios informados aquí proporcionan datos preclínicos importantes que apoyan la hipótesis de que el IRX-2 mejora las respuestas inmunitarias de las células T a antígenos exógenos para su uso en combinación con múltiples tipos de antígenos en vacunas terapéuticas contra el cáncer. La naturaleza única de la respuesta específica del péptido de las células T a la vacuna conjugada es un resultado del modo de acción de múltiples dianas del IRX-2 y la supuesta sinergia entre las citocinas.

Ejemplo 24 (no según la invención)

Prueba de la acción sobre las células inmunitarias en la circulación periférica

Los siguientes datos se resumen a partir de la supervisión inmunitaria de la sangre periférica al inicio del estudio y el día 21. Disminuciones estadísticamente significativas en la sangre periférica en 21 días en las poblaciones de células CCR7+, aquellas con potencial migración a ganglios linfáticos, y las células B son consistentes con la reunión de estas células fuera de la circulación y en los ganglios linfáticos para su activación por las células dendríticas. Ningún cambio o una ligera tendencia hacia un mayor número de células efectoras son consistentes con las células T citotóxicas que pasan temporalmente a la circulación y luego al tejido para destruir la diana antigénica. Los cambios globales en la sangre periférica de los pacientes tratados con régimen IRX-2 tanto de las células inmunitarias como de las células reguladoras T son consistentes con una inmunización en los ganglios linfáticos, un cambio desde un ambiente tolerante hasta uno estimulante, como se muestra en general en la Figura 39.

En la Figura 40 se presentan los recuentos absolutos al inicio y el día 21 (después de completar el régimen IRX-2) de las células T reguladoras en la sangre periférica de pacientes con cáncer de Cabeza y Cuello. Cada línea representa a un paciente y la línea en negrita representa la media del grupo. Varios estudios previos han indicado que las células T reg han aumentado en los pacientes con cáncer (ovárico, colorrectal, hepatocelular y HNSCC) y que el aumento de T reg se asocia con un peor pronóstico. El hecho de que las T reg de 18 de 26 pacientes permanezca igual o desciendan en solo 21 días es un hallazgo llamativo y significativo porque las células dendríticas tolerantes deben continuar expandiendo la población de T reg. El régimen IRX-2 estabiliza los recuentos de T reg en los niveles basales, y es un hallazgo significativo que refleja una mejorada supervivencia en estos pacientes.

Ejemplo 25 (no según la invención)

Prueba de encogimiento del tumor consistente con inmunización

Las Figuras 41A y 41B muestran exploraciones con FDG por PET/TC fusionadas de una gran base derecha de 5,2 cm de lengua primaria con dos ganglios linfáticos implicados muestra una disminución de volumen del 58 % y una reducción de la actividad glucolítica total del 75 % en 21 días. Hay prueba del encogimiento del tumor que apoya la hipótesis de que está ocurriendo un rechazo e inmunización antitumoral.

Ejemplo 26 (no según la invención)

Anteriormente, los criterios de la histopatología de una biopsia frente a un espécimen de tumor (Meneses) fueron que el tumor se redujo en general, se produjo la fragmentación del tumor y hubo un aumento en la infiltración de linfocitos (LI). Según la presente invención, existen nuevos criterios presentados en el presente documento para un tumor tratado frente a un tumor de control, concretamente una alteración del tumor con necrosis y fibrosis, y una LI aumentada que es mayor intratumoralmente que peritumoralmente. A continuación, en la Tabla 13 se resumen varios hallazgos del tratamiento con citocina en el H&NSCC. De manera importante, se muestra que IRX-2 que trabaja en todos los brazos del sistema inmunitario mientras que otros agentes terapéuticos de citocinas de múltiples componentes no lo hacen. MULTIKINE (Cel-Sci) incluye múltiples citocinas en su formulación; sin embargo, su efecto es uno solo sobre el propio tumor, no sobre el sistema inmunitario.

Tabla 13

	Tratado	Control	
De Stefani rIL-2	Tumor	Tumor de control	↑ LI, ↑ necrosis, ↑ fibrosis
Meneses IRX-2	Tumor	Biopsia	↑ LI, ↓ tumor, ↑ fragmentación
Feinmesser Multikine	Tumor	Biopsia	↑ LI, ↓ tumor
Timar Multikine	Tumor	Tumor de control	↑ LI, No ↓ tumor ni fragmentación
IRX Therapeutics	Tumor	Biopsia	↑ LI - tumor pequeño, ↑ fragmentación
	Tumor	Tumor de control	↑ LI, ↑ fibrosis

Conclusión general

Este estudio confirma y amplía las observaciones previas de los solicitantes con respecto a la capacidad del régimen

