

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 410**

51 Int. Cl.:

A61K 31/423 (2006.01)

A61K 31/5575 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/EP2015/001979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15801987 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3217975**

54 Título: **Uso de composiciones inmunomoduladoras eficaces para el tratamiento inmunoterápico de pacientes que padecen leucemias mielógenas**

30 Prioridad:

09.10.2014 DE 102014014993

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

04.11.2020

73 Titular/es:

**MODIBLAST PHARMA GMBH (100.0%)
Buchenstraße 3
82041 Oberhaching, DE**

72 Inventor/es:

SCHMETZER, HELGA

74 Agente/Representante:

MORENO NOGALES, Ángeles

ES 2 791 410 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

Uso de composiciones inmunomoduladoras eficaces para el tratamiento inmunoterápico de pacientes que padecen leucemias mielógenas

5

I. Campo técnico de la invención

Tratamiento inmunoterápico de pacientes con leucemia mielógena.

10

La presente invención se refiere a diversas composiciones de diferentes sustancias inmunomoduladoras para su uso en el tratamiento de pacientes con leucemias mielógenas. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar una composición/combinación adecuada de sustancias activas para su uso en el tratamiento de pacientes con leucemias mielógenas.

15

II. Antecedentes de la invención

20

CLÍNICOS: Las leucemias mielógenas tales como leucemia mielógena aguda (LMA), mielodisplasia (MDS) o leucemia mielógena crónica (LMC) son enfermedades hematopoyéticas clonales que escapan del sistema inmunitario con una proliferación celular patológicamente incrementada y una diferenciación alterada. Dependiendo del subtipo y, en particular, de las fases resistentes a tratamiento/recidivantes, estas enfermedades se asocian con un mal pronóstico; además, aproximadamente un 80 % de los pacientes sometidos a quimioterapia con éxito tienen una recidiva de su enfermedad dentro de los dos años siguientes. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de obtener enfoques de tratamiento inmunoterápico innovadores (**Reagan:** Cellular immunotherapy for refractory hematological malignancies. *J Transl Med.* 19,11,150 **2013**). Se considera que el alotrasplante de células madre (SCT) es el tratamiento antileucémico más eficaz, pero principalmente para pacientes más jóvenes. Además de la radio/quimioterapia intensiva, se considera que el efecto inmunitario del aloinjerto frente a leucemia (GvL) es el principal principio terapéutico. De acuerdo con el conocimiento actual, el efecto GvL está mediado principalmente por los linfocitos T del donante. Las complicaciones después del tratamiento, provocadas por la falta de regeneración/inmunocompetencia de los glóbulos sanguíneos, son infecciones, diátesis hemorrágica, anemias o recidivas provocadas por blastos recurrentes. Los pacientes después de SCT pueden experimentar reacciones autoinmunitarias agudas frente a las células receptoras provocadas por las células inmunorreactivas del donante de células madre (reacciones de "injerto contra huésped" (GvH)). Esto puede dar lugar a reacciones inflamatorias de graves a potencialmente mortales frente a, entre otros, sistemas vasculares, tales como en la enfermedad venooclusiva (VOD).

25

30

35

Además de los linfocitos T, las células dendríticas (DC) en particular desempeñan un papel decisivo como estimuladores de linfocitos T profesionales en la mediación de reacciones inmunitarias. En principio, los efectos terapéuticos (reducción de blastos) ya se han demostrado después de la vacunación de pacientes con LMA con DC pulsadas con antígeno (por ejemplo, WT1). Sin embargo, esta estrategia se reserva para pacientes con un tipo de HLA definido (principalmente HLA A2) y el conocimiento de un antígeno asociado a leucemia (por ejemplo, WT1).

40

45

50

Las mejores tasas de respuesta de las leucemias mielógenas (LMC, LMA, MDS) en comparación con las leucemias linfocíticas se han atribuido a la capacidad de los blastos de diferenciarse en DC derivadas de leucemia mielógena (DC_{leu}) y una mejora en la presentación de los antígenos asociados a leucemia (**Schmid:** Low-dose ARAC, donor cells, and GM-CSF for treatment of recurrent acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia;* 18(8):1430-3, **2004**). En base a este concepto, se ha usado GM-CSF por vía sistémica en el tratamiento de leucemia mielógena aguda recurrente después de alotrasplante de células madre en algunos pacientes para inducir la diferenciación de blastos mielógenos en células presentadoras de antígeno *in vivo*. (El estado de la técnica es que las citocinas tales como GM-CSF o Kit ligand se administran a pacientes solas o en combinación con otras citocinas activas de células madre (por ejemplo, G-CSF) o diversas moléculas pequeñas como 'citocinas de regeneración de células madre' con el objetivo de que el cuerpo movilice las células madre de la médula ósea en la sangre y, por tanto, regenere los glóbulos sanguíneos (por ejemplo, después de quimioterapia o daño orgánico) (**Besmer:** Composition of cKit ligand, GM-CSF and TNF α and Method of use, patente de EE. UU. n.º 6.001.803 **1999**).

55

60

65

GENERACIÓN DE DC/DC_{leu} EX VIVO: Un número de diferentes procedimientos son adecuados para la diferenciación *ex vivo* de DC en pacientes con LMA, sin embargo, la generación con éxito de DC no es posible con todos los procedimientos en cada caso individual. Se ha desarrollado una estrategia para obtener DC (en especial DC y DC_{leu} maduras) en cultivo celular con el mejor de los tres procedimientos sometidos a prueba previamente (CA, MCM, PICl, INTR) en cada caso individual (**Kremser/ Schmetzer:** Dendritic cells can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS. *J. Immunotherapy* 33:185-199, **2010**); **Dreyssig/Schmetzer:** Various 'Dendritic Cell Antigens' are already expressed on uncultured blasts in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Immunotherapy* 3(9), 1113-1124 (**2011**); **Schick/Schmetzer:** Anti-leukemic T-cell responses can be predicted by the composition of specific regulatory T-cell subpopulations. *J. Immunotherapy*, vol. 36, 4, 223-237; (**2013**). La **tabla 1a** (columnas a1-a4) muestra los procedimientos mencionados anteriormente: contienen numerosas sustancias activas en combinación: diferentes citocinas y 'factores de peligro y de maduración', que inducen la diferenciación de DC a partir de monocitos o blastos (inicialmente en cultivo celular sin suero de células mononucleares (MNC)). En cada procedimiento, las sustancias activas enumeradas en la **tabla 1a** se usaron en combinación. Se demostró el origen

leucémico de DC por la detección de anomalías cromosómicas asociadas a leucemia clonales en DC por hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) o por detección de citometría de flujo del patrón antigénico de blasto individual en la superficie celular de las DC.

5 La ventaja de producir DC directamente de blastos leucémicos es que no es necesario conocer los antígenos tumorales, ya que los blastos se convierten en DC_{leu}, presentando el espectro completo de antígenos leucémicos de cada paciente. Usando estos procedimientos, se podría demostrar que ninguno de los procedimientos de generación de DC produce un cultivo puro de DC_{leu}: se demuestra que aproximadamente un 45-55 % de las DC obtenidas son de origen leucémico, por otra parte, aproximadamente un 50-60 % de los blastos existentes son convertibles a DC_{leu}. En otras palabras, las DC de origen leucémico se generan de forma rutinaria, pero no todos los blastos se convierten en DC. La **figura 1a** muestra esquemáticamente, usando el ejemplo de LMA, que además de DC normales (de monocitos o células madre) también se generan DC_{leu}, es decir, que los blastos se 'rediferencian' a DC.

15 **Estimulación de linfocitos T con DC/DC_{leu} EX VIVO:** Por experimentos de estimulación *ex vivo* de linfocitos T con DC/DC_{leu} pueden surgir cada vez más linfocitos T antileucémicos (en comparación con linfocitos T no estimulados o estimulados por blastos) (**Grabrucker/Schmetzer:** The Quality and Quantity of Leukemia-Derived Dendritic Cells (DC) from Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome are a Predictive Factor for the Lytic Potential of DC-primed Leukemia-specific T-Cells *J Immunotherapy* 33,5,523-537, 2010). La **figura 1b** muestra un ejemplo de la configuración experimental para dichos experimentos de estimulación en cultivos de linfocitos mixtos (MLC): las células leucémicas mielógenas (por ejemplo, células LMA) son 'convertibles' a DC_{leu} (por procedimientos/kits de DC) (**b1**). Estas DC_{leu} 'presentan' todos los antígenos de LMA del paciente y de este modo estimulan los linfocitos T (**b2**), que a su vez pueden reconocer y destruir las células de LMA (**b3**). Además, se crea una memoria inmunológica (**b4**). Los experimentos de estimulación de linfocitos T en cultivos linfocíticos mixtos (MLC) han demostrado en el pasado que los linfocitos T estimulados por DC no solo proliferan mejor que los linfocitos T estimulados por blastos o no estimulados, sino que también tienen un efecto citotóxico de leucemia más frecuente y más eficaz (aunque no en cada caso). Tanto la *calidad* de las DC (por ejemplo, grado de madurez, proporciones de DC derivadas de leucemia, etc.) como la *composición de los linfocitos T resultantes* (por ejemplo, proporciones de linfocitos CD4 o CD45RO⁺ diferenciados, respectivamente, proporciones CD4:CD8, linfocitos T reguladores, que expresan integrina β, etc.) así como *factores solubles en el sobrenadante del cultivo celular* (por ejemplo: IFN_γ, IL-6, CXCL8, CCL2) es predictivo para la función de los linfocitos T estimulados por DC, así como para la respuesta de pacientes a inmunoterapia (tratamiento SCT o DLI). Los análisis de clonalidad de linfocitos T han demostrado que el repertorio de linfocitos T se restringe después de 'DC/DC_{leu}' en comparación con la estimulación blástica: algunos clones CD4/CD8 se propagaron de forma preferentemente clonal, lo que sugiere que DC/DC_{leu} "**dirige, enfoca y potencia**" las respuestas inmunitarias. Fue interesante que por análisis de longitud de CDR3 ("*spectratyping*") en combinación con análisis de secuencias, se pudo detectar un *clon de linfocito T idéntico* (secuencia de receptor de linfocitos T Vβ idéntica) *ex vivo* así como *in vivo* a partir de linfocitos T de un paciente después de estimulación de DC después de SCT, lo que sugiere que los cultivos de DC *in vivo* no solo simulan procesos sino que también permiten el análisis funcional de estos clones (por ejemplo, por una prueba de lisis de blasto funcional).

40 Puesto que la función antileucémica de los linfocitos T en el cuerpo de pacientes con LMA es fundamental para mantener una remisión prolongada, la optimización de la función de linfocitos T antileucémica y la generación de linfocitos T de memoria (que pueden proporcionar células efectoras específicas en cualquier momento) sería de gran beneficio clínico en la lucha contra las células leucémicas (residuales) en el cuerpo de los pacientes.

45 No está claro si después de la estimulación de DC se produce una expansión de (muchas o menos) poblaciones de linfocitos T antileucémicos específicas (*in vivo*, *in vitro*), si se establece una memoria inmunológica, si la función de linfocitos T específicos está influenciada por factores solubles y, sobre todo, si la función antileucémica *in vivo* es suficiente para lograr o mantener remisiones. Por lo tanto, las inmunoterapias se deben acompañar de *seguimiento* dirigido (identificación, cuantificación) de poblaciones de linfocitos T pertinentes *ex vivo* o *in vivo* usando procedimientos adecuados (citometría de flujo, biología molecular).

Grabrucker et al., J Immunotherapy 2010, 33,5,523-537, describen la diferenciación de DC usando combinaciones de fármacos.

