

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 440**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2016 PCT/SG2016/050441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17095324**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2016 E 16871163 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3384052**

54 Título: **Correlaciones clínicas de la eficacia de la inmunoterapia**

30 Prioridad:

04.12.2015 SG 10201509979S

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2020

73 Titular/es:

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (33.3%)
1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis
Singapore 138632, SG;
TESSA THERAPEUTICS LTD. (33.3%) y
SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE. LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CONNOLLY, JOHN;
HOPKINS, RICHARD y
TOH, HAN CHONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 795 440 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

Correlaciones clínicas de la eficacia de la inmunoterapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés) y en particular a la predicción de la supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT basándose en el análisis de correlaciones de la supervivencia a largo plazo en muestras de sangre o de derivados de la sangre obtenidas de pacientes.

Antecedentes de la invención

El carcinoma nasofaríngeo (NPC, por sus siglas en inglés) positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés) representa un problema de salud significativo para el sudeste asiático. La tasa de incidencia de NPC en hombres del sudeste asiático es de 10 a 21,4 por 100 000 (Chang et al., *Virus Res* (2009) 143: 209-221). Las terapias actuales son eficaces para controlar y curar NPC sin metástasis, sin embargo, los tratamientos para la enfermedad metastásica son limitados. La mediana del tiempo de supervivencia para pacientes con la forma diseminada de la enfermedad varía de 11 a 22 meses (Wee et al., *J Clin Oncol* (2005) 23: 6730-6738). Una alternativa emergente a la quimioterapia es el uso de estrategias de inmunoterapia, que se han centrado en aumentar la respuesta inmunitaria a los antígenos víricos.

Las inmunoterapias experimentales han incluido la vacunación con células dendríticas (CD) (Gerdemann et al., *Mol Ther* (2009) 17: 1616-1625; Chia et al., *Ann Oncol* (2012) 23: 997-1005; Moosmann et al., *Blood* (2010) 115: 2960-2970), el bloqueo de inhibidores de puntos de control (NCCT02460224; NCT02339558; Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44), infusión (Louis et al., *Blood* (2009) 113: 2442-2450; Straathof et al., *Blood* (2005) 105: 1898-1904; Louis et al., *J Immunother* (2010) 33: 983-990) o expansión (Smith et al., *Cancer Res.*, de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés). (2012) 72: 1116-1125) y terapia CAR-T. Las estrategias celulares tienen el objetivo final de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos que sea capaz de destruir directamente los tumores infectados por virus. Si bien ha habido un gran progreso en la aplicación del bloqueo de inhibidores de puntos de control contra los tumores, su uso contra NPC ha sido limitado. La eficacia del anticuerpo terapéutico PD-1, Pembrolizumab, contra NPC dio como resultado una tasa de supervivencia media sin progresión de 5,6 meses (Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44). Además, hasta la fecha no se ha identificado un biomarcador confiable para predecir la eficacia de los inhibidores de puntos de control. La terapia CAR-T ha demostrado ser muy prometedora contra los melanomas y los linfomas, pero ha demostrado una eficacia limitada en la eliminación de tumores sólidos. Similar al bloqueo de inhibidores de puntos de control, no ha habido una identificación clara de los factores que contribuyen a este fracaso. La identificación de una serie de biomarcadores que puedan identificar cómo de bien responderán los pacientes a la terapia y cuándo no responderán sería incalculable para la comunidad sanitaria.

Se ha planteado la hipótesis de que esta falta de eficacia de las terapias CAR-T contra tumores sólidos es parcialmente atribuible a un estado inmunosupresor dentro del microambiente tumoral. Durante el establecimiento del tumor se induce un entorno inmunosupresor, en el que los linfocitos T reguladores (Treg) contribuyen y desempeñan un papel en el mantenimiento de este fenotipo. El tratamiento con gemcitabina quimioterapéutica en varios modelos de cáncer murino ha demostrado que agota selectivamente la población de Treg sin afectar a la población de CTL (Suzuki et al., *Clin Cancer Res* (2005) 11: 6713-6721; Nowak et al., *Cancer Res* (2002) 62: 2353-2358; Shevchenko et al., *Int J Cancer* (2013) 133: 98-107). Hasta ahora, los estudios sobre los efectos de la gemcitabina en el compartimento de Treg en seres humanos han sido limitados, pero los primeros informes muestran que el tratamiento da como resultado una contracción similar del subconjunto regulador tanto *in vitro* (Kan et al., *Anticancer Res* (2012) 32: 5363-5369) como *in vivo* (Rettig et al., *Int J Cancer* (2011) 129: 832-838).