- 5 IRX-2 para tener actividad biológica significativa en pacientes con tratamiento del cáncer de cabeza y cuello de células escamosas antes de la cirugía. El presente estudio confirma que el tratamiento es seguro con pocos acontecimientos adversos atribuidos al régimen. De hecho, aquellos pacientes que mostraron prueba de cambios histopatológicos de la infiltración de linfocitos tuvieron la mayoría de las mejoras de los síntomas como dolor y sensibilidad reducidos, respiración y fonación mejoradas y ablandamiento del tumor (como signo de disolución). Tres pacientes se consideró que tenían respuestas clínicas (2PR, 1 MR). Los datos de supervivencia global y la supervivencia sin recurrencia mientras son inmaduros son alentadores y similares en grado y perfil al estudio previo de los solicitantes. Es notable que no se produjeran muertes debido a recurrencia en los primeros 12 meses de seguimiento. Todas muertes hasta la fecha pero una está en el grupo que no responde al tratamiento.
- 10 Los datos más convincentes son los asociados con los estudios del mecanismo de acción. Se observó que disminuciones de los linfocitos B y dos subconjuntos de células T se asociaron con la inmunización inicial y la migración de los ganglios linfáticos. No se observaron aumentos en la célula de memoria/efectora en la sangre; sin embargo, esto es explicable basado en los patrones de tráfico de las células T que se producen con una inmunización. En particular, no se observó ningún aumento en T reg.
- 15 Los estudios previos de los solicitantes mostraron que los pacientes que responden al régimen IRX-2 muestran un aumento de ganglios linfáticos no implicados próximos al tumor, reposición de áreas de linfocitos T mermados y la imagen de activación como ocurre con el antígeno. Así, los linfocitos son el tráfico a través de sangre y linfáticos a los ganglios linfáticos regionales donde presumiblemente se inmunizan a antígenos tumorales autólogos. Como se muestra en el presente documento, abandonan después el ganglio linfático y se trasladan por la sangre al tumor
- 20 donde se infiltran dentro y alrededor del tumor y se correlacionan con la prueba de destrucción del tumor (necrosis, fibrosis y disminución del tumor). En los pacientes que muestran esta reacción, los aumentos en la infiltración de linfocitos involucran predominantemente poblaciones de células T CD3+, CD4+ y CD45RA+ y linfocitos B CD20+ alrededor de la periferia del tumor y poblaciones de linfocitos T CD3+, CD8+ y CD45RO+ y macrófagos dentro del tumor. Los cambios dentro del tumor son mayores que los de la periferia. Este mecanismo se muestra en general en la Figura 2.
- 25 En particular, los pacientes no tratados muestran tal reacción solo ocasionalmente (20 %) y aunque significativamente con menor frecuencia que los pacientes tratados con el régimen IRX-2 (44 % frente a 20 %) la presencia de la reacción en los controles representa un nuevo biomarcador para predecir un resultado favorable.
- 30 La imagen es una integrada de forma clínica, radiológica, patológica e inmunológica y proporciona una amplia prueba de una inmunización contra el antígeno tumoral autólogo. IRX-2 se muestra que activa todos los brazos del sistema inmunitario proporcionando una restauración total de la función inmunitaria y capacidad para atacar a las dianas inmunitarias.
- La invención se ha descrito de una manera ilustrativa, y se debe entender que la terminología que se ha utilizado tiene la intención de estar en la naturaleza de las palabras de descripción más que de limitación.
- 35 Obviamente, muchas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles a la vista de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otra manera que la concretamente descrita.

Referencias

- Dunn G, y col. Dendritic cells and HNSCC: A potential treatment option? (Review). *Oncology Reports* 13:3-10, 2005.
- 40 Egan JE, y col. IRX-2, a novel in vivo immunotherapeutic, induces maturation and activation of human dendritic cells in vitro. *J Immunother* 30:624-633, 2007.
- Galon J, y col. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960, 2006.
- 45 Hadden JW, y col. Immunotherapy with natural interleukins and/or thymosin alpha 1, potently augments T-lymphocyte responses of hydrocortisone-treated aged mice. *Int J Immunopharm* 17(10):821-828, 1995.
- Hadden JW, y col. Zinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells in vitro and augments splenocytes and thymocyte responses in vivo. *Int J. Immunopharm* 17(9):729-733, 1995.
- Kaech SM, y col. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Rev Immunol* 2:251, 2001.
- 50 Lanzavecchia A, y col. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326, 2005.
- Maass G, y col. Priming of tumor-specific T cells in the draining lymph Ganglios after immunization with interleukin-2-secreting tumor cells: Three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci* 92:5540, 1995.

- Mantovani A, et al. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23 (11), 2002.
- Meneses A, et al. Lymph Ganglio histology in head and neck cancer: impact of immunotherapy with IRX-2. *Int'l Immunopharm*. 3:1083-1091, 2003.
- 5 Pages F, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *NEJM* 353:2654-66, 2005.
- Sallusto F, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708, 1999.
- 10 Tomiyama H, et al. Phenotypic classification of human CD8⁺ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur J Immunol* 34:999, 2004.
- Verastegui E, et al. Immunological approach in the evaluation of regional lymph Ganglios of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Immunol* 102:37, 2002.
- Whiteside TL. Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer. *Curr Onc Reports* 3:46-55, 2001.
- 15 Wolf GT, et al. Lymphocyte subpopulations infiltration squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent and tumor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95:145, 1986.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un componente biológico natural derivado de células primarias que comprende interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ), para prolongar la vida de las células T *in vitro*.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en donde el componente biológico natural derivado de células primarias comprende 60-6.000 pg/ml de IL-1 β , 600-60.000 pg/ml de IL-2, 60-6.000 pg/ml de IL-6, 6.000-600.000 pg/ml de IL-8, 200-200.000 pg/ml de TNF- α y 200-200.000 pg/ml de IFN- γ .
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, en donde el componente biológico natural derivado de células primarias comprende 150-1.800 pg/ml de IL-1 β , 3.000-12.000 pg/ml de IL-2, 300-2.000 pg/ml de IL-6, 20.000-180.000 pg/ml de IL-8, 1.000-4.000 pg/ml de TNF- α y 1.000-4.000 pg/ml de IFN- γ .
4. Uso según la reivindicación 1, en donde el componente biológico natural derivado de células primarias es producido por leucocitos humanos purificados estimulados por un mitógeno y ciprofloxacina.
5. Uso según la reivindicación 4, en donde el mitógeno es fitohemaglutinina.
- 15 6. Uso según la reivindicación 1, en donde el componente biológico natural derivado de células primarias se puede obtener mediante leucocitos humanos purificados en presencia continua de antibiótico 4-aminoquinolona y en presencia continua o pulsada de un mitógeno.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células T son positivas para CD4 o CD8.