55 III. Sumario de la invención

El problema de la presente invención es modificar los blastos de pacientes con leucemias mielógenas usando procedimientos inmunomoduladores *in vivo* de tal forma que se conviertan en una 'vacuna' que pueda activar específicamente células inmunorreactivas (del paciente o del donante de células madre) frente a blastos. Este problema se resuelve por los rasgos característicos de las **reivindicaciones independientes**. Otros modos de realización de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

La presente descripción permite el uso alternativo de diferentes combinaciones de sustancias activas, compuestas de diferentes sustancias inmunomoduladoras, para el tratamiento de pacientes con leucemia mielógena, en el sentido de medicina personalizada. El mejor kit es el que logra la mejor 'conversión' de blastos en células dendríticas derivadas de

leucemia (DC_{leu}) como células presentadoras de antígeno sin inducir proliferación de blastos y al mismo tiempo la mejor activación de linfocitos T antileucémicos.

IV. Descripción de figuras y tablas

Figura 1: linfocitos T antileucémicos mediados por DC/DC 'derivadas de leucemia' (DC_{leu})

- a) En el organismo sano, las DC surgen de células madre o monocitos; DC_{leu} surgen de blastos de LMA 'rediferenciados'
- b) linfocitos T antileucémicos, estimulados por DC/DC_{leu} y activados (*ex vivo/in vivo*)

Figura 2: se pueden generar DC/DC_{leu} a partir de muestras de WB que contienen blastos de LMA usando procedimientos de diferenciación de DC estándar (por ejemplo, PICI), así como con 'kits' (específicos de paciente) **a)** generación de DC/DC_{leu} a partir de WB usando procedimientos estándar (por ejemplo, Pici, izquierda) y con kits (derecha) **b)** cantidades comparables promedio de subtipos de DC con todos los kits.

Figura 3: selección del mejor procedimiento de kit de WB para generar subtipos de DC/DC_{leu} en pacientes con LMA individuales: se muestran las frecuencias en porcentaje de la generación de DC/DC_{leu} exitosa con kits individuales **a)** CLASIFICACIÓN: 'mejor o segundo mejor procedimiento de DC' en comparación con al menos otros 3 kits, **b)** CLASIFICACIÓN: procedimiento de DC con 'calidad excelente o alta' (criterios, véase **3c**). **c)** criterios de generación de DC exitosa **d)** selección de los 6 mejores kits de acuerdo con los criterios de CLASIFICACIÓN.

Figura 4: actividad lítica de blastos antileucémicos de linfocitos T estimulados con muestras de WB de LMA TRATADAS CON KIT (HS-D,F,I,M,K,A) en comparación con muestras no tratadas. **a)** Selección de acuerdo con el **mejor valor de lisis** específico de paciente, **b)** selección de acuerdo con la **mayor diferencia** específica de paciente para el valor de lisis de control de WB, **c)** selección de muestras de WB **tratadas con HS-D,I,K,M** en comparación con el control de WB.

Figura 5: el tratamiento de ratas BNML con kits da lugar a la reducción de blastos y cambios en la composición celular en sangre y bazo en comparación con el control con placebo. **a)** Diseño experimental de tratamiento de ratas, **b)** reducción de blastos en sangre (izquierda) y bazo (derecha), **c)** incremento de CD62L+ (Tmem): CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha) en sangre y bazo, **d)** reducción de CD4+CD25+FoxP3+Treg en bazo.

Tabla 1: generación de DC/DC_{leu} a partir de células mononucleares (MNC) o de sangre completa (WB) que contiene blastos de LMA usando diferentes procedimientos de diferenciación de DC o kits específicos.

a) Procedimientos de diferenciación de DC o kits para generar DC/DC_{leu} a partir de MNC (a1-a4) o WB (a1-a5) que contienen blastos, **b)** ventajas y valor de la generación de DC a partir de muestras de sangre completa.

Tabla 2: sustancias activas en los kits para la inmunomodulación de blastos de LMA.

Tabla 3: composición de los kits sometidos a prueba.

V. Descripción detallada de la invención

La invención descrita a continuación usando el ejemplo de LMA es igualmente aplicable en pacientes con otras leucemias mielógenas. De acuerdo con la presente invención, se desarrolló, se sometió a prueba y se optimizó *in vitro* una combinación minimizada de "inmunomoduladores" clínicamente aprobados. Para este propósito, se desarrolló inicialmente un modelo experimental con "muestras de sangre completa (WB) heparinizada" (tomadas en tubos de heparina con adición de heparina estandarizada): La WB contiene todos los componentes celulares y solubles que influyen en la generación de DC. Por tanto, también se puede establecer *in vitro* si la diferenciación de DC es posible *in vivo*, es decir, si se puede superar la resistencia de las células a la diferenciación y se puede generar (restablecer) una inmunidad humoral y celular funcional en el paciente. Las muestras de WB muy ricas en células se diluyeron con aprox. un 30–50 % de medio sin suero (*X-vivo*) para garantizar una mejor comparabilidad de los casos individuales. La **tabla 1b** muestra las ventajas de generar DC/DC_{leu} a partir de WB: todos los tipos celulares y factores solubles presentes en el cuerpo se pueden detectar en su "entorno natural", las pruebas de funcionalidad se pueden someter a prueba cerca de la realidad clínica y finalmente se pueden sacar conclusiones sobre interrelaciones biológicas y perfiles de reacción más fácilmente que con los resultados obtenidos con células mononucleares, la fracción de leucocitos usada normalmente para investigaciones.

Se generaron proporciones similares de DC (subtipos, determinados por citometría de flujo) a partir de WB así como de MNC de pacientes con leucemia usando los procedimientos estándar (CA, PICI, MCM o INTR, **tabla 1a**), lo que quiere decir que un modelo de WB es en general adecuado para inducir la modulación de blastos *ex vivo*, para comprobar la convertibilidad general de los blastos a DC_{leu}, y también es un buen modelo fisiológico para someter a prueba la modulación inmunitaria exitosa. En una etapa siguiente, se demostró que la generación de DC (subtipos) a partir de WB

es posible con los procedimientos estándar en un grado similar al de los kits minimizados que consisten en 1-3 inmunomoduladores clínicamente aprobados de WB, mientras que los controles de cultivo sin la adición de kits no producen DC a partir de blastos (la composición de los kits se analiza a continuación).

- 5 La **figura 2a** muestra los resultados de la generación de DC a partir de WB usando procedimientos estándar 'Pici' (izquierda) en comparación con WB usando kits (derecha): muchos de los 11 kits sometidos a prueba proporcionaron cantidades similares de subtipos de DC a partir de WB de pacientes con leucemia como con procedimientos estándar. En promedio (véanse los gráficos de barras en la **figura 2a y b**), proporciones similares de DC (subtipos) surgen a partir de WB (véase la tabla de colores): % DC ('Q'), DC con capacidad de migración maduras ('Z'), blastos convertidos a DC_{leu}, DC_{leu} en la fracción celular completa ('X') en relación con todas las DC ('Y'): con al menos un procedimiento fue posible una buena generación de DC en cada paciente. Los controles de cultivo sin la adición de kits normalmente no son exitosos; además, también es evidente que no todos los kits son igualmente adecuados para generar DC (subtipos) en pacientes individuales (véase la tabla de colores, **figura 2a**).
- 10
- 15 Por tanto, un procedimiento de WB es un buen modelo fisiológico para la generación de DC/DC_{leu}, con lo que se pueden identificar diferencias específicas de paciente: algunos kits son más adecuados que otros para generar DC (subtipos).

Dentro del alcance de la presente invención, se examinaron (comparativamente) varios kits. Todas las sustancias están aprobadas para su uso en humanos y se usan regularmente en pacientes para indicaciones distintas a las enumeradas aquí. Se examinaron varias sustancias individuales así como sus combinaciones con respecto a su capacidad para generar DC (subtipos), para estimular la proliferación de células leucémicas, y finalmente los productos de DC obtenidos se sometieron a prueba para determinar su capacidad para activar linfocitos T antileucémicos. La **tabla 2** muestra en primer lugar las **sustancias activas individuales** usadas, su efecto biológico/clínico y las aplicaciones clínicas existentes: en resumen, se debe mencionar aquí que GM-CSF, IFN α , TNF α y PICIBANIL se administran como moduladores inmunitarios y estimulantes inmunitarios, para la regeneración hematopoyética y por vía sistémica para el tratamiento de diversas enfermedades (PICIBANIL también se aplica por vía local en tumores). PGE₂ se usa en altas concentraciones para la inducción del parto y se administra por vía local en la vagina o por vía sistémica, respectivamente. PGE₁ se administra por vía sistémica por sus propiedades vasodilatadoras, por ejemplo, para tratar la enfermedad VOD o isquemia de las extremidades. TNF α se puede administrar por vía sistémica, pero también en altas concentraciones por vía local en tumores de tejidos blandos. Hasta el momento, CALCIMICINA aún no se ha usado por vía sistémica en humanos (aunque la experiencia de estudios con animales está disponible), pero se usa *ex vivo* para el tratamiento de ovocitos antes de la fertilización *in vitro*.

20

25

30

GENERACIÓN DE DC/DC_{leu} EX VIVO - SELECCIÓN DE LOS MEJORES KITS (CLASIFICACIÓN): Se ha demostrado que no todos los kits son igualmente adecuados para la generación de DC (subtipo) en pacientes individuales (véase la **figura 2a**). Por lo tanto, se estableció una "**lista de clasificación**" para kits para la generación de DC, con lo que el porcentaje de DC, DC_{leu} y DC con capacidad de migración (DCmig) maduras se incluyeron en la evaluación: la **figura 3a** muestra las frecuencias cuando los kits individuales (composición, véase la **tabla 3**) fueron el MEJOR O SEGUNDO MEJOR procedimiento de generación de DC en comparación con al menos otros 3 kits: HS-F, D, M, I, A, K se clasificaron entre los mejores o segundos mejores procedimientos, mientras que los kits restantes se puntuaron peor (**figura 3a y d**). De forma alternativa, también se muestran las frecuencias con las que la generación de DC con kits se calificó como 'EXCELENTE O ALTA' (solo orientada a las calidades del subtipo de DC) (**figura 3b**, los criterios para la clasificación se enumeran en la **figura 3c**). De nuevo, los kits HS-K, F, M, I, D, A se clasificaron en las posiciones con una generación de DC 'EXCELENTE O ALTA' si las proporciones de DCmig maduras se incluyeron en la clasificación (**figura 3d**, columna central) o se excluyeron (columna derecha). En general, estos resultados mostraron que los primeros 6 kits mencionados anteriormente pudieron producir buenas cantidades de DC/DC_{leu} en cualquier caso, mientras que los restantes kits o sustancias individuales o controles produjeron solo raramente, si acaso, cantidades suficientes de DC.

35

40

45

INDUCCIÓN DE PROLIFERACIÓN DE BLASTOS EX VIVO: Se debe excluir que los kits administrados a pacientes dan lugar a la **proliferación** de blastos (residuales) (*in vivo*). Por lo tanto, se realizaron pruebas de proliferación de blastos en el modelo de WB en 51 muestras: la expresión del marcador de proliferación CD71 (receptor de transferrina) en los blastos se examinó por citometría de flujo antes (proporciones de doble CD71+ y marcador de blastos+ en los blastos: 'CD71+Bla+/Bla+') y después de la influencia de los kits (aquí no se incluyeron las proporciones de DC_{leu} (que también expresan marcadores de blastos): CD71+Bla+DC-/Bla+). Solo los casos con una expresión de más de un 10 % de los marcadores de proliferación antes del cultivo se incluyeron en los análisis. CD71 se expresa de forma rutinaria en los blastos (no modulados), pero no en todos los casos de LMA. Con unas pocas excepciones (aproximadamente un 14 % de los casos) no se encontró un incremento en blastos en proliferación CD71+ después de la influencia del kit. Por tanto, se puede esperar, con pocas excepciones, que la proliferación de blastos no se estimula bajo la influencia de los kits. Sin embargo, la proliferación de blastos bajo la influencia de kits específicos seleccionados (en especial con respecto a la aplicación *in vivo*) se debe investigar sobre una base específica de paciente. En el futuro, se deben usar otros procedimientos de medición de la proliferación (ensayo CFDA, medición de citometría de flujo de marcadores de proliferación intracelular) para obtener un estado de proliferación en tantos pacientes como sea posible antes del cultivo de WB).