Otro tipo de células reguladoras que es de creciente interés son las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC, por sus siglas en inglés). Las MDSC son una población de células mieloides que se expanden en presencia de varios tipos de cáncer. En seres humanos, las MDSC son una población heterogénea pero pueden definirse en términos generales como HLA-DR-, CD11b+, CD33+, se pueden subdividir dos subconjuntos a partir de esta población como monocíticos (CD14+) o granulocíticos (CD15+) (Wesolowski et al., *J Immunother Cancer* (2013) 1:10; Dumitru et al., *Cancer Immunol Immunother* (2012) 61: 1155-1167; Filipazzi et al., *Cancer Immunol Immunother* (2011) 61: 255-263). Se ha demostrado que estas células son funcionalmente inmunosupresoras, pero su subtipo y frecuencia dependen de la enfermedad a estudiar. El tratamiento de modelos de cáncer murino con gemcitabina muestra una reducción en el número total de MDSC (Suzuki et al., *Clin Cancer Res* (2005) 11: 6713-6721; Ding et al., *Cancer Res* (2014) 74(13): 3441-3453; Huang et al., *Cancer Immunol Immunother* (2013) 62: 1439-1451). El papel de MDSC en EBV+ NPC es poco conocido.

Chia et al, *Mol Ther.* 2014 enero; 22(1):132-9 divulga el tratamiento de NPC con terapia adoptiva con linfocitos T. Li et al., *Int J Biol Sci.* 2011; 7 (5):607-17 indica dos grupos de NPC que muestran diferencias inmunitarias en el

5 contexto de la inmunoterapia con CTL. Chang et al., Head Neck. junio de 2011; 33 (6):886-97 examinó los perfiles de citocinas y la carga de ADN del EBV como indicadores pronósticos en NPC. Spyridonidis et al., Blood 2012; 120:4121 divulga estrategias para generar CTL para transferencia adoptiva. El documento WO 2016/057705 proporciona biomarcadores predictivos de la respuesta terapéutica a la terapia CAR. Peng et al., Cancer Res. 15 de octubre de 2012; 72 (20):5209-18 indica que el bloqueo de la vía de PD-1 puede aumentar el IFN γ en los sitios tumorales para aumentar el tráfico de células inmunitarias a dichos sitios.

Sumario de la invención

10 La invención es como se define en las reivindicaciones. En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para predecir si un paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende:

- 15 (i) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT y;
 (ii) basándose en el análisis de la etapa (i), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

20 En algunas realizaciones, el método comprende analizar la muestra derivada de sangre para determinar una o más correlaciones del tamaño y/o actividad de poblaciones de células inmunitarias efectoras y/o de células inmunitarias inmunorreguladoras.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente por transferencia celular adoptiva (ACT), comprendiendo el método:

- 25 (i) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
 (ii) basándose en el análisis de la etapa (ii), predecir la supervivencia a largo plazo del paciente mediante el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
 30 (iii) administrar una o más dosis de células al paciente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende:

- 35 (i) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
 (ii) basándose en el análisis de la etapa (i), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
 40 (iii) seleccionar un paciente que se prevé que sea un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT para el tratamiento de la enfermedad por ACT.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento continuo de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende:

- 45 (i) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
 (ii) basándose en el análisis de la etapa (i), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
 50 (iii) seleccionar un paciente que se prevé que sea un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT para tratamiento continuado de la enfermedad por ACT.

55 En algunas realizaciones de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación, lo adicional comprende una etapa inicial de administrar una dosis de células al paciente. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene del paciente dentro de un período de 4 semanas después de la administración de la etapa inicial de administrar una dosis de células al paciente.

60 En algunas realizaciones de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación, el uno o más marcadores pronósticos comprenden: un marcador de número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), un marcador de número o actividad de linfocitos T reguladores y/o un marcador de número o actividad de linfocitos T efectores.

En algunas realizaciones de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación, el uno o más marcadores pronósticos comprenden: un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

65 En algunas realizaciones de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación, analizar la muestra derivada de sangre comprende determinar uno o más de: el nivel de interferón gamma (IFN γ), el nivel de CCL22, el nivel de

IL-10, el nivel de IL-8, el nivel de CCL20 y el nivel de VEGF.