Figura 1

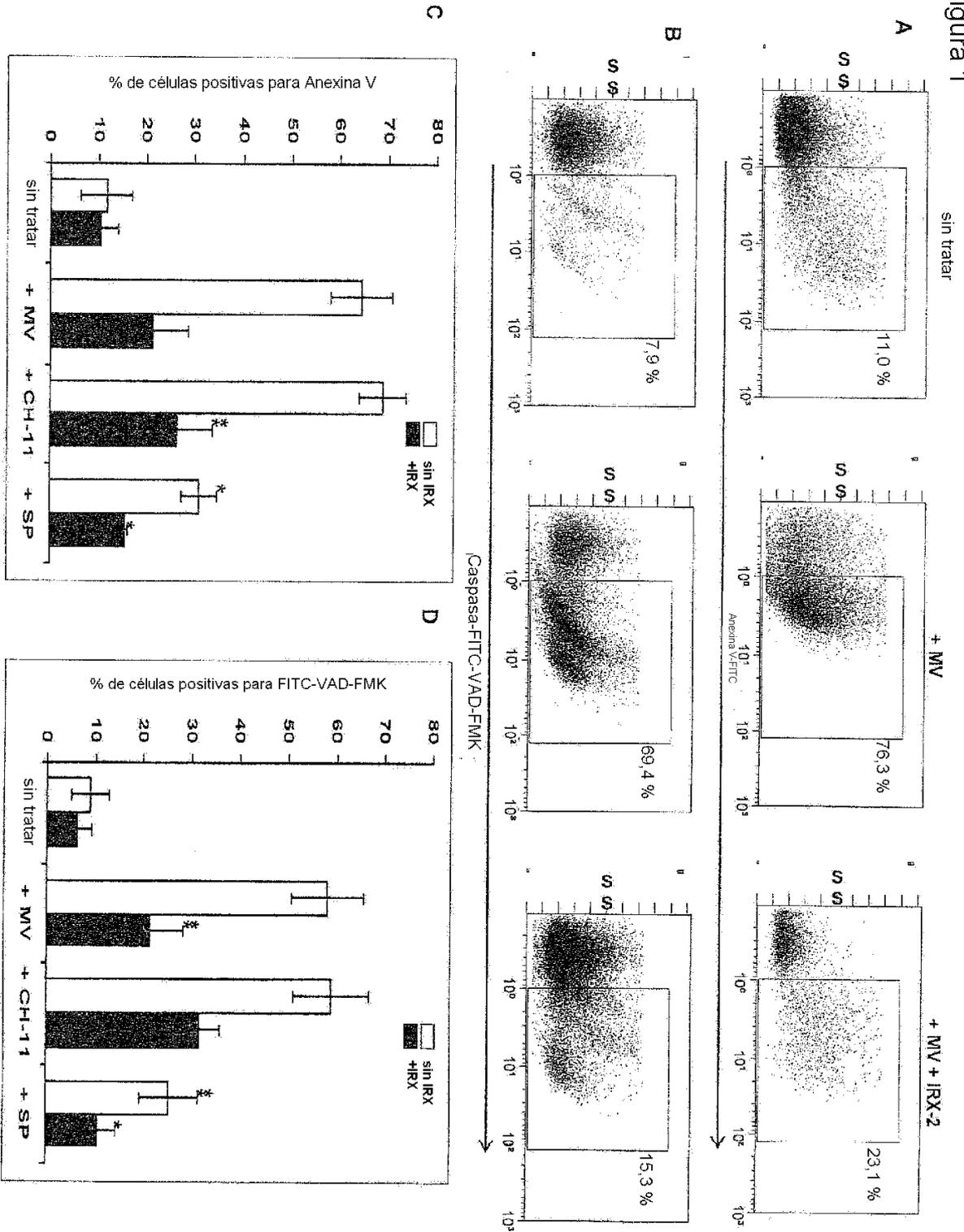


Figura 2

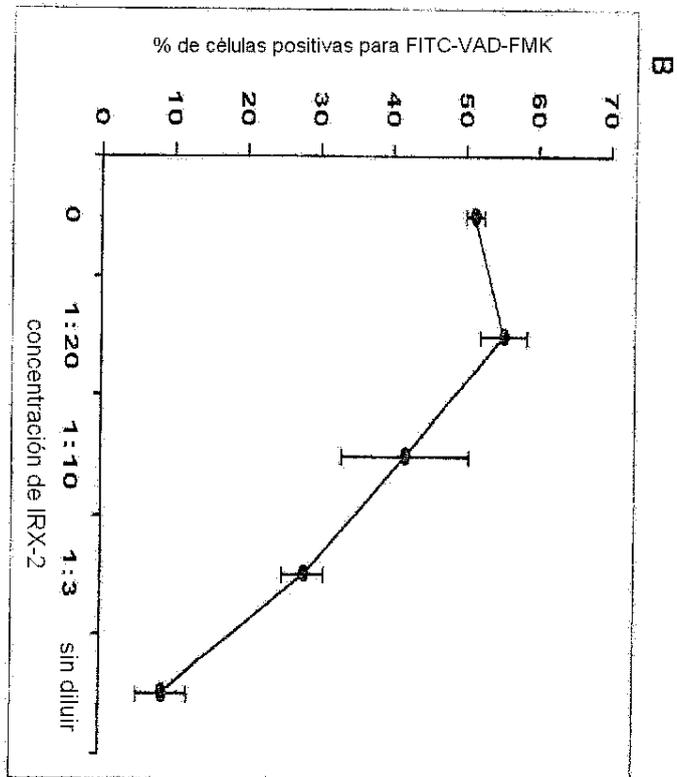
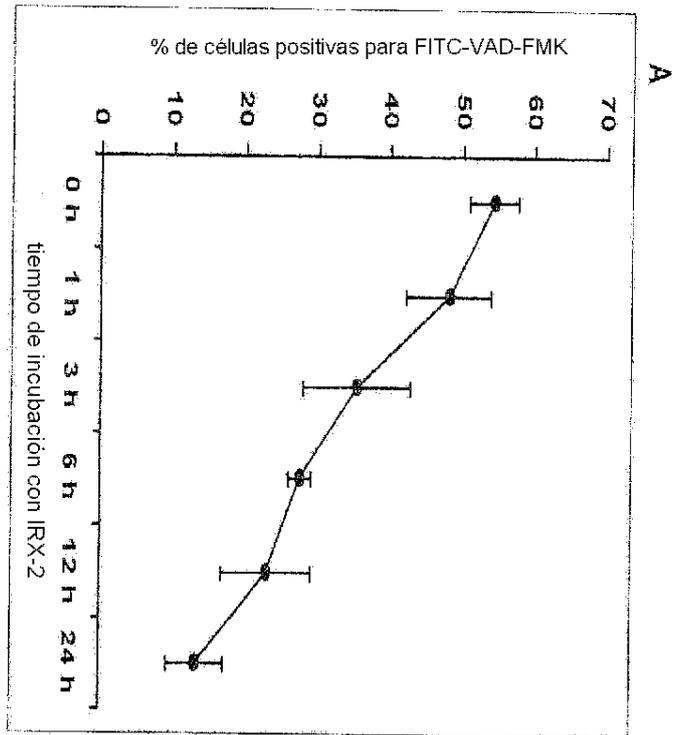