50

55

60

65

Por tanto, los kits usados solo estimulan la proliferación de blastos en el sistema de WB en algunos casos (o solo cuando se usan kits individuales en pacientes individuales). Por lo tanto, se recomienda someter a prueba la influencia de *diferentes* kits en blastos en muestras de WB en todos los pacientes con leucemia individuales y seleccionar *el* kit para aplicaciones *in vivo* que no induce proliferación de blastos y produce simultáneamente muchas porciones de DC_{leu}.

5

PREPARACIÓN DE linfocitos T ANTILEUCÉMICAMENTE EFICACES después de la ESTIMULACIÓN DEL KIT: finalmente, *la función antileucémica de linfocitos T* en el cuerpo es fundamental para el mantenimiento de una remisión duradera. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, la optimización de la función de linfocitos T antileucémicos y la generación/reactivación de linfocitos T de memoria sería de gran beneficio clínico para combatir las células leucémicas (residuales) en el cuerpo de pacientes. De acuerdo con la invención, por lo tanto, se examinó si el tratamiento con kit de blastos de WB da lugar a una actividad antileucémica mejor y más eficaz de linfocitos T. La **figura 1b** muestra esquemáticamente cómo se realiza la detección *ex vivo* de la función de linfocitos T: en primer lugar, los blastos leucémicos se convierten en DC_{leu} con un kit (**b1**). A continuación, los linfocitos T aislados del paciente se añaden a los blastos que contienen DC (= modulados por el kit) y como control a los blastos sin tratamiento con el kit en cultivos de WB y se cultivan en cultivos mixtos de linfocitos durante 7-10 días (**b2**). Finalmente, la función antileucémica de las células así obtenidas se somete a prueba por la adición de células leucémicas (marcadas) en una prueba de lisis (por citometría de flujo): después de la incubación de estas células diana con las células efectoras T, la disminución y, posiblemente, el incremento en blastos se puede cuantificar (**b3**). El objetivo fue determinar si el tratamiento con kit de blastos de WB da lugar a una actividad antileucémica mejor y más eficaz de linfocitos T. La **figura 4** muestra los resultados obtenidos con "blastos de WB modulados" TRATADOS CON KIT en comparación con los controles de WB: debido a los mejores kits determinados por los criterios de clasificación, así como al hecho de que los linfocitos T para llevar a cabo experimentos son limitados, se realizaron pruebas funcionales con los kits HS-A,F,D,I,K,M. Se puede observar que no siempre se proporcionan linfocitos T eficaces antileucémicos por el tratamiento con kit de WB (también se pueden generar linfocitos T que no lisan los blastos), que la eficacia lítica de los linfocitos T resultantes es variable o que los mejores kits se pueden seleccionar para pacientes individuales, respectivamente (**figura 4a**). Solo los linfocitos T de WB ("estimulados por blastos") también pueden producir linfocitos T citotóxicos y antileucémicamente estimulados (*ex vivo*), aunque con menos frecuencia y de manera menos eficaz. La **figura 4b** muestra que se pueden seleccionar kits de pacientes individuales que, en comparación con el control de WB, mejoran más la función antileucémica de los linfocitos T. En casi todos los casos se pudo encontrar (al menos) un kit que dio lugar a una mejora de la función de linfocitos T antileucémicos: si el mejor valor de LISIS obtenido se seleccionó de acuerdo con la influencia del kit y se comparó con el control de WB sin la adición de kits, excepto en unos pocos casos, siempre se pudo encontrar un kit que mostrara una función antileucémica y *al mismo tiempo* una mejora en comparación con el control (sin adición de kits). La **figura 4c** muestra resultados con kits tratados HS-D, I, K, M (obtenidos en paralelo). Estos 4 kits se seleccionaron preferentemente y los kits HS-A y F se pospusieron, ya que la aplicación sistémica de kits que contienen TNF α o CALCIMICINA para pacientes actualmente no está aprobada. Se puede observar que las muestras de WB tratadas con kit muestran diferencias en la provisión de linfocitos T antileucémicos eficaces. Por lo tanto, se realizó una **clasificación de** la función antileucémica. Esto demostró que los kits HS-I, K, F, M, seguidos de HS-A, D fueron los más antileucémicamente eficaces *ex vivo* en comparación con los controles de sangre completa (datos no mostrados). Además de los resultados enumerados, también se comparó la eficacia antileucémica de WB en comparación con muestras de WB estimuladas con kit o incluso linfocitos T no estimulados. Estos estudios también mostraron que no todos los kits producen linfocitos T con (mejor) actividad antileucémica de la misma forma y de manera variable específica de paciente, de modo que en general son necesarios análisis funcionales detallados en comparación con los diferentes controles para encontrar el mejor kit específico de paciente que da como resultado la mejor función de linfocitos T antileucémicos.

45

Simultáneamente, los **perfiles de linfocitos T (funcionales)** y los **perfiles de citocinas** antes/después de la estimulación de los linfocitos T se comparan con muestras de sangre completa (con o sin tratamiento con kit) para determinar si se generan linfocitos T reguladores o antileucémicamente 'eficaces', así como células de memoria o perfiles inhibidores/activadores de citocinas, respectivamente. Con este fin, se realizan análisis de citometría de flujo para determinar los perfiles celulares, así como análisis para determinar los perfiles de citocinas, así como análisis funcionales.

50

Por tanto, los resultados presentados indican que la modulación inmunitaria de los blastos con las mezclas de sustancias sometidas a prueba en general es posible y tiene éxito de forma rutinaria, aunque se producen diferencias específicas de paciente. Estos kits pueden modular las muestras de WB que contienen blastos de LMA de tal forma que resulte una buena eficacia antileucémica de los linfocitos T estimulados, aunque esto no es igualmente exitoso para cada kit o muestra de paciente individual. Sin embargo, finalmente, la mejor combinación de kits se puede determinar en WB y a continuación someterse a prueba funcionalmente para seleccionar el mejor kit individual para la aplicación *in vivo*.

60

SELECCIÓN DE KIT: La **tabla 3** muestra los kits desarrollados de acuerdo con la invención, así como los hallazgos más importantes y las consideraciones clínicas antes de su uso en pacientes (para más detalles, véase a continuación): el mejor kit para cada paciente individual de los primeros 4 kits seleccionados preferentemente (HS-D, I, K, M) se debe determinar y finalmente administrar al paciente. HS-C, F y A se presentan inicialmente como kits subordinados. El motivo de esto es que CALCIMICINA no se ha usado hasta ahora, y el TNF α ya no se permite para su uso por vía sistémica, y el TNF α administrado en una combinación triple se debe retrasar. La combinación de HS-E así

65

5 como las sustancias individuales HS-G, H y L también se sometieron a prueba, en principio son posibles para el uso en pacientes, pero no son tan eficaces en la provisión de DC (subtipos) en comparación con las otras combinaciones; HS-E, G, H y L, por lo tanto, también se deben enumerar como subordinadas. Por lo tanto, la selección de kit preferente presentada aquí de acuerdo con la invención es: HS-D, HS-I, HS-K, HS-M. Conceptualmente, la selección de estos kits se basa en el hecho de que deben ejercer diversos efectos inmunomoduladores/estimuladores (**tabla 1, 2**): todos los kits de combinación contienen GM-CSF, una citocina que induce la proliferación y diferenciación de células mielógenas y tiene un efecto positivo sobre la provisión y regeneración de células madre, inmunocitos, granulocitos, así como DC en general sin promover la proliferación de blastos (**tabla 3**).

10 En el caso del kit **HS-I** (GM-CSF y PICIBANIL), la aplicación adicional del lisado estreptocócico debería activar las células inmunorreactivas y promover la conversión de blastos mielógenos en DC_{leu}, como ya es conocido para la generación *ex vivo* de DC. Posiblemente, los pacientes con LMA tratados de esta forma también se podrían beneficiar de la influencia de PICIBANIL en el sistema vascular (efecto antiangiogénico, incremento en la permeabilidad del endotelio para las células inmunorreactivas o factores humorales).

15 En el caso de **HS-M** (GM-CSF y PGE₁), se debe administrar PGE₁ además de GM-CSF. De forma análoga a PGE₂, se ha demostrado que PGE₁ también promueve la diferenciación de DC; PGE₁ también se usa (en mayores concentraciones) para el tratamiento de la enfermedad VOD en pacientes después de SCT. Por tanto, HS-M podría lograr un efecto vasodilatador adicional deseado en especial para pacientes después de SCT.

20 **HS-K** (GM-CSF y PGE₂) y **HS-D** (GM-CSF y PGE₂ y PICIBANIL) son kits que contienen PGE₂. PGE₂ incrementa la madurez o capacidad de migración de DC. Adicionalmente, HS-D contiene PICIBANIL, lo que posiblemente potencia la función inmunomoduladora del kit (seguido de una mejora en el efecto de los linfocitos T).

25 Kits subordinados: los kits que contienen TNFα **HS-A** (GM-CSF y TNFα) así como **HS-C** (GM-CSF y TNFα y PGE₂) contienen TNFα en combinaciones dobles o triples: como proteína de fase aguda, TNFα está implicado en procesos inflamatorios, como citocina reguladora de procesos celulares así como para activar el sistema inmunitario, por ejemplo, como un inductor de la maduración de DC. Se ha usado TNFα por vía local (en altas concentraciones) para el tratamiento de tumores de tejidos blandos y por vía sistémica (en bajas concentraciones) para el tratamiento de pacientes con neoplasia avanzada. Inicialmente, HS-A se debe usar principalmente en pacientes con leucemia (en dosis bajas de TNFα), y una vez que esté disponible la experiencia con los kits mencionados preferentemente en el tratamiento del paciente, también se usará HS-C. **HS-F** (GM-CSF y CALCIMICINA): la CALCIMICINA tiene efectos antibióticos así como efectos de intercambio iónico de calcio, actúa como desacoplador e inhibidor de la ATPasa. Se ha demostrado en estudios con animales que (administrada *i.v.*) desencadena inflamación o anafilaxia a dosis extremadamente altas. La CALCIMICINA se ha usado extracorpóreamente en humanos para la fertilización de los ovocitos, pero aún no se ha aplicado por vía sistémica en humanos. Está previsto usar HS-F en pacientes con leucemia (en dosis bajas de CALCIMICINA) una vez que esté disponible la experiencia con los kits mencionados preferentemente en el tratamiento del paciente. En el caso del kit **HS-E** (GM-CSF e INTRÓN), la aplicación adicional de la citocina IFNα2b (= INTRÓN) podría activar adicionalmente el sistema inmunitario y promover la conversión de blastos mielógenos en DC_{leu}, como es conocido de la leucemia mielógena crónica. Sin embargo, HS-E, así como las sustancias individuales sometidas a prueba **HS-G** (GM-CSF), **HS-H** (IFNα2b) y **HS-L** (PICIBANIL) fueron en principio posibles para su uso en pacientes, pero no fueron tan eficaces en proporcionar DC (subtipos) como las preparaciones de combinación; HS-E, G, H y L, por lo tanto, se deben enumerar como subordinadas.