En algunas realizaciones de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación, el análisis de la muestra derivada de sangre comprende:

- 5
- (i) determinar la relación del nivel de uno o más marcadores de número o actividad de MDSC, o el nivel de uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T reguladores al nivel de uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T efectores y/o
 - 10 (ii) determinar la relación del nivel de un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T efectores.

En algunas realizaciones, el método comprende además determinar la relación entre la relación de (i) y la relación de (ii).

- 15 En algunas realizaciones, de acuerdo con diferentes aspectos de la presente invención, el análisis de la muestra derivada de sangre comprende: determinar el nivel de IFN γ , determinar el nivel de un ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad, determinar el nivel de CXCL10 y/o determinar el nivel de CCL20.

20 En algunas realizaciones, un marcador de número o actividad de MDSC y/o número o actividad de linfocitos T reguladores se selecciona del grupo que consiste en: CXCL10, CCL20, número de MDSC, el porcentaje de MDSC como proporción de células vivas, el número de monocitos, el porcentaje de monocitos como proporción de células vivas, el porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos, el porcentaje de linfocitos T reguladores FoxP3 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ (Tregs) como proporción de células CD3 $^{+}$, la expresión de marcadores de células mieloides por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y la expresión de factores inhibidores inmunitarios por PBMC.

25 En algunas realizaciones, se selecciona un marcador de número o actividad de linfocitos T efectores del grupo que consiste en: IFN γ , número de linfocitos, número de linfocitos T, el porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos, el porcentaje de células CD8 $^{+}$ como proporción del número de linfocitos T, El porcentaje de células CD4 $^{+}$ como proporción del número de linfocitos T.

En algunas realizaciones, un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: ADN vírico, ARN vírico, proteínas víricas, proteína de envoltura vírica.

- 35 En algunas realizaciones, de acuerdo con diversos aspectos de la presente invención, el análisis de la muestra derivada de sangre comprende:

- 40
- (i) determinar la relación del nivel de IFN γ al nivel de CXCL10 y/o CCL20,
 - (ii) determinar la relación del nivel de un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de IFN γ y opcionalmente
 - (iii) determinar el vínculo entre la relación de (i) y la relación de (ii).

45 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende administrar a un paciente uno o más de: un agente para disminuir el número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), un agente para disminuir el número o actividad de linfocitos T reguladores, un agente para aumentar el número o actividad de linfocitos T efectores y/o un agente para reducir la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

50 En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona uno o más de: un agente para disminuir el número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), un agente para disminuir el número o actividad de linfocitos T reguladores, un agente para aumentar el número o actividad de linfocitos T efectores y/o un agente para reducir la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT).

55 En un aspecto relacionado adicional, la presente divulgación proporciona el uso de uno o más de: un agente para disminuir el número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), un agente para disminuir el número o actividad de linfocitos T reguladores, un agente para aumentar el número o actividad de linfocitos T efectores y/o un agente para reducir la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT).

60 En algunas realizaciones, de acuerdo con los diversos aspectos, el uno o más agentes se administran al paciente antes del tratamiento por ACT. En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran al paciente después de que se ha administrado una dosis de células al paciente.

65 En algunas realizaciones, de acuerdo con los diversos aspectos de la presente divulgación, la ACT comprende la

transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CTL). En algunas realizaciones, los CTL son específicos para un virus que provoca o agrava la enfermedad.

5 En algunas realizaciones, de acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención, la enfermedad es un cáncer.

En algunas realizaciones, los CTL son CTL específicos del virus de Epstein-Barr (EBV). En algunas realizaciones, los CTL son CTL específicos del virus del papiloma humano (VPH).

10 En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma nasofaríngeo (NPC), opcionalmente NPC positivo para EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de cuello del útero, opcionalmente cáncer de cuello de útero VPH positivo.

15 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un kit que comprende: medios para detectar un marcador de número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y/o un marcador de número o actividad de linfocitos T reguladores y medios para detectar un marcador de número o actividad de linfocitos T efectores, comprendiendo además, opcionalmente, medios para detectar un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

20 Los siguientes párrafos contienen declaraciones adicionales que describen la presente divulgación:
Los inventores demuestran que la medición de proteínas de suero periféricas, en pacientes con NPC positivo para EBV sometidos a terapia con CTL después de la primera inyección de inmunoterapia, puede identificar con precisión supervivientes a uno y dos años. La estratificación de pacientes en supervivientes a un año se puede lograr mediante la medición de eotaxina, MIP-3a (CCL20) e IFN γ , la conversión de los valores medidos en relaciones de expresión de IFN γ y representando gráficamente las relaciones entre sí. La estratificación de los pacientes en supervivientes a dos años se puede lograr mediante la medición del ADN del EBV, IP10 (CXCL10) e IFN γ , la conversión de los valores medidos en relaciones de expresión de IFN γ y representando gráficamente las relaciones entre sí.