Figura 3

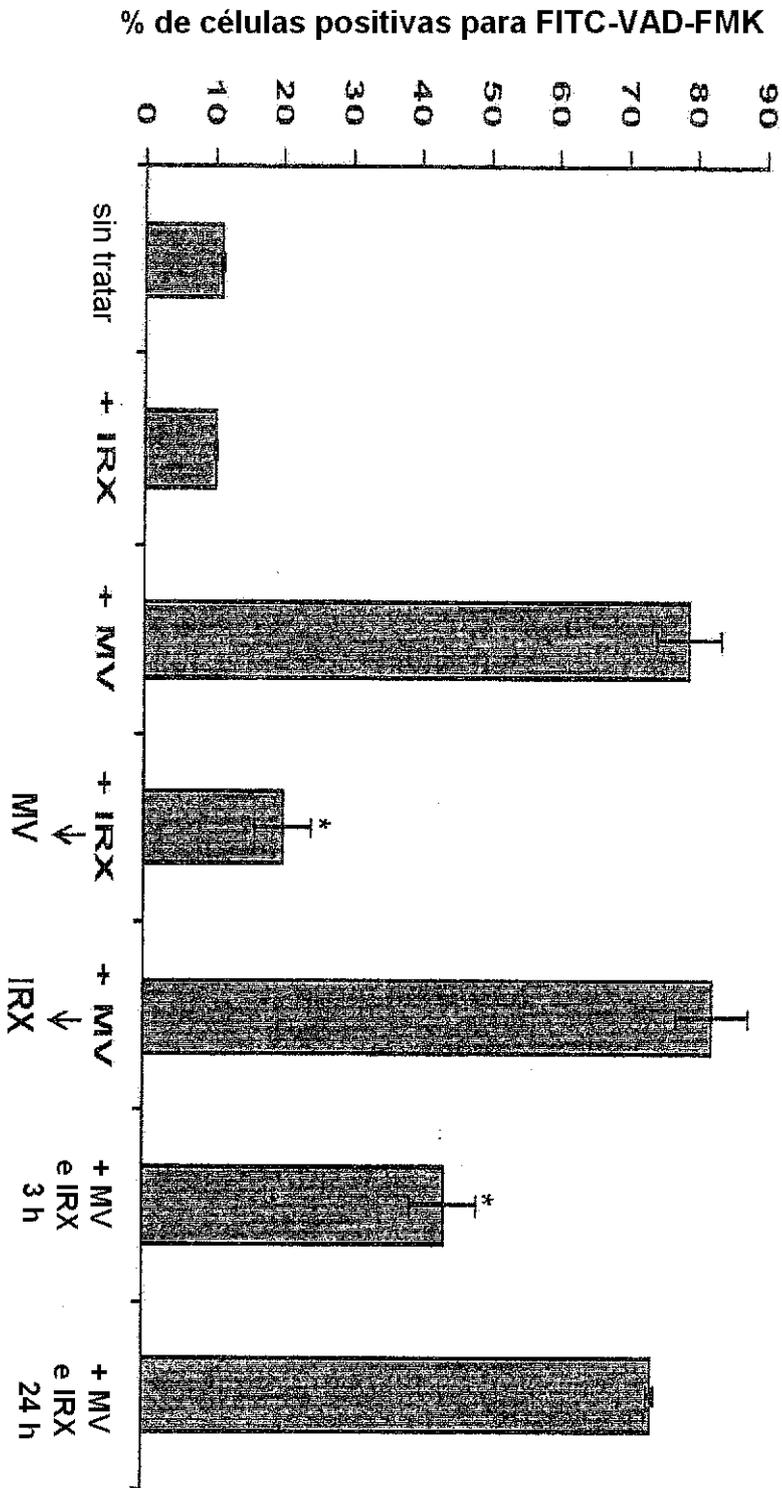
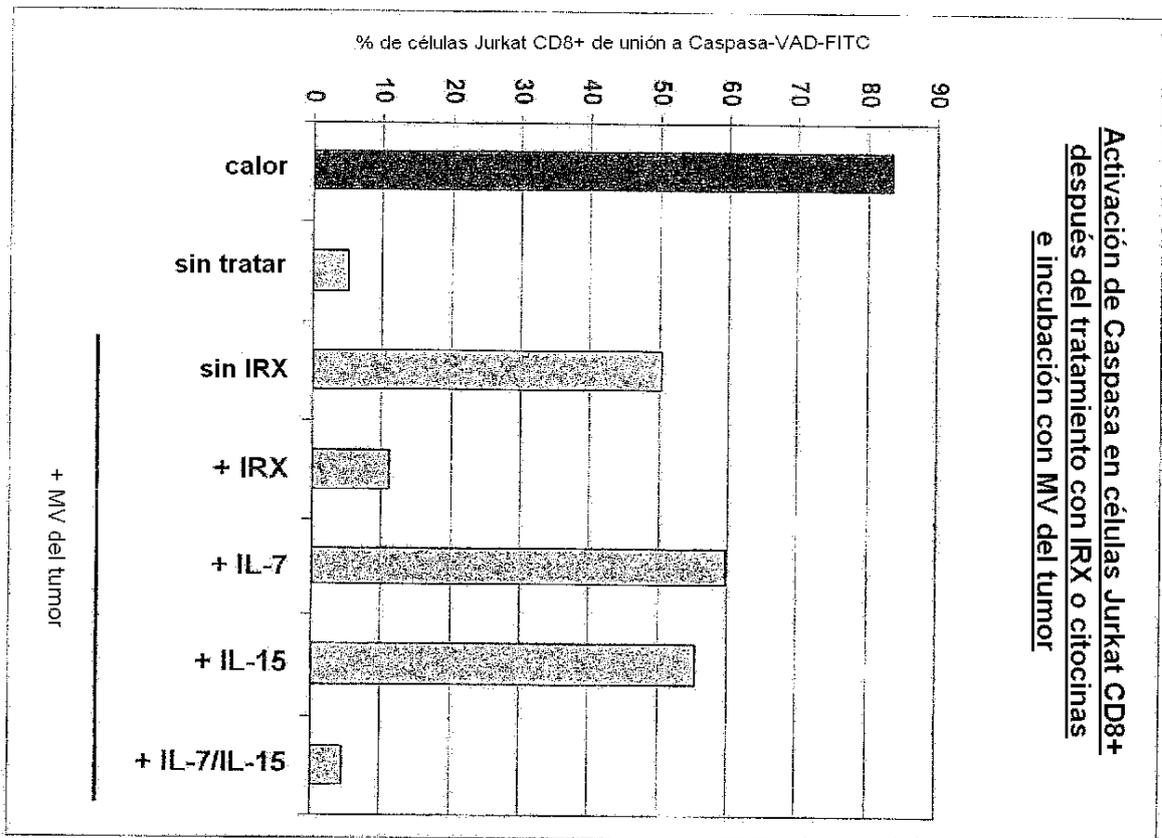