45 En la última etapa, se deben realizar ANÁLISIS DE CORRELACIÓN para investigar el papel o cantidad de subpoblaciones de DC, linfocitos T, así como concentraciones de citocinas en el contexto de la función lítica antileucémica. Los datos para esto aún no están disponibles para evaluación.

50 **CONCLUSIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA INVENCION EN LA CLÍNICA:** Incluso los pacientes con LMA sometidos a trasplante de células madre o a quimioterapia con éxito a menudo recidivan debido a que las células leucémicas permanecen en el cuerpo y son finalmente responsables de la recidiva. La invención aborda estos blastos residuales: usando kits que se seleccionan individualmente y se administran al paciente (que consisten en sustancias clínicamente aprobadas, factores de crecimiento e inmunomoduladores), se deben modular a DC_{leu} de tal forma que activen linfocitos T antileucémicos como una 'vacuna de DC' que presenta antígenos de leucemia, creen una memoria inmunológica de linfocitos T, adicionalmente ayuden a superar otras barreras inmunológicas celulares y humorales y, por tanto, protejan a los pacientes de las recidivas.

60 En principio, se ha demostrado que se puede generar DC/DC_{leu} a partir de SANGRE COMPLETA (WB) de pacientes con leucemia mielógena (LMA) usando "procedimientos estándar", así como combinaciones minimizadas de inmunomoduladores (kits) y que estos pueden producir linfocitos T antileucémicos después de la estimulación sin inducir proliferación de blastos. Se pudieron observar diferencias específicas de paciente: no en todos los pacientes fue exitoso cada kit y no en todos los pacientes la activación de linfocitos T antileucémicos fue igualmente exitosa. Por tanto, debería ser posible, visto en un contexto clínico, inducir la producción *in vivo* de 'DC/DC_{leu}', que inducen linfocitos T antileucémicos *in vivo* y, por tanto, permiten el mantenimiento de las remisiones, después de pruebas previas en muestras de WB de los pacientes por aplicación de combinaciones óptimas de inmunomoduladores (seleccionados específicamente para el paciente). Esta PRUEBA se debe llevar a cabo en cultivo celular con muestras de WB ricas en

- 5 blastos (tomadas en fases de enfermedad agudas ricas en blastos), el tratamiento de pacientes se debe llevar a cabo en fases donde los pacientes no sean demasiado inmunodeficientes (por ejemplo, debido a enfermedad o quimioterapia) para garantizar la regeneración de inmunocitos. La invención presentada es potencialmente adecuada para el tratamiento de todos los pacientes de cualquier edad con leucemia mielógena (leucemia mielógena crónica o aguda o mielodisplasia) antes o después de SCT. El enfoque no está restringido por HLA y es posible sin el conocimiento de los antígenos leucémicos implicados. En principio, los pacientes en fases/emisiones de enfermedades agudas así como crónicas se pueden tratar con el concepto presentado. La eficacia clínica, tolerabilidad y seguridad de los kits seleccionados individualmente (dosificación muy baja) se someterán a prueba inicialmente en aproximadamente 10-15 pacientes en recidiva después de SCT.
- 10 Se ha demostrado *ex vivo* que diferentes kits tienen diferentes efectos o diferentes eficacias en muestras de pacientes individuales, de modo que se debe derivar un protocolo de tratamiento personalizado. Para cada paciente, inicialmente con LMA recurrente, los siguientes kits se someterán a prueba en muestras de WB (**HS-I, K, M y posiblemente D**) y el kit más eficaz se seleccionará *ex vivo*: un kit que logra la mejor modulación de blastos (mejores subtipos de DC/DC_{leu}) sin inducir proliferación de blastos, lo que induce la respuesta de linfocitos T antileucémicos más eficaz con los linfocitos T del paciente (sin producir respuestas exuberantes de linfocitos T, por ejemplo en el contexto de GvH) y que produce el mejor perfil de micromedio/citocinas. Al tratar al paciente con este kit, se podrían superar las barreras inmunológicas y se podría restaurar una inmunidad celular y humoral funcional en el paciente.
- 15 Se dará prioridad al uso de 3-4 kits en pacientes con recidiva seleccionados después de SCT, con sustancias individuales que son bien toleradas o incluso pueden minimizar las complicaciones clínica/terapéuticamente conocidas en el grupo de pacientes mencionado anteriormente.
- 20 En principio, también se podrían usar kits con componentes potencialmente con más riesgo (por ejemplo, TNF α o CALCIMICINA), aunque no se esperan efectos secundarios graves debido a la dosificación muy baja aquí. En principio, la aplicación de sustancias individuales (GM-CSF, INTRÓN, PICIBANIL) también sería posible, pero posiblemente no tan eficaz para proporcionar linfocitos T antileucémicos.
- 25 El **modo de aplicación** (intramuscular (i.m.), subcutáneo (s.c.), intravenoso (i.v.), intradérmico (i.d.)) se debe llevar a cabo de acuerdo con las regulaciones y recomendaciones del fabricante del medicamento (**tabla 3**, columna 4), con lo que en principio, si es posible, son preferentes las aplicaciones i.v. para garantizar que las sustancias tengan una influencia lo más directa posible sobre las células leucémicas en la sangre.
- 30 En algunos experimentos preliminares de cultivo celular, se podría demostrar que la adición *secuencial* de las sustancias a los cultivos de WB produce cantidades comparables de subtipos de DC en comparación con la adición *simultánea* de las sustancias a los cultivos de WB (datos no mostrados). También es necesario aclarar si GM-CSF i.v. se debe administrar como infusión continua o en frecuencias también recomendadas por el fabricante.
- 35 La **duración de la** aplicación en el paciente puede durar desde al menos 3 meses hasta 2 años y también se debe decidir en el contexto de la aplicación clínica en el paciente: los fabricantes de las sustancias enumeradas aquí recomiendan una duración de tratamiento de hasta 180 días (**tabla 3**, columna 7). Se espera que la aplicación se limite a de 3 a 4 meses si se trata a pacientes en recidiva después de SCT. La ventaja de aplicar los kits a este grupo de pacientes es que los efectos sobre (numerosos blastos presentes en la sangre) se pueden examinar directamente. Si estos tratamientos se llevaran a cabo junto con los tratamientos DLI, otra ventaja sería la administración de cantidades definidas de linfocitos T y, por tanto, las células efectoras dirigidas principalmente. En caso de tratamiento de pacientes en remisión de la enfermedad en el curso del tratamiento de mantenimiento, el tratamiento se debe administrar durante hasta 2 años (de forma análoga a otros tratamientos de mantenimiento). Dependiendo de los resultados de seguimiento (véase a continuación), el tiempo de tratamiento recomendado se podría extender o acortar.
- 40 La **dosificación** de las sustancias se debe realizar con dosis inmunomoduladoras muy bajas y se basa en las concentraciones usadas en el enfoque de cultivo de WB; en principio, también se podría incrementar a mayores dosis según lo recomendado por el fabricante (**tabla 3**, columnas 4 y 5). Es probable que la dosificación óptima se deba calcular después de pruebas preliminares en modelos animales: inicialmente, está previsto usar los kits seleccionados en algunas pruebas preliminares con animales en ratas o ratones inmunodeficientes (por ejemplo, NOD-SCID) (a los que se han aplicado linfocitos T y blastos de LMA humanos): se deben someter a prueba los 2-3 mejores kits en paralelo (en comparación con muestras de sangre sin tratamiento con kit) *in vivo* en 2-3 grupos de ratones/ratas inmunodeficientes en diferentes dosificaciones para aclarar si se producirá una reducción de blastos, una activación de linfocitos T antileucémicos, provisión de subtipos de linfocitos T (por ejemplo, células efectoras, células de memoria) y entornos de activación de citocinas.
- 45 La **tabla 3** muestra los kits presentados aquí de acuerdo con la invención y proporciona una visión general de su composición, concentraciones de sustancias individuales usadas *ex vivo* así como consideraciones clínicamente pertinentes con respecto a la dosificación, modo de aplicación y duración del tratamiento con estos. La selección de kit preferente presentada de acuerdo con la invención es: HS-D, HS-M, HS-K, HS-I. Además, se presentan algunos datos sobre la eficacia de la generación de DC así como la actividad antileucémica de los linfocitos T tratados con kit. De
- 50
- 55
- 60
- 65

nuevo, los kits mencionados muestran buena eficacia de la generación de DC y actividad antileucémica de linfocitos T estimulados, respectivamente.

5 En conclusión, se debe mencionar que actualmente no existe un protocolo de tratamiento concreto disponible en humanos. Por lo tanto, las dosificaciones, sugerencias de aplicación, etc., que figuran en el texto o en las ilustraciones solo pretenden ser una orientación.

10 Además de los exámenes de las muestras de WB antes/después de su procesamiento *ex vivo*, se deben realizar exámenes regulares de muestras de sangre de los pacientes durante el tratamiento con kit *in vivo* (*seguimiento*) para registrar sus efecto y perfiles de efectos secundarios. Estas pruebas se deben realizar ANTES del inicio de la aplicación (valores de control) así como en varios momentos en el tiempo durante el curso del tratamiento. Estos tiempos deben estar de acuerdo con los tiempos recomendados para otros tratamientos inmunoterápicos: Inicialmente, la atención se centra en la cuantificación de células leucémicas usando procedimientos de citometría de flujo (perfil de blasto) así como perfiles moleculares (sobreexpresión de antígenos asociados a leucemia, PCR); posiblemente también DC/DC_{leu}, si es detectable en sangre. Además, el papel de los factores celulares y solubles implicados en la defensa contra la leucemia se debe caracterizar: subpoblaciones de linfocitos T (reguladores, CD4/CD8, linfocitos T de memoria/efectores, linfocitos T con perfil de V β definido, propiedades funcionales de linfocitos T implicados (eficacia antileucémica), opcionalmente presencia de linfocitos T específicos de LAA (análisis de tetrámeros)), factores humorales (factores inhibidores (por ejemplo, IL-10, TGF β , CXCR4)/estimuladores solubles, quimiocinas, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, IL-17, IFN γ), medidos en análisis de detección de citocinas).

20 Al realizar un *seguimiento* de los factores solubles y celulares en diferentes momentos en el tiempo en el curso de la enfermedad y al correlacionar los datos con acontecimientos clínicos (por ejemplo, recidiva), la pertinencia clínica, el éxito del tratamiento y el valor pronóstico de este enfoque se pueden establecer finalmente.

25 Está dentro del alcance de la presente divulgación que las afirmaciones sobre aspectos individuales de la invención, ya que están sujetas a las reivindicaciones independientes adjuntas, en la medida en que se hacen específicamente en relación con uno de los aspectos, también constituyen afirmaciones sobre todos los demás aspectos de la invención. A este respecto, los modos de realización de un aspecto de la invención también son modos de realización de los demás aspectos de la invención.

Resultados experimentales del uso de kits en ratas que padecen leucemia:

35 En el ínterin, los kits se han sometido a prueba en un modelo de rata con leucemia, que se presentará como ejemplo de pruebas de la eficacia de los kits también *in vivo*:

40 Las **ratas BN (Brown Norway)** y las **ratas PVG.1N** son ratas con el mismo perfil de MHC. En ratas BN, se puede generar una LMA-M3 por inyección de células leucémicas BNML. La leucemia se manifiesta propiamente dentro de los 14-17 días, primero en el bazo, después también en la sangre periférica y a continuación da lugar a la muerte dentro de los 7 días. Se pueden obtener muestras de sangre de la vena de la cola para análisis celular; después de que los animales se hayan sacrificado (después de 23 días, poco antes de su muerte relacionada con LMA), también se pueden llevar a cabo análisis celulares del bazo y glóbulos sanguíneos después de las punciones cardíacas.