25
30 Estos parámetros se pueden usar para identificar a los pacientes que se someterán a una terapia exitosa para el tratamiento de NPC positivo para EBV mediante la transferencia adoptiva de CTL específicos de EBV y así permitir el poder estadístico correcto del análisis posterior.

35 La medición de monocitos-MDSC también forma la base de un marcador pronóstico para la terapia con CTL. La medición de este tipo celular puede actuar como un marcador para la estratificación de pacientes. Estas medidas pueden tener uso en otras inmunoterapias con CTL contra agentes víricos.

Descripción

40 La presente invención se basa, en términos generales, en el hallazgo de que, teniendo en cuenta el análisis de la sangre de los pacientes en diferentes puntos temporales para determinar correlaciones del tamaño y/o actividad de las poblaciones de células efectoras e inmunorreguladoras, es posible predecir si un paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT).

45 Transferencia celular adoptiva

La presente divulgación se refiere al tratamiento de la enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT).

50 ACT implica la transferencia de células a un paciente, teniendo las células propiedades terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. Los linfocitos T transferidos al paciente pueden proceder del paciente (es decir, autólogas) o pueden proceder de un sujeto diferente (allogénicas).

55 Las células pueden ser células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células pueden ser linfocitos. En algunas realizaciones, las células pueden ser linfocitos T.

60 La transferencia celular adoptiva de linfocitos T generalmente implica la obtención de linfocitos T de un sujeto, generalmente al extraer una muestra de sangre de la cual se aíslan los linfocitos T. Después, los linfocitos T se tratan o alteran generalmente de alguna manera y después se administran al mismo sujeto o a un sujeto diferente. La transferencia adoptiva de linfocitos T generalmente tiene como objetivo proporcionar una población de linfocitos T con determinadas características deseadas a un sujeto, o aumentar la frecuencia de linfocitos T con tales características en ese sujeto. Se describe la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus, por ejemplo, in Cobbold et al., (2005) J. Exp. Med. 202: 379-386 y Rooney et al., (1998), Blood 92:1549-1555.

65 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la ACT comprende transferencia adoptiva de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD4+ o CD8+.

En algunas realizaciones, la ACT comprende la transferencia adoptiva de linfocitos T que son específicos para un agente infeccioso. En algunas realizaciones, los linfocitos T codifican o expresan un receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) que es capaz de reconocer (es decir, unirse a) una molécula derivada de un agente infeccioso, por ejemplo, en el contexto de presentación por una molécula de MHC. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente asociado con la enfermedad que a tratar por la ACT. En algunas realizaciones, el agente infeccioso provoca o agrava la enfermedad. El agente infeccioso puede ser, por ejemplo, un virus, bacteria, hongo, protozoo.

El virus para el cual los linfocitos T son específicos puede ser un virus de ADNbc (por ejemplo, adenovirus, herpesvirus, poxvirus), virus de ARNmc (por ejemplo, parvovirus), virus de ARNbc (p. ej., reovirus), virus de (+)ARNmc (p. ej., picornavirus, togavirus), virus de (-)ARNmc (p. ej., ortomixovirus, rabdovirus), virus de ARNmc-RT (por ejemplo, retrovirus) o virus de ADNbc-RT (por ejemplo, hepadnavirus). La presente divulgación contempla virus de las familias adenoviridae, herpesviridae, papillomaviridae, polyomaviridae, poxviridae, hepadnaviridae, parvoviridae, astroviridae, calciviridae, picornaviridae, coronavirusidae, flaviviridae, togaviridae, hepeviridae, retroviridae, orthomyxoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, filoviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae y reoviridae.