Figura 4



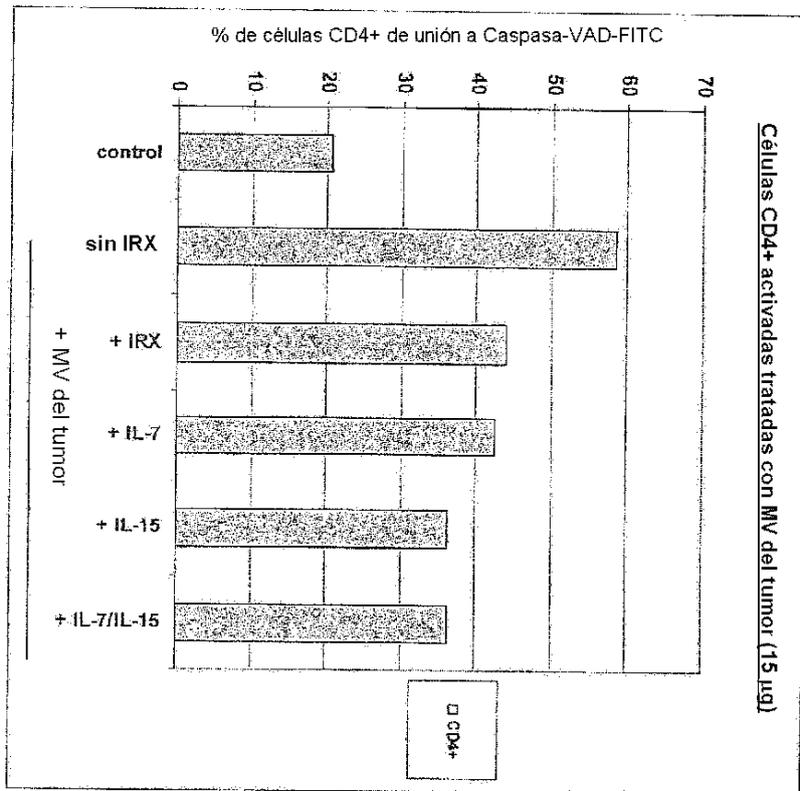


Figura 5A

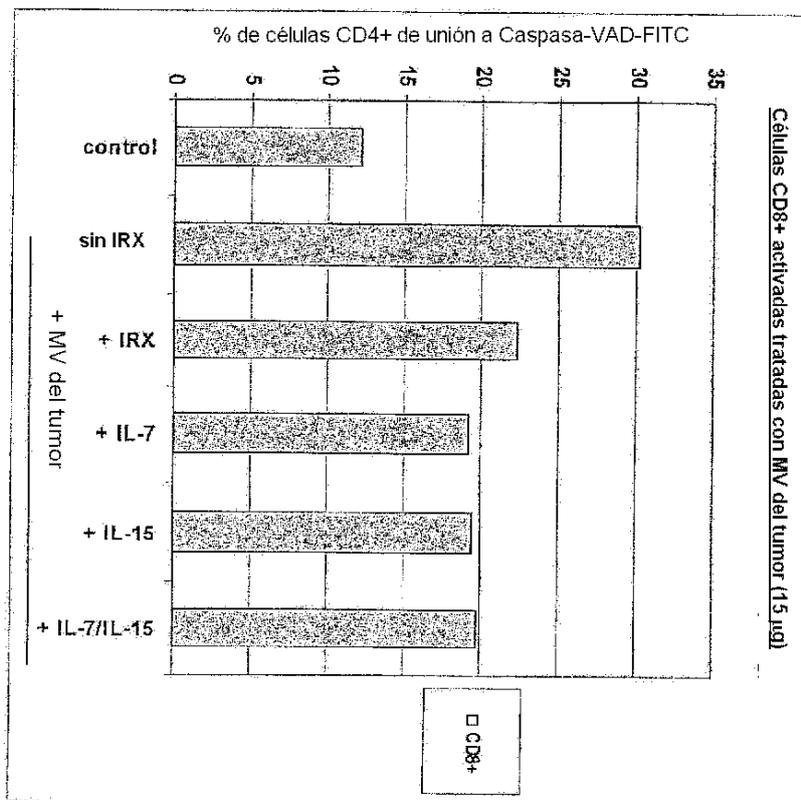


Figura 5B