45 **GENERACIÓN DE DC/DC_{leu} EX VIVO A PARTIR DE WB DE RATAS LEUCÉMICAS:** De forma análoga a la sangre humana que contiene blastos, se realizaron cultivos de WB de ratas con LMA con los kits HS-D, I, K, M en comparación con los controles de WB (se usaron las mismas sustancias que en humanos; excepción: *GM-CSF de rata*). Las primeras evaluaciones mostraron que DC_{leu} se puede generar a partir de sangre de rata de 5 animales así como a partir de WB leucémica humana (promedio de un 10-35 % dentro de la fracción celular completa con una convertibilidad de los blastos a DC_{leu} de un 30-50 %). HS-I fue el más exitoso, seguido de HS-M y HS-K. No se observó inducción de proliferación de blastos (coexpresión de Ki67) después del tratamiento con ninguno de los kits. Además, después del cocultivo de muestras de WB tratadas con kit que contienen DC_{leu} con linfocitos T de rata autólogos, se pudo detectar un incremento en la actividad de lisis de los blastos frente a blastos BNML en todos los kits. Los linfocitos T estimulados con HS-I-WB mostraron la mayor eficacia antileucémica. Todavía están pendientes análisis más detallados. Puesto que los blastos en sangre de rata en general eran convertibles a DC_{leu}, ahora se deben realizar tratamientos *in vivo*.

55 **TRATAMIENTO IN VIVO DE RATAS PVG.1N CON PICIBANIL, PGE1 y PGE2 (DATOS DE TOXICIDAD):** Se han realizado datos de toxicidad en un total de 4 ratas de la cepa sana PVG.1N: se les administraron las concentraciones finales clínicamente previstas de las sustancias individuales i.v. en las siguientes dosis: picibanil (0,35 μ g/rata), PGE2 (1 μ g/rata), PGE1 (1 μ g/rata) y placebo (PBS). Las ratas no mostraron efectos secundarios (graves) ((S)AE): respiración, sueño, ingesta de alimento, movilidad, piel, peso fueron completamente normales o como en los animales de control (datos no mostrados). El análisis de citometría de flujo de glóbulos sanguíneos de ratas PVG.1N no mostró diferencias en comparación con los controles con placebo (linfocitos Teff, Treg, CD4, CD8, NK, NKT, datos no mostrados).

65 **TRATAMIENTO IN VIVO DE RATAS ENFERMADAS CON LEUCEMIA BN CON KITS (DATOS DE EFICACIA):** Puesto que la tolerabilidad de las sustancias usadas es muy buena, las ratas BN se trataron ahora con 4 kits después

de la inducción de leucemia (día 0) los días 14 y 17 en comparación con el control con placebo (aplicación i.v. en la vena del pene, véase la figura 5 a): 3 ratas recibieron cada una:

5 HS-I_{bajo}: GM-CSF (1 µg/rata) + picibanil (0,175 µg/rata, correspondiente a 0,5 kU en humanos)

HS-I_{alto}: GM-CSF (1 µg/rata) + picibanil (0,35 µg/rata, correspondiente a 1 kU en humanos)

HS-K: GM-CSF (1 µg/rata) + PGE₂ (1 µg/rata)

10 HS-M: GM-CSF (1 µg/rata) + PGE₁ (1 µg/rata)

Placebo: PBS

15 La eficacia de los kits se determinó el día 23 comparando la **cantidad de blastos** en sangre y bazo después del tratamiento con kit con el control con placebo: mientras que HS-I_{bajo} (con dosis baja de picibanil) y HS-K (que contiene PGE₂) no mostraron diferencias en la cantidad de blastos en comparación con el control, las proporciones de blastos se redujeron en un 4,4-6,3 % en sangre y bazo después del tratamiento con HS-I_{alto} e incluso en un 10,7-15,8 % después del tratamiento con HS-M.

20 Los análisis de las células inmunorreactivas en la sangre en el momento del sacrificio de las ratas mostraron la siguiente imagen: después del tratamiento con HS-M (pero no después del tratamiento con los kits restantes) los linfocitos T (de memoria) **CD62L+CD4+ bw CD8+** fueron detectables en sangre a niveles incrementados en un 10,4 % (CD4+) y un 21,1 % (CD8+) en ratas (**figura 5c**). La reducción en porcentaje de linfocitos T reguladores **CD4+FoxP3+CD25+** después del tratamiento con todos los kits (en un -24,3 % (HS-I_{bajo}) hasta un -55,6 % (HS-M)) en el bazo en comparación con el control también fue sorprendente (**figura 5d**). Aún no están disponibles datos adicionales sobre células inmunorreactivas.

30 En resumen, estos resultados obtenidos con sangre de rata muestran que la generación *ex vivo* de DC/DC_{leu} es exitosa de forma similar que con WB humana sin incrementar la proliferación de blastos. El tratamiento de ratas sanas con las sustancias individuales mostró una muy buena tolerabilidad de las sustancias; el tratamiento de ratas BN enfermas con leucemia LMA-M3 con diferentes kits HS-K, M, I, mostró que en solo 10 días de tratamiento con este concepto de tratamiento inmunomodulador se podía lograr una reducción de blastos de hasta un 15,8 %, pero no todos los kits funcionan igualmente bien para esta forma de leucemia.

35 **CONCLUSIÓN:** En base a la presente invención, pronto será posible desarrollar un "protocolo *in vivo*" que permitirá la aplicación de combinaciones minimizadas de inmunomoduladores (sin requisitos de sala aséptica ("instalación GMP") para la producción) en pacientes con leucemia mielógena. El diseño detallado de un protocolo de tratamiento personalizado para pacientes con leucemias mielógenas con sustancias individuales eficaces inmunomoduladoras diferentes o combinadas de manera diferente, así como el concepto detallado de un seguimiento inmunitario se debe realizar después de consultar con los médicos especialistas antes del inicio de los tratamientos y se basará en otros protocolos de tratamiento inmunoterápico. La experiencia en tratamientos inmunoterápicos está disponible en las instituciones designadas para el tratamiento de pacientes. Están disponibles un programa de apoyo diagnóstico realizado de forma rutinaria para el examen de muestras de sangre así como hallazgos clínicos sobre la progresión del paciente.

45 Por tanto, para la implementación clínica de la invención, la experiencia, conocimientos y sinergias existentes se pueden usar para tratar, inicialmente, a pacientes con LMA en recidiva después de un SCT alogénico.

50 **Tabla 1: Generación de DC/DC_{leu} a partir de células mononucleares (MNC) o células de sangre completa (WB) que contienen blastos de LMA usando diferentes procedimientos o kits específicos de diferenciación de DC, respectivamente**

55 **a) Procedimientos o kits de diferenciación de DC, respectivamente, para generar DC/DC_{leu} a partir de MNC (a1-a4) o WB (a1-a5) que contienen blastos**

| Procedimiento de generación de DC | 'CA' -a1- | 'MCM' -a2- | 'PICI' -a3- | 'INTR' -a4- | 'Kits': HS-A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M* -a5- |
|------------------------------------|-------------------|--|---|------------------------------|---|
| Tiempo de cultivo | 3-4 días | 10-14 días | 9-11 días | 10-14 días | 8-10 días |
| Procedimientos de generación de DC | IL-4, CALCIMICINA | GM-CSF, IL-4, TNF α , FL, IL-1 β , IL-6, PGE ₂ | GM-CSF, IL-4, PGE ₂ , TNF α , PICIBANIL | GM-CSF, INTRÓN, TNF α | Diversas combinaciones de 1-3 sustancias individuales/moduladores inmunitarios clínicamente aprobados |

| | | | | | |
|--|--|---|--|---|--|
| Mecanismo de acción | Circunvencción de la diferenciación de DC inducida por citocinas | Diferenciación de DC inducida por citocinas, PGE ₂ incrementa la expresión de CCR7 y mejora la migración | Lisado bacteriano y PGE ₂ estimulan la diferenciación de DC | Diferenciación de DC inducida por citocinas | Diferenciación de DC por combinación de moduladores inmunitarios/señales de peligro/citocinas/inductores de maduración |
| IL-4, -1β, -6: Interleucina 4, -1β, -6 TNFα: factor de necrosis tumoral alfa Ligando FL FLT3 | | PGE ₂ : Prostaglandina E2 GM-CSF: factor estimulador de granulocitos y macrófagos | | INTRÓN: Interferón alfa2b PICIBANIL: OK432 (lisado bacteriano de <i>Streptococcus pyogenes</i>) | |

Para detalles de sustancias activas, véase la tabla 2.

5 b) **Ventajas e importancia de la generación de DC a partir de muestras de sangre completa**

| | |
|--|---|
| Ventajas | Comentarios con respecto a la pertinencia clínica o una implementación en la práctica clínica |
| Simulación de un sistema fisiológico | Transferibilidad a la clínica |
| Cuantificabilidad y facilidad de caracterización en reacciones de células implicadas - Proporciones de blastos - Proporciones de (sub)poblaciones de linfocitos T, linfocitos NK, NKT - El éxito de convertir blastos en DC _{Ieu} o subtipos de DC es bien cuantificable | Conclusiones sobre mecanismos biológicos/perfiles de reacción - posible incremento de blastos cuantificables - células inmunorreactivas interesantes (por ejemplo, linfocitos T reguladores, de memoria efectores, positivos para integrina, linfocitos NK, NKT) - Las CD <i>in vivo</i> son difíciles de cuantificar debido a su migración en el tejido |
| Análisis del microentorno sobre influencias inmunoestimuladoras e inhibitoras posible | Descubrimiento de escape así como mecanismos antileucémicamente funcionales y posibles interrelaciones; desarrollo de las correspondientes estrategias terapéuticas |
| Pruebas de funcionalidad en sangre completa posibles | Reacciones antileucémicas cuantificables (disminución/incremento de blastos), perfiles de células efectoras medibles - (proliferación, subtipos) |