Los virus asociados con una enfermedad o trastorno son de particular interés. En consecuencia, se contemplan los siguientes virus: adenovirus, Virus del herpes simple de tipo 1, Virus del herpes simple de tipo 2, virus Varicela zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus humano, Virus herpes humano tipo 8, virus del papiloma humano, virus BK, virus JC, virus de la hepatitis B, parvovirus B19, Astrovirus Humano, virus de Norwalk, virus coxsackie, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, virus del síndrome respiratorio agudo severo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, Virus TBE, virus de la rubeola, virus de la hepatitis E, el virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus Lassa, Virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo, Virus Hantaan, virus del Ébola, virus de Marburg, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de parainfluenza, virus sincitial respiratorio, virus de la rabia, virus de la hepatitis D, rotavirus, orbivirus, coltivirus y virus banna.

En algunas realizaciones, el virus es el virus de Epstein-Barr (EBV). En consecuencia, en algunas realizaciones, la ACT es de linfocitos T específicos del EBV (por ejemplo, CTL específicos de EBV). En algunas realizaciones, el EBV es la cepa B95-8, P3HR-1, o un derivado de las mismas.

En algunas realizaciones, el virus es el virus del papiloma humano (VPH). En consecuencia, en algunas realizaciones, la ACT es de linfocitos T específicos de VPH (por ejemplo, CTL específicos de VPH). En algunas realizaciones, el VPH es VPH16 o VPH18 o un derivado de los mismos.

En algunas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T citotóxicos (CTL). Los CTL son capaces de llevar a cabo la muerte celular en células infectadas con un virus mediante la liberación de factores citotóxicos, incluyendo perforina, granzimas, granulisina, y/o induciendo apoptosis de la célula infectada al unir FAS en la célula infectada a través de FASL expresado en el linfocito T (descrito por ejemplo por Chavez-Galan et al., Cellular and Molecular Immunology (2009) 6(1): 15-25.). La citotoxicidad se puede investigar, por ejemplo, utilizando cualquiera de los métodos revisados en Zaritskaya et al., Expert Rev Vaccines (2011), 9(6):601-616. Un ejemplo de un ensayo para determinar la citotoxicidad de un linfocito T para una célula diana es el Ensayo de liberación de ⁵¹Cr, en el que las células diana se tratan con ⁵¹Cr, que ellas internalizan. La lisis de las células diana por los linfocitos T da como resultado la liberación de ⁵¹Cr radiactivo en el sobrenadante del cultivo celular, que se puede detectar.

En algunas realizaciones, la ACT es de CTL específicos de EBV. En algunas realizaciones, la ACT es de CTL específicos de VPH.

Enfermedad a tratar

La enfermedad a tratar por la ACT puede ser cualquier enfermedad para la cual la ACT sea un tratamiento terapéutico.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad que está asociada con (por ejemplo, provocada o agravada por) infección con un agente infeccioso, por ejemplo, un agente infeccioso descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad puede ser una enfermedad provocada o agravada por la infección con un virus, por ejemplo, un virus descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la enfermedad puede ser una enfermedad que está asociada con (por ejemplo, provocada o agravada por) infección con EBV. Las enfermedades asociadas y/o provocadas/agravadas por la infección por EBV se describen en Taylor et al., Ann Rev Immunol (2015) 33:787-821 e incluye carcinoma nasofaríngeo, mononucleosis infecciosa, Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, cáncer gástrico, esclerosis múltiple, granulomatosis linfomatoide, Síndrome de Gianotti-Crosti, eritema multiforme, úlceras genitales agudas, leucoplasia pilosa oral y trastornos relacionados con la agregación de alfa-sinucleína (p. ej., enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia de múltiples sistemas).

En algunas realizaciones, La enfermedad puede ser un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer positivo para EBV. Se puede determinar que un cáncer es un cáncer positivo para EBV por cualquier medio adecuado, que son bien conocidos por los expertos.

- 5 En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma nasofaríngeo. En algunas realizaciones, la enfermedad es carcinoma nasofaríngeo positivo para EBV.

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer hepático/cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer hepático/cáncer de hígado positivo para EBV.

- 10 En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer de pulmón positivo para EBV.

- 15 En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)). En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer gástrico positivo para EBV.

En algunas realizaciones, la enfermedad puede ser una enfermedad asociada con (por ejemplo, provocada o agravada por) infección con VPH.

- 20 El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN que establece infecciones productivas en los queratinocitos de la piel o las membranas mucosas. Hay más de 170 tipos de VPH, un subconjunto de estos tipos de VPH son cancerígenos, incluidos los tipos de transmisión sexual de alto riesgo que pueden convertirse en neoplasias genitales, incluyendo neoplasia intraepitelial de cuello de útero (CIN, por sus siglas en inglés), neoplasia intraepitelial vulvar (VIN, por sus siglas en inglés), neoplasia intraepitelial de pene (PIN, por sus siglas en inglés) y/o neoplasia intraepitelial anal (AIN, por sus siglas en inglés), por ejemplo. Los cánceres inducidos por VPH surgen cuando las secuencias víricas se integran en el ADN celular de las células hospedadoras. Algunos de los genes "tempranos" del VPH, tal como E6 y E7, actúan como oncogenes que promueven el crecimiento tumoral y la transformación maligna.

- 30 Las enfermedades asociadas con y/o provocadas/agravadas por la infección por VPH se describen en Doorbar et al. Rev Med Virol (2016); 25: 2-23, e incluyen *Condyloma acuminatum*, hiperplasia de epitelios focales, neoplasia de cuello de útero, cánceres anogenitales (p. ej., cáncer de cuello de útero (p. ej., neoplasia intraepitelial de cuello de útero (CIN), LSIL), p.ej. SCC queratinizante, p. ej. de la vulva (p. ej., neoplasia intraepitelial vulvar (VIN)), vagina, pene (neoplasia intraepitelial de pene (PIN)), ano (neoplasia intraepitelial anal (AIN))), papiloma oral y cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, de orofaringe (por ejemplo, carcinoma orofaríngeo), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés)).

- 40 En algunas realizaciones, La enfermedad puede ser un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer VPH positivo, por ejemplo, un VPH16 o VPH18 positivo. Se puede determinar que un cáncer es un cáncer VPH positivo por cualquier medio adecuado, que son bien conocidos por los expertos.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer anogenital. En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer anogenital VPH positivo. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de cuello de útero. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer de cuello de útero VPH positivo.

- 45 En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer de cabeza y cuello VPH positivo. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer orofaríngeo. En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer orofaríngeo VPH positivo. En algunas realizaciones, el cáncer es HNSCC. En algunas realizaciones, la enfermedad es un HNSCC VPH positivo.

- 50 El cáncer puede ser cualquier proliferación celular no deseada (o cualquier enfermedad que se manifieste por proliferación celular no deseada), neoplasia o tumor o mayor riesgo de o predisposición a la proliferación celular no deseada, neoplasia o tumor. El cáncer puede ser benigno o maligno y puede ser primario o secundario (metastásico). Una neoplasia o tumor puede ser cualquier crecimiento o proliferación anormal de células y puede estar ubicado en cualquier tejido. Ejemplos de tejidos incluyen la glándula suprarrenal, médula suprarrenal, ano, apéndice, vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, ciego, cerebelo del sistema nervioso central (incluido o excluido el cerebro), cuello uterino, colon, duodeno, endometrio, células epiteliales (p. ej., epitelios renales), vesícula biliar, esófago, células gliales, corazón, íleon, yeyuno, riñón, glándula lagrimal, laringe, hígado, pulmón, linfa, ganglio linfático, linfoblasto, maxilar superior, mediastino, mesenterio, miometrio, nasofaringe, omento, cavidad oral, ovario, páncreas, glándula parótida, sistema nervioso periférico, peritoneo, pleura, próstata, glándulas salivales, colon sigmoide, piel, intestino delgado, tejidos blandos, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroidea, lengua, amígdala, tráquea, útero, vulva, glóbulos blancos.

Muestras

- 65 La presente invención implica analizar una muestra para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia en el tratamiento por ACT.