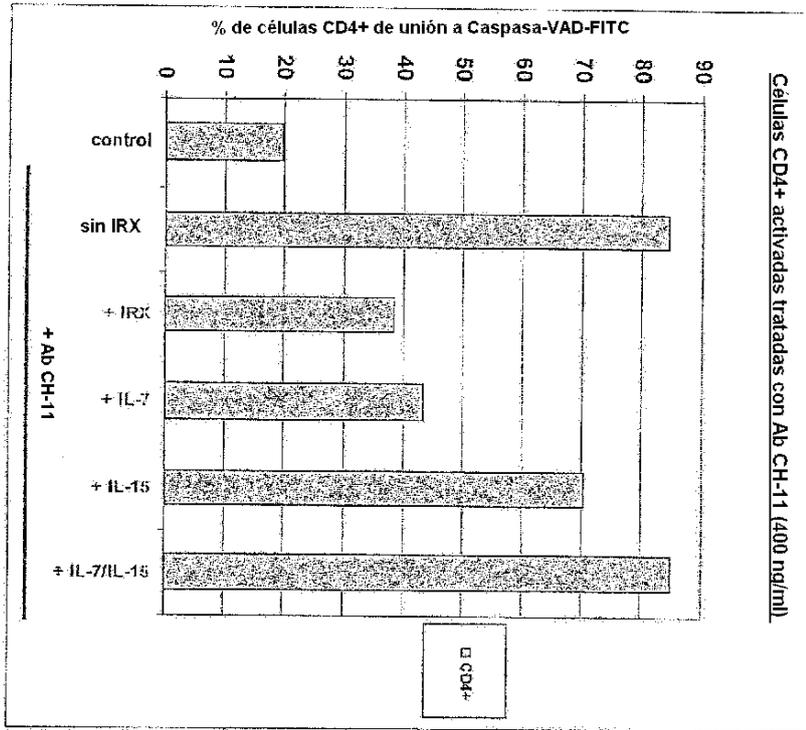


Figura 6A

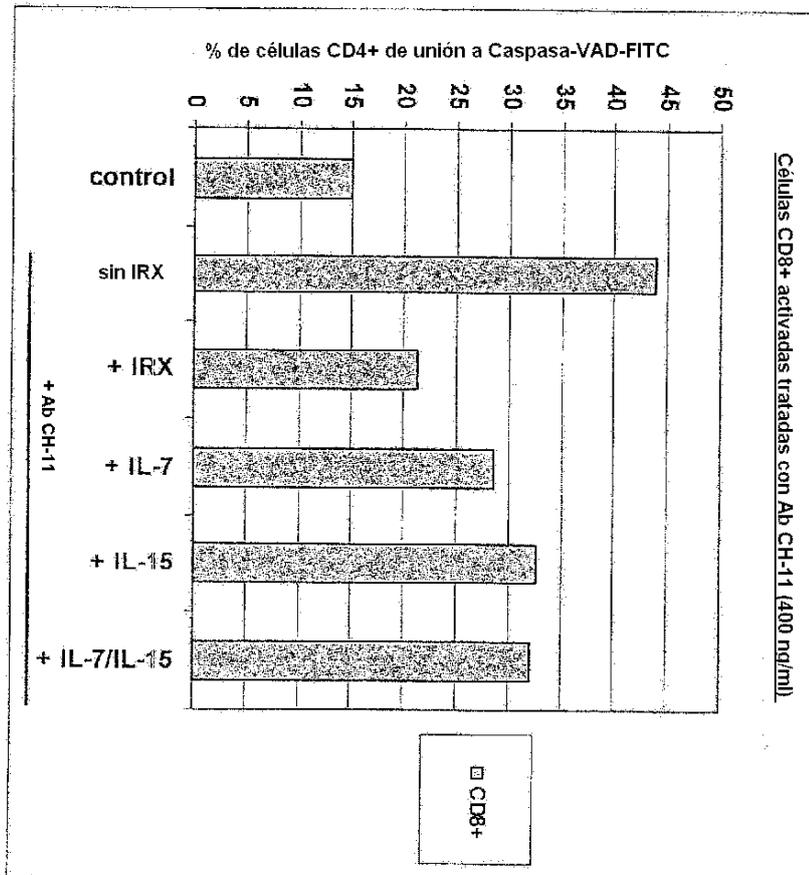


Figura 6B

Figura 7