Tabla 2: Sustancias activas en los kits para inmunomodulación de blastos de LMA

| Sustancia activa | Función/efecto | Aplicación clínica convencional |
|--|---|--|
| GM-CSF Leucina Sagramostina | - induce la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (células precursoras, neutrófilos, monocitos, macrófagos, DC mielógenas) - reduce la duración de neutropenias - disminuye la incidencia de infecciones - reduce la administración de antimicrobianos | (1) Pacientes con LMA > 55 años: después de quimioterapia para acortar la recuperación de neutrófilos, para reducir la incidencia de infecciones (2) Movilización de células madre en PB (para recogida de células madre) (3) Reconstitución de células mielógenas después de SCT autólogo/allogénico en ALL, NHL, HD (4) Tratamiento de fracaso de trasplante después de SCT autólogo/allogénico (5) Activación de monocitos/DC en pacientes con melanoma <i>in vivo</i> (6) Inmunomodulación de blastos (s.c. o i.v.) |
| TNFα Caquexina | - Citocina que activa las proteínas de fase aguda - Inducción de apoptosis, proliferación celular, diferenciación, liberación de citocinas - Desencadenamiento de inflamaciones, necrosis, caquexia, fiebre, reacciones autoinmunitarias | (1) Tratamiento local de sarcomas, tumores no reseables, melanomas de las extremidades (2) Tratamiento sistémico (i.v.) de pacientes con neoplasias en fase avanzada |
| INTRÓN | - Citocina con efecto | (1) Tratamiento de hepatitis B y C |

| | | |
|--|---|--|
| IFN α 2b | <p>inmunomodulador</p> <ul style="list-style-type: none"> - crítico en la defensa de células infectadas por virus, - crítico en la activación del sistema inmunitario - reguladores de proliferación celular | <p>(2) Tratamiento de LMC (3) Tratamiento de mielomas (4) Tratamiento de linfomas foliculares (5) Tratamiento de tumores carcinoides (6) Tratamiento de melanomas (7) Tratamiento de tricoleucemia (Administración i.v., i.m., s.c.: en individuos sanos, las aplicaciones i.v. y s.c./i.m. producen resultados comparables)</p> |
| PGE₁ (Alprostadil) | <ul style="list-style-type: none"> - propiedades vasodilatadoras (incrementan la circulación) - actividad antiplaquetaria | <p>(1) Tratamiento de enfermedad venooclusiva (VOD) después de SCT (2) Tratamiento de disfunciones eréctiles (3) Mantiene abierto el conducto arterial de Botal (4) Tratamiento de isquemias de las extremidades (administración i.v.)</p> |
| PGE₂ (Prostina E2) | <ul style="list-style-type: none"> - formado por plaquetas (activadas), posiblemente por eritrocitos (activando el transporte de Ca en eritrocitos): ¡implicado en la coagulación! - potencia las contracciones | <p>(1) Induce el parto, apoya el nacimiento, inicia el aborto (2) Aplicación i.v., s.c., i.m.</p> |
| PICIBANIL | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus pyogenes</i> (baja virulencia, tratado con H₂O₂ y penicilina) - provoca la activación de células inmunorreactivas, liberación de citocinas, incrementa la permeabilidad del endotelio, efecto antiangiogénico (Hitayama 2013) | <p>(1) Tratamiento intralesional de tumores linfáticos benignos (linfangiomas, higromas quísticos), tumores de cabeza y cuello (2) Tratamiento intrauterino en caso de higromas quísticos (3) Inyección intratumoral de DC inmaduras y OK432 en la proximidad del tumor en caso de carcinomas pancreáticos (4) Inducción de pleurodesis por infusión pleural de OK432 (5) Inmunomodulación en caso de carcinomas de células escamosas (i.d. o en la proximidad del tumor) i.m., i.d. o s.c. de acuerdo con la aprobación</p> |
| CALCIMICINA , Ionóforo de calcio, A23187 (Sigma) - Producto de <i>Streptomyces chartreusensis</i> | <ul style="list-style-type: none"> - actividad antibiótica frente a bacterias grampositivas - incrementa los iones de Ca²⁺ intracelulares - desacoplador de fosforilación oxidativa - inhibidor de la ATPasa mitocondrial | <p>(1) <i>Ex vivo</i>: tratamiento de ovocitos antes de la fertilización <i>in vitro</i> (2) Cerdo: la administración i.v. (5 mg/kg altamente concentrada) induce choque anafiláctico (3) Rata: la inyección intrapleural provoca pleuritis (4) Cobaya: la inhalación provoca neumonía</p> |

Tabla 3: Composición de los kits sometidos a prueba

| Kits | Comentarios a 1,2,3 | | | | | | (1) eficacia de generación de DC N/NN (%) | (2) función de linfocitos T antileucémicos N/NN (%) |
|-------------------------------------|--|---|--|--|-----------------------|--|---|---|
| | Dosificación en CULTIVO CELULAR | Consideraciones clínicas: Modo de aplicación <i>in vivo</i> PREVISTO (AA), dosificación (Do): indicado como 'intervalo' (Do ^R) así como en el contexto inmunomodulador relativo a 6 l de sangre (Do ^l), frecuencia de administración (VF) y duración de la administración (VD) | | | | | | |
| | | AA (negrita: previsto) | Do ^R [1] $\mu\text{g}/\text{m}^2$ [2] millón UI/ m^2 [3] $\mu\text{g}/\text{día}$ [4] mg/kg/día [5] $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ [6] $\mu\text{g}/\text{semana}$ [6] mg/ $\text{m}^2/\text{día}$ | Do ^l /[6 l] | VF | VD (en general: 3 meses hasta 2 años, comenzando con: | | |
| HS-I: GM-CSF PICIBANIL | 800 U/ml 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | ic/sc/iv im, sc, id | 15-500 (1) 20-500 | 75 ⁽⁵⁾ 50 ⁽⁶⁾ | ~3- 7x/sem. ~3- | 7-42 días -21 días | 30/30 (100 %) | 14/19 (74) |

ES 2 791 410 T3

| | | | | | | | | |
|---|---------------------------------|--|--|---|--|------------------------------------|------------------|-------------|
| | | | (3) | | 7x/sem. | | | |
| HS-K: GM-CSF PGE ₂ | 800 U/ml 1 µg/ml | ic/sc/iv iv, sc, im | 15- 500 ⁽¹⁾ 0,1-5 ⁽⁴⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 0,36 ⁽⁴⁾ | ~3- 7x/sem. ~3- 7x/sem. | 7-42 días 7-42 días | 13/13 (100 %) | 7/9 (78) |
| HS-M: GM-CSF PGE ₁ | 800 U/ml 1 µg/ml | ic/sc/iv iv | 15- 500 ⁽¹⁾ 0,075- 500 ⁽³⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 0,36 ⁽⁴⁾ | ~3- 7x/sem. ~7x/sem. | 7-42 días ~30 días | 3/4 (75 %) | 3/3 (100) |
| HS-D: GM-CSF PICIBANIL PGE ₂ | 800 U/ml 10 µg/ml 1 µg/ml | ic/sc/iv im, sc, id iv, sc, im | 15- 500 ⁽¹⁾ 20- 500 ⁽³⁾ 0,1-5 ⁽⁴⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 50 ⁽⁶⁾ 0,36 ⁽⁴⁾ | ~3- 7x/sem. ~3- 7x/sem. ~3- 7x/sem. | 7-42 días -21 días 7-42 días | 38/43 (88 %) | 10/14 (71) |
| HS-F: GM-CSF CALCIMICINA | 800 U/ml 375 ng/ml | ic/sc/iv ex vivo | 15- 500 ⁽¹⁾ 5- 10 µM | 75 ⁽⁵⁾ 18 ⁽⁴⁾ | ~3- 7x/sem. ¿~3- 7x/sem.? | 7-42 días ¿~3- 7x/sem.? | 42/45 (93 %) | 11/14 (100) |
| HS-A: GM-CSF TNFα | 800 U/ml 10 ng/ml | ic/sc/iv iv | 15- 500 ⁽¹⁾ 0,04- 4 ⁽⁷⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 0,06 ⁽⁷⁾ | ~3- 7x/sem. ~1- 2x/sem. | 7-42 días ~56 días | 36/44 (82 %) | 3/3 (100) |
| HS-E: GM-CSF INTRÓN | 800 U/ml 500 U/ml | ic/sc/iv iv/sc/im | 15- 500 ⁽¹⁾ 2-5 ⁽²⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 3- 3.5 ⁽²⁾ | ~3- 7x/sem. ~3- 7x/sem. | 7-42 días ~180 días | 15/25 (60 %) | 6/9 (67) |
| HS-C: GM-CSF TNFα PGE ₂ | 800 U/ml 10 ng/ml 1 µg/ml | ic/sc/iv iv iv, sc, im | 15-500 ⁽¹⁾ 0,04-4 ⁽⁷⁾ 0,1-5 ⁽⁴⁾ | 75 ⁽⁵⁾ 0,06 ⁽⁷⁾ 0,36 ⁽⁴⁾ | ~3- 7x/sem. ~1- 2x/sem. ~3- 7x/sem. | 7-42 días ~56 días 7-42 días | 30/37 (81 %) | 5/9 (56) |
| HS-G: GM-CSF | 800 U | ic/sc/iv | 15- 500 ⁽¹⁾ | 75 ⁽⁵⁾ | ~3- 7x/sem. | 7-42 días | 18/27 (66 %) | |
| HS-H: INTRÓN | 500 U/ml | iv/sc/im | 2-5 ⁽²⁾ | 3- 3.5 ⁽²⁾ | ~3- 7x/sem. | ~180 días | 4/12 (33 %) | |
| HS-I: PICIBANIL | 10 µg/ml | im, sc, id | 20- 500 ⁽³⁾ | 50 ⁽⁶⁾ | ~3- 7x/sem. | -21 días | 6/9 (67 %) | |
| sin | | | | | | | 6/41 (15 %) | 16/22 (73) |

* relativo a 6 litros de sangre, correspondiente a las concentraciones de sustancias activas usadas *in vitro*

sin control de WB sin kits

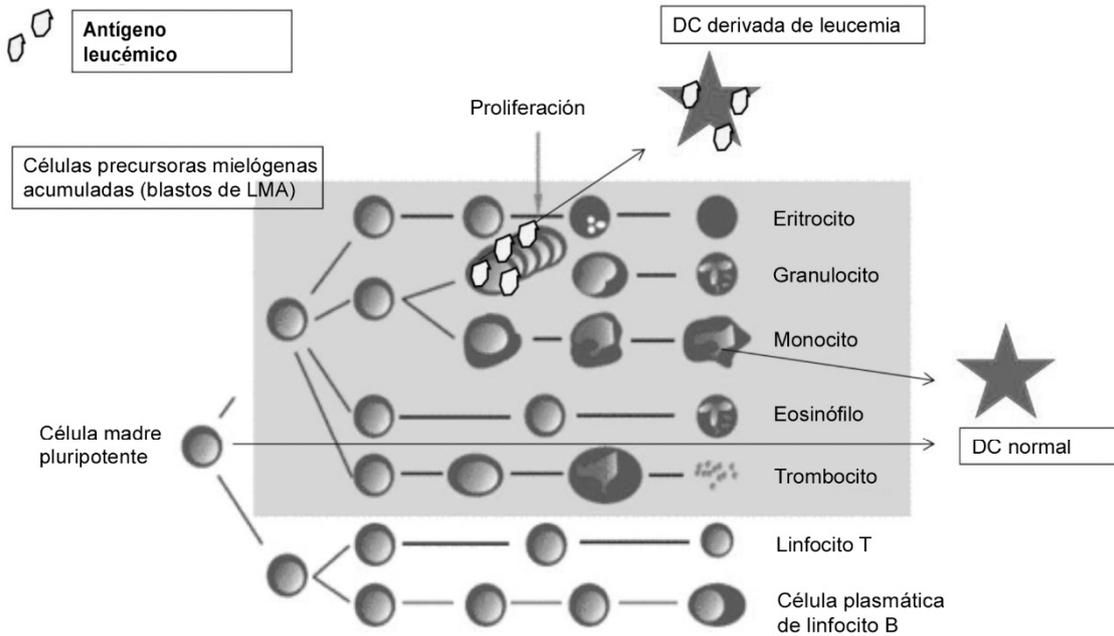
REIVINDICACIONES

1. Combinación de agentes activos para administración en tratamiento parenteral, individual y/o prevención de leucemia mielógena en pacientes en remisión de la enfermedad, que comprende GM-CSF y solo un agente adicional seleccionado de PICIBANIL, PGE1, PGE2, CALCIMICINA y TNF α , así como excipientes farmacéuticamente compatibles, que comprenden agua, soluciones acuosas, tampones, soluciones tampón, aglutinantes y/o adyuvantes, en la que la leucemia mielógena es una leucemia mielógena aguda, enfermedad mielodisplásica, enfermedad mieloproliferativa o leucemia mielógena crónica.
2. Combinación de agentes activos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento se lleva a cabo a la siguiente dosificación:
- GM-CSF** como infusión continua intravenosa o diariamente alternando con de 15 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 75 $\mu\text{g}/\text{día}$, y **PICIBANIL** por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea con de 20 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 50 $\mu\text{g}/\text{día}$, en la que GM-CSF y **PICIBANIL** se administran en este orden en intervalos diarios, de dos días o de tres días.
3. Combinación de agentes activos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento se lleva a cabo a la siguiente dosificación:
- GM-CSF** como infusión continua intravenosa o diariamente alternando con de 15 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 75 $\mu\text{g}/\text{día}$, y **PGE1** intravenosa o como infusión continua con 0,075 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, hasta un máximo de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, GM-CSF y PGE1 se administran en este orden en intervalos diarios, de dos días o de tres días.
4. Combinación de agentes activos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento se lleva a cabo a la siguiente dosificación:
- GM-CSF** como infusión continua intravenosa o diaria alternando con de 15 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 75 $\mu\text{g}/\text{día}$, y **PGE2** con de 0,1 a 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, en la que GM-CSF y PGE2 se administran en este orden en intervalos diarios, de dos días o de tres días.
5. Combinación de agentes activos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento se lleva a cabo a la siguiente dosificación:
- GM-CSF** como infusión continua intravenosa o diaria alternando con de 15 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 75 $\mu\text{g}/\text{día}$, y **TNF α** intravenoso 0,04 $\text{mg}-4 \text{ mg}/\text{m}^2/24 \text{ h}$,
- GM-CSF y TNF α se administran en este orden en intervalos diarios, de dos días o de tres días.
6. Combinación de agentes activos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento se lleva a cabo al siguiente nivel de dosis:
- GM-CSF** como infusión continua intravenosa o diaria alternando con de 15 a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferentemente 75 $\mu\text{g}/\text{día}$, y dosificación de **CALCIMICINA** 0,1-10 μg , donde GM-CSF y CALCIMICINA se administran en este orden en intervalos diarios o de dos días.
7. Combinación de agentes activos de acuerdo con una de las reivindicaciones previas para administración parenteral.
8. Procedimiento para seleccionar una combinación adecuada de agentes activos para el tratamiento individual y/o prevención de leucemia mielógena, que comprende las siguientes etapas:
- (a) subdivisión de la muestra de sangre completa de un paciente que contiene blastos en varias submuestras;
 - (b) aislamiento *ex vivo* de linfocitos T de una muestra de sangre completa del paciente o de un donante de células madre;
 - (c) adición secuencial de las siguientes combinaciones individuales de agentes activos a las submuestras de sangre completa que contienen blastos individuales al comienzo y después de un primer período de incubación de las submuestras de preferentemente de 4 a 6 días, en el que la combinación de agentes activos convierte en las submuestras blastos leucémicos en células dendríticas leucémicas DCLeu:
 - (i) GM-CSF y PICIBANIL
 - (ii) GM-CSF y PGE2

- (iii) GM-CSF y PGE1
- (iv) GM-CSF y TNF α
- 5 (v) GM-CSF y CALCIMICINA
- (d) adición de los linfocitos T aislados en la etapa (a) a cada una de las submuestras obtenidas en la etapa (c) después de la incubación y posteriormente incubarlas durante un segundo período de incubación de preferentemente de 7 a 10 días;
- 10 (e) realizar una prueba de lisis en cada una de las submuestras después del período de incubación en la etapa (d) para detectar la función antileucémica de la combinación de agentes activos usados;
- 15 (f) establecer una clasificación de las combinaciones de agentes activos usados dependiendo de la calidad del resultado de las pruebas de lisis respectivas; y
- (g) selección de la combinación de agentes activos de acuerdo con la mejor conversión de blastos en DCleu sin la inducción de proliferación de blastos y el mejor resultado de lisis de blastos logrado por la activación de linfocitos T antileucémicos.
- 20

Figura 1: linfocitos T antileucémicos mediados por DC/DC 'derivadas de leucemia' (DC_{leu})

a) En un organismo sano, las DC surgen de células madre o monocitos; DC_{leu} surgen de blastos de LMA 'rediferenciados'



b) Linfocitos T activados y estimulados con DC/DC_{leu} antileucémicamente activos (*ex vivo/in vivo*)

- (b1) Las células de LMA son 'convertibles' por DC_{leu} (por procedimientos/kits de DC) *ex vivo/in vivo*
- (b2) Estimulación de linfocitos T con DC_{leu} (DC_{leu} 'presentan' TODOS los antígenos de LMA del paciente)
- (b3) los linfocitos T antileucémicamente dirigidos reconocen y destruyen las células de LMA
- (b4) formación de memoria inmunológica

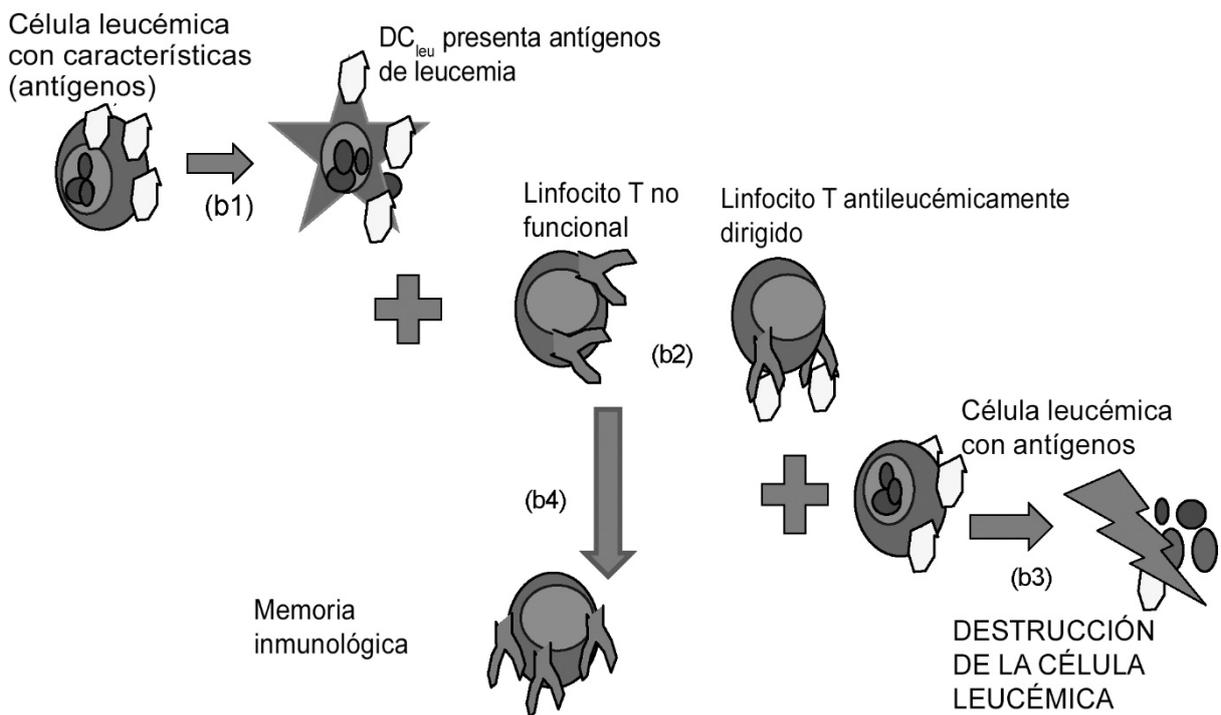
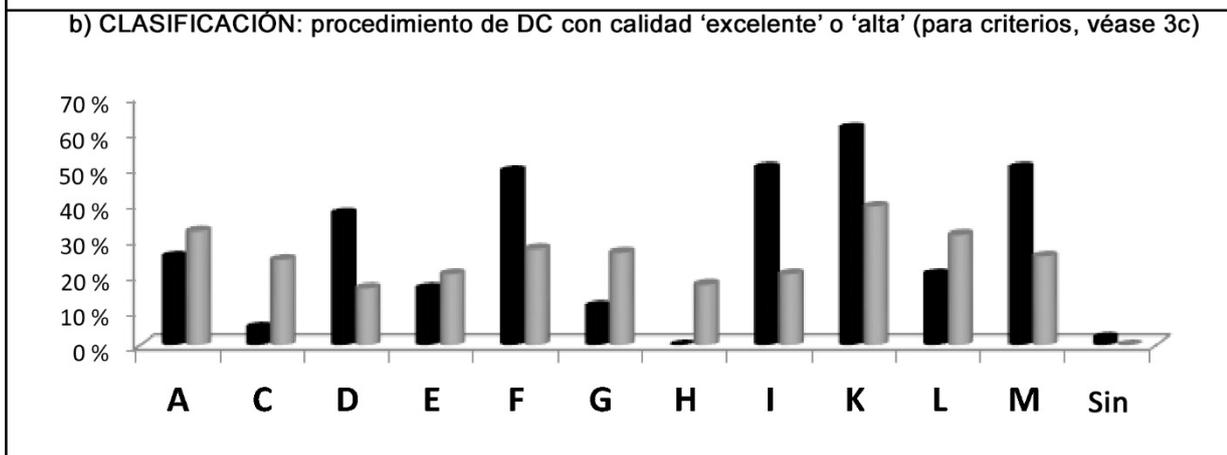
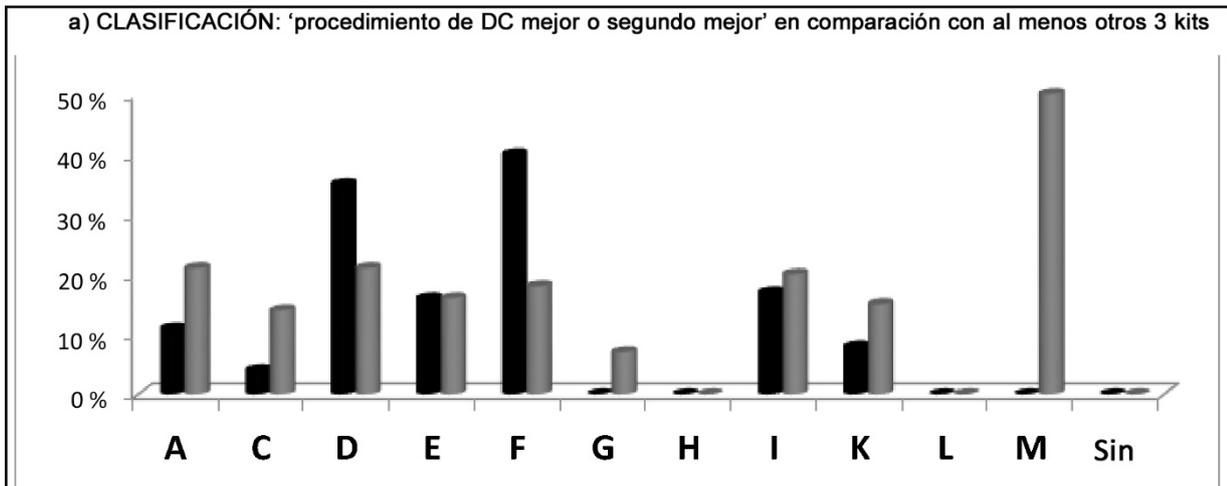


Figura 3: selección del mejor procedimiento de kit de WB para generar subtipos de DC/DC_{leu} en pacientes con LMA individuales: se muestran porcentajes de generación de DC/DC_{leu} exitosa con kits individuales



c) Criterios de una generación de DC exitosa

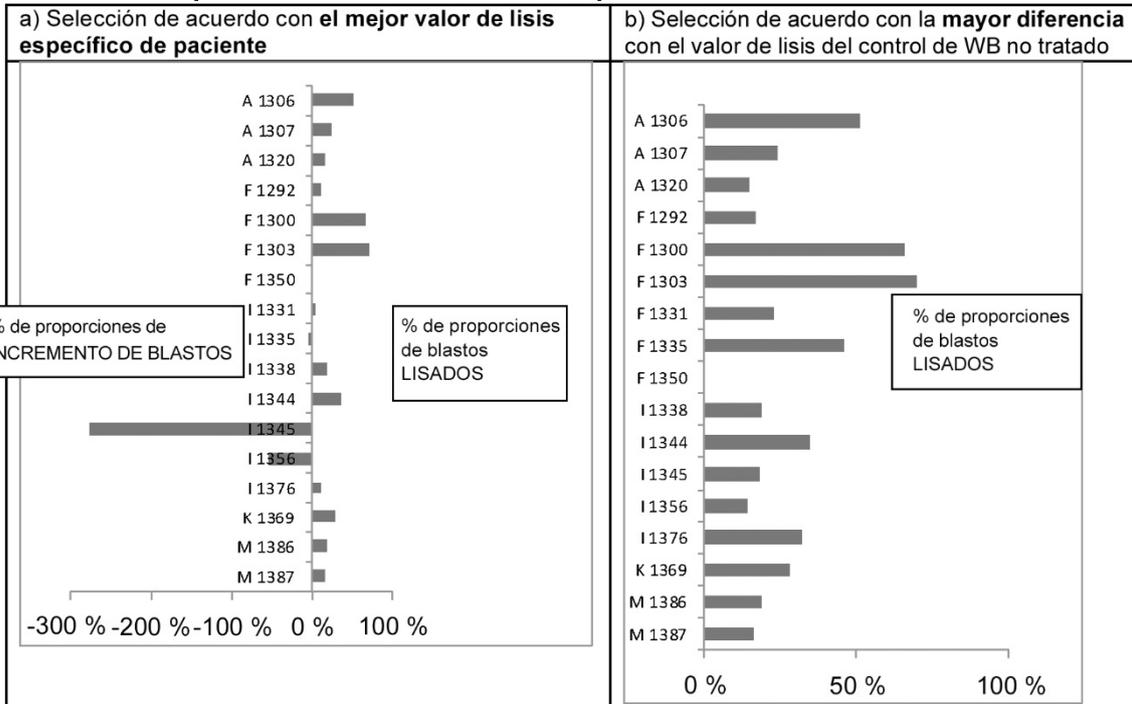
| | % DC/célula sus | % DC _{leu} /célula sus | % DC _{leu} /DC | % DC _{mig} /DC |
|------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 'excelente' | >25 | >15 | >25 | >30 |
| 'excelente/alta' | ≥25-20 | ≥15-12 | ≥25-16 | ≥30-21 |
| 'alta' | ≥19-14 | ≥11-8 | ≥15-11 | ≥20-15 |
| 'satisfactoria' | ≥13-10 | ≥7-5 | ≥10-5 | ≥14-10 |
| no exitosa | <10 | <5 | <5 | <10 |

d) Selección de los 6 mejores kits de acuerdo con los criterios de CLASIFICACIÓN

| procedimiento de DC 'mejor' o 'segundo mejor' en comparación | | | calidad 'excelente' o 'alta' (incluyendo datos de DC _{mig}) | | | calidad 'excelente' o 'alta' (excluyendo datos de DC _{mig}) | | |
|--|---------------------|-----|---|------------------|-----|---|------------------|-----|
| D | mejor/segundo mejor | 56* | K | 'excelente/alta' | 83* | K | 'excelente/alta' | 77* |
| | no exitoso | 12* | | no exitoso | 0* | | no exitoso | 0* |
| F | mejor/segundo mejor | 58* | F | 'excelente/alta' | 81* | M | 'excelente/alta' | 75* |
| | no exitoso | 6* | | no exitoso | 3* | | no exitoso | 25* |
| M | mejor/segundo mejor | 50* | M | 'excelente/alta' | 75* | I | 'excelente/alta' | 63* |
| | no exitoso | 25* | | no exitoso | 25* | | no exitoso | 0* |
| I | mejor/segundo mejor | 37* | D | 'excelente/alta' | 67* | D | 'excelente/alta' | 50* |
| | no exitoso | 0* | | no exitoso | 11* | | no exitoso | 7* |
| A | mejor/segundo mejor | 32* | I | 'excelente/alta' | 70* | F | 'excelente/alta' | 47* |
| | no exitoso | 18* | | no exitoso | 0* | | no exitoso | 7* |
| K | mejor/segundo mejor | 23* | A | 'excelente/alta' | 57* | A | 'excelente/alta' | 27* |
| | no exitoso | 0* | | no exitoso | 17* | | no exitoso | 16* |

*Porcentajes de casos sometidos a prueba; sin: control de WB sin adición de kits

Figura 4: Actividad lítica de blastos antileucémicos de linfocitos T estimulados con muestras de WB de LMA TRATADAS con KIT (HS-D, F, I, M, K, A) en comparación con muestras no tratadas



c) Selección de muestras de WB tratadas con HS-D, I, K, M en comparación con control de WB

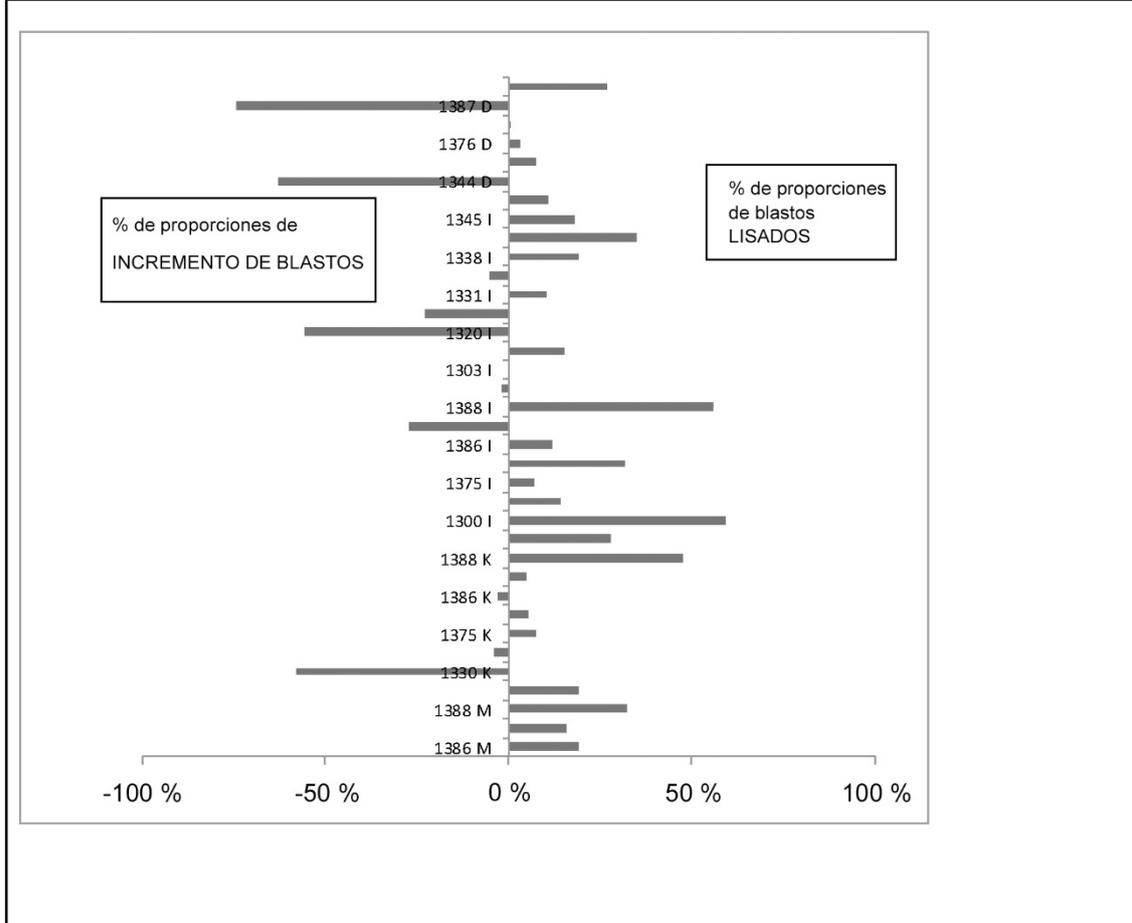
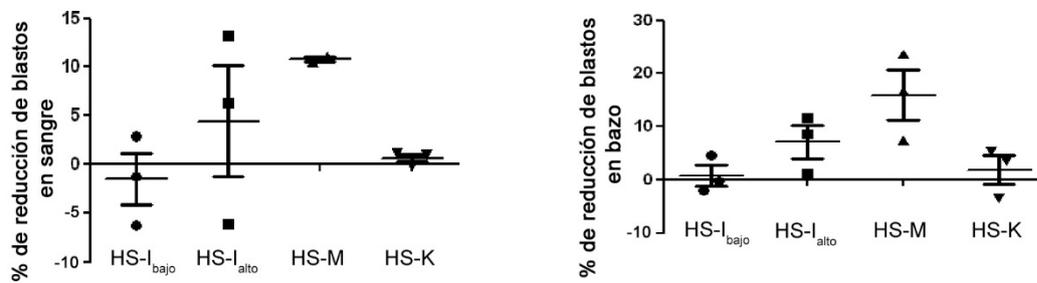


Figura 5: el tratamiento de ratas BNML con kits da lugar a la reducción del recuento de blastos y a cambios en la composición de linfocitos T en sangre y bazo en comparación con control con placebo

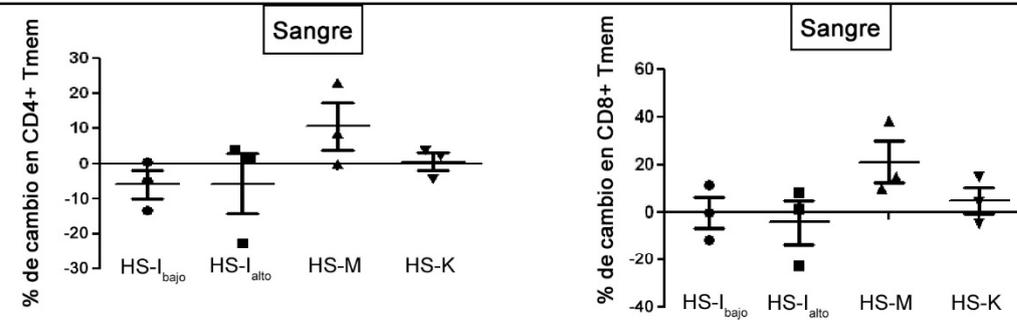
a) Diseño experimental



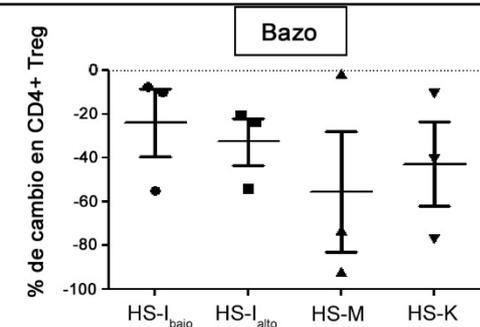
b) Reducción de blastos en sangre (izquierda) y bazo (derecha)*



c) Incremento de CD62L+ (Tmem): CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha) en sangre y bazo*



d) Reducción de CD4+CD25+FoxP3+ Treg en bazo*



*en comparación con control con placebo