- 5 La muestra se obtiene de un paciente y puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre o tejido. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o derivada de sangre. Es decir, la muestra puede ser sangre completa obtenida del paciente, o puede proceder de una cantidad de sangre obtenida del paciente. En algunas realizaciones, una muestra derivada de sangre puede ser una cantidad de plasma sanguíneo o suero derivada de sangre del sujeto. Esto puede comprender la porción líquida de la sangre obtenida después de la eliminación de coágulos de fibrina y células sanguíneas. La muestra puede ser una preparación de células obtenidas de la muestra de sangre (por ejemplo, células nucleadas, PBMC, etc.).
- 10 En algunas realizaciones, la muestra se ha obtenido del sujeto. En algunas realizaciones, el método se realiza *in vitro*. En algunas realizaciones, los métodos no se practican en el cuerpo humano o animal.
- 15 En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa para obtener una muestra del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra se puede obtener y después almacenar, por ejemplo a - 80 °C. La muestra almacenada se puede descongelar y analizar de acuerdo con los métodos de la divulgación.
- 20 En algunas realizaciones, se obtiene una muestra del paciente en un punto temporal predeterminado en relación con un curso de tratamiento propuesto o contemporáneo de la enfermedad. En algunas realizaciones, se obtienen muestras del paciente en más de un punto temporal en relación con un curso de tratamiento propuesto o contemporáneo de la enfermedad.
- 25 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente antes de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad. Una intervención terapéutica para tratar la enfermedad puede ser, por ejemplo, quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, cirugía, vacunación y/o terapia hormonal. Una intervención terapéutica para tratar la enfermedad puede ser ACT, por ejemplo, transferencia adoptiva de CTL, por ejemplo, CTL específicos para un agente infeccioso que provoca o agrava la enfermedad.
- 30 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente hasta 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año antes de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente no más de 1 año, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día antes de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad.
- 35 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente durante el curso de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente después del comienzo de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad.
- 40 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente hasta 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año después de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad (preferentemente después del comienzo, es decir, de la primera administración de, la intervención terapéutica). En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente no más de 1 año, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día después de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad (preferentemente después del comienzo, es decir, de la primera administración de, la intervención terapéutica).
- 45 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente en o después de completar el curso de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad, por ejemplo, al finalizar un curso de quimioterapia o radioterapia. En algunas realizaciones, la quimioterapia comprende el tratamiento con gemcitabina y/o carboplatino.
- 50 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente hasta 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año después de completar el curso de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente no más de 1 año, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día después de completar el curso de una intervención terapéutica para tratar la enfermedad.
- 55 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente antes de la administración de células al paciente. En algunas realizaciones particulares, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente antes del comienzo del tratamiento del paciente por ACT.
- 60 En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente después de que se hayan
- 65

administrado células al paciente. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido después de que se hayan administrado células a un paciente de acuerdo con un método de tratamiento de la enfermedad por ACT. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido después de que se hayan administrado células a un paciente de acuerdo con una etapa de exploración para determinar si el paciente sería un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

Como se usa en el presente documento, 'supervivencia a largo plazo' significa supervivencia en el tratamiento de la enfermedad por ACT durante un período mayor que 6 meses, por ejemplo, supervivencia durante un período mayor que 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 meses. En algunas realizaciones, la supervivencia a largo plazo puede clasificarse como supervivencia durante uno de al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, o al menos 26 meses. En algunas realizaciones, la supervivencia a largo plazo puede clasificarse como supervivencia durante al menos 24 meses.

La supervivencia 'en el tratamiento' por ACT significa supervivencia durante el curso de tratamiento mediante la administración de células de acuerdo con un método para tratar una enfermedad por ACT, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Un período de supervivencia de un paciente en el tratamiento con ACT puede medirse desde la fecha de administración, por ejemplo, primera administración, de una terapia al paciente, por ejemplo, la administración de una dosis de células por ACT.

La supervivencia "aumentada", como se usa en el presente documento, se refiere a la supervivencia durante un período de tiempo que es mayor (es decir, un período de tiempo más largo) en relación con un período de tiempo de supervivencia de referencia. El período de referencia puede ser, por ejemplo, el período de supervivencia promedio (por ejemplo, la media, la mediana o la moda) para un paciente en el tratamiento por ACT, o el período de supervivencia para un paciente que no es un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente después de la administración de una dosis única de células. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido después de la administración de más de una dosis de células, por ejemplo, después de que se haya administrado al paciente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis de células.

En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente dentro de un período de tiempo definido después de que se hayan administrado células al paciente. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente hasta 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año después de que se hayan administrado células al paciente. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente no más de 1 año, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día después de que se hayan administrado células al paciente.

En algunas realizaciones, la muestra se obtiene o se ha obtenido del paciente entre 1 día y 6 semanas, 1 día a 4 semanas, 5 días a 3 semanas, o 1 semana a 2 semanas después de que se hayan administrado células al paciente.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender el análisis de muestras obtenidas en diferentes puntos temporales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos pueden comprender el análisis de una muestra obtenida antes de la intervención terapéutica para tratar una enfermedad y el análisis después de la intervención terapéutica para tratar una enfermedad.

Análisis de marcadores pronósticos

Los métodos de la presente divulgación implican analizar una muestra para determinar uno o más marcadores pronósticos.

El método se puede realizar *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, el método no se realiza en el cuerpo humano o animal.

Los métodos comprenden analizar muestras derivadas de sangre para determinar una o más correlaciones del tamaño y/o actividad de las poblaciones de células inmunitarias efectoras y/o poblaciones de células inmunitarias inmunorreguladoras.

En algunas realizaciones, el análisis comprende determinar la presencia o nivel (es decir, la cantidad) de, un marcador dado. En algunas realizaciones, el análisis comprende medir el nivel del o cuantificar el marcador.

En algunas realizaciones, el método comprende determinar la presencia/ausencia o medir el nivel de (por ejemplo, la cantidad) de una molécula dada en una muestra. En algunas realizaciones, la molécula puede ser un ácido nucleico (p. ej. ADN, ARN), proteína, un péptido, carbohidrato (por ejemplo, un azúcar) o lípido.

5 En algunas realizaciones, el nivel de una proteína puede determinarse analizando la muestra derivada de sangre para determinar el ácido nucleico que codifica la proteína. En algunas realizaciones, El nivel de una proteína puede determinarse analizando la muestra derivada de sangre para la proteína o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el nivel de una proteína puede determinarse analizando la muestra derivada de sangre para determinar una correlación de la presencia/actividad de la proteína.

10 En algunas realizaciones, el número de un tipo celular dado puede determinarse analizando la muestra derivada de sangre para determinar la expresión de un marcador o una pluralidad de marcadores (por ejemplo, marcador(es) de ácido nucleico/proteína/péptido) para ese tipo celular. En algunas realizaciones, el número de un tipo celular dado puede determinarse analizando la muestra derivada de sangre para determinar una correlación de la presencia/actividad de ese tipo celular.

15 Los ácidos nucleicos pueden detectarse y/o medirse por diversos medios conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la expresión génica puede analizarse midiendo los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de nanocadenas, etc. El ARN/ADN de un patógeno se puede medir, por ejemplo, mediante qPCR.

20 Las proteínas pueden detectarse y/o medirse mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por métodos basados en anticuerpos, por ejemplo por transferencia western, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, citometría de flujo, ELISA, ELISPOT, métodos basados en indicadores, etc.

25 Una actividad dada, por ejemplo, una actividad asociada con un tipo celular dado, puede medirse, por ejemplo, mediante un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) para esa actividad. En algunas realizaciones, una actividad puede medirse analizando una muestra para determinar una correlación de la actividad, por ejemplo, para un ácido nucleico, proteína o fragmento de los mismos asociados con la actividad. A modo de ejemplo, el nivel de proteína IFN γ o ARN/ADN que codifica IFN γ es una correlación de la actividad de los linfocitos T efectores (por ejemplo, CTL).

30 En algunas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de, o determinar el número o la proporción de (que puede expresarse, por ejemplo, como un porcentaje), un tipo celular o clase de células dados en la muestra. Esto se puede lograr mediante varios métodos que incluyen el análisis de las células obtenidas de la muestra por citometría de flujo, por ejemplo, después del marcado de las células con anticuerpos específicos para marcadores que permiten la diferenciación de los tipos celulares.

35 Los inventores han identificado una pluralidad de marcadores que están asociados positiva o negativamente con la supervivencia de un paciente en el tratamiento de una enfermedad por ACT, resumida en la Tabla A.

40 Para evitar cualquier duda, una asociación 'positiva' en la Tabla A, a continuación, indica que un número/nivel/porcentaje superior está asociado con supervivencia aumentada y/o a largo plazo de un paciente en el tratamiento de la enfermedad por ACT. Una asociación 'negativa' en la Tabla A, a continuación, indica que un número/nivel/porcentaje inferior está asociado con supervivencia aumentada y/o a largo plazo de un paciente en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

Tabla A:

Marcador	Asociación positiva/negativa con la supervivencia en el tratamiento de una enfermedad por ACT
Número de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC)	Negativa
Actividad de MDSC	Negativa
Número de linfocitos T reguladores	Negativa
Actividad de linfocitos T reguladores	Negativa
Numero de linfocitos	Positiva
Porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos	Positiva
Número de linfocitos T efectores	Positiva
Actividad de linfocitos T efectores	Positiva
Cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad	Negativa

45

(continuación)

CXCL10	Negativa
CCL20	Negativa