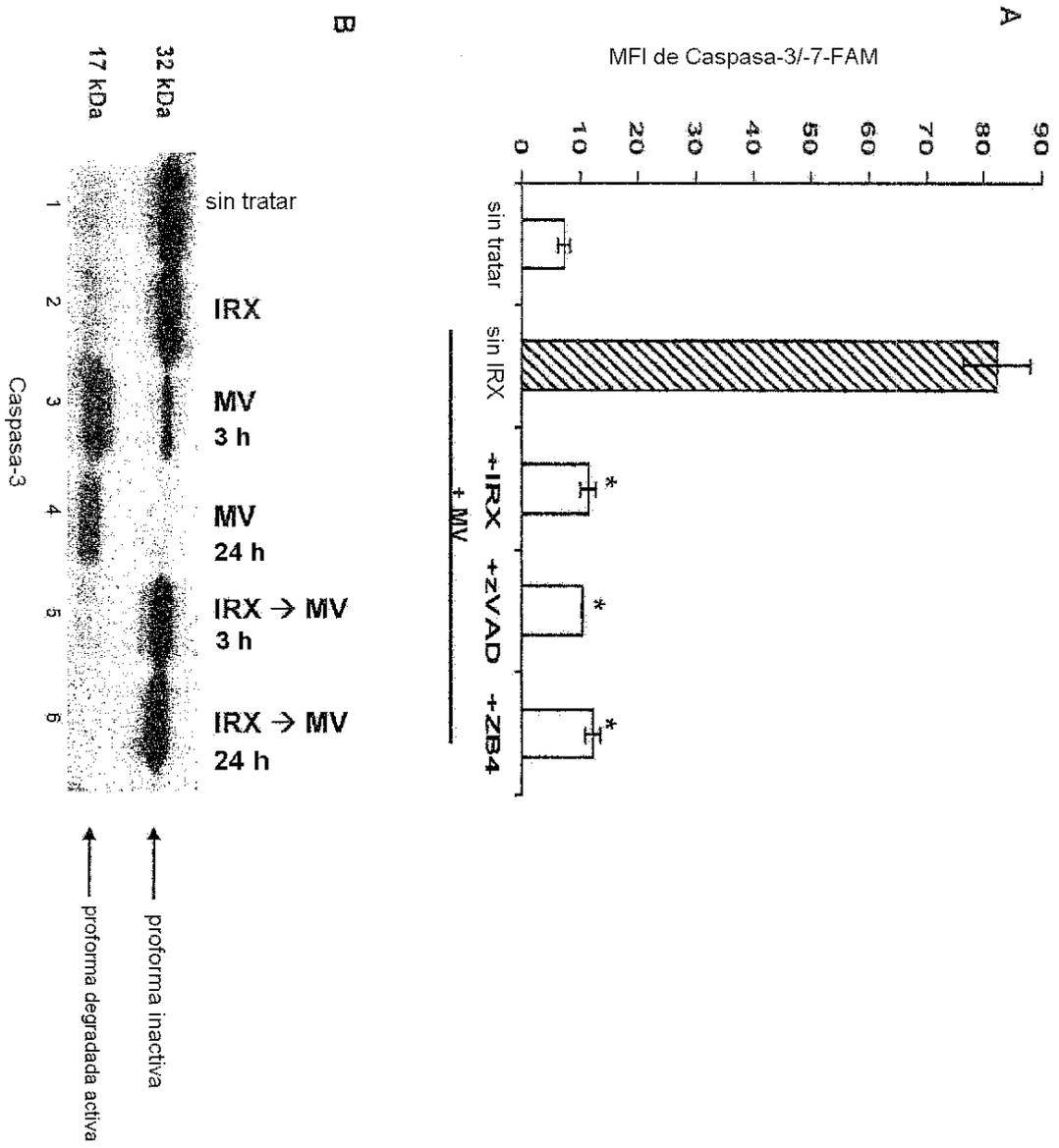


Figura 8

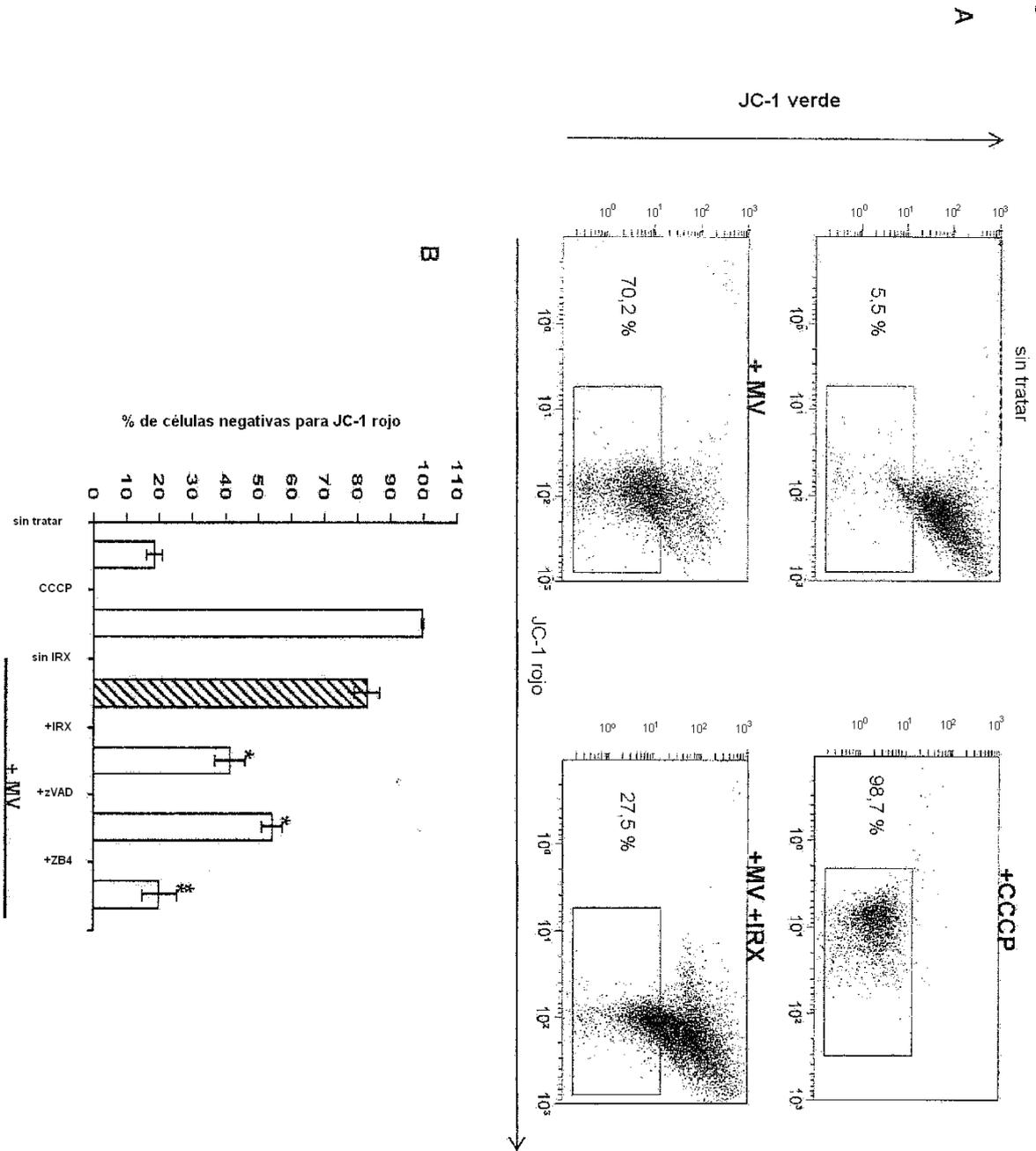
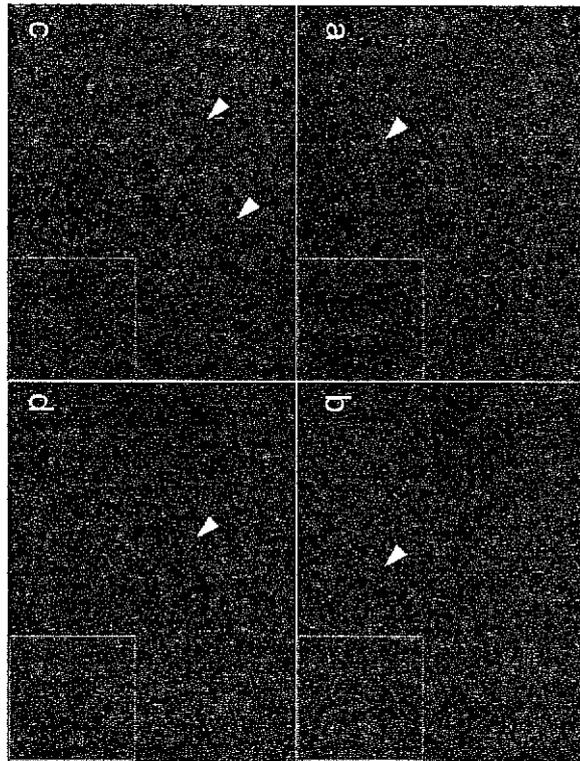


Figura 9

a



b

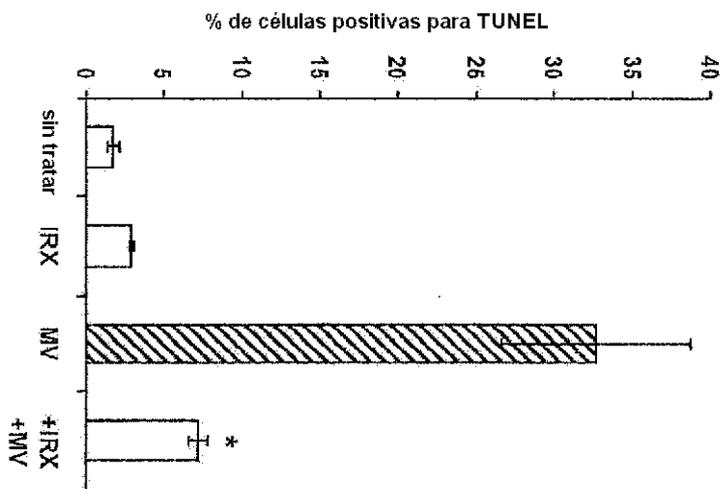


Figura 10

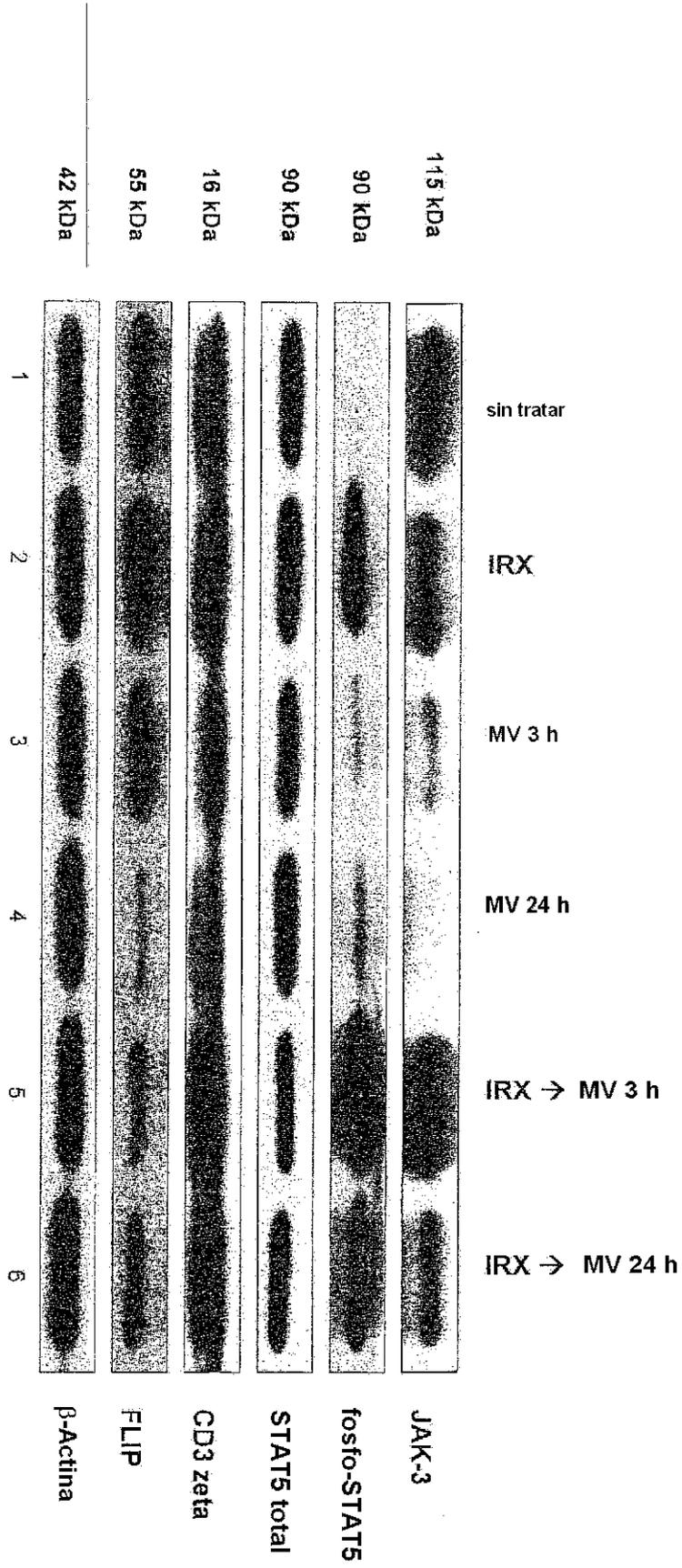


Figura 11A

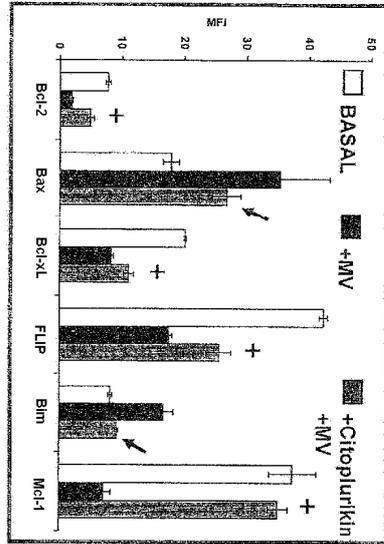


Figura 11B

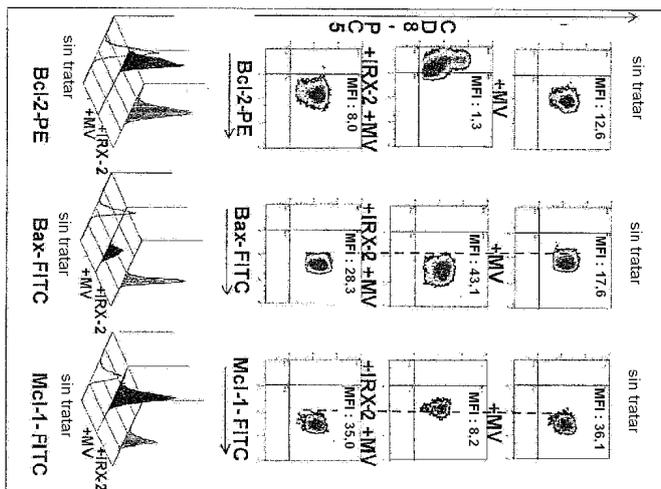


Figura 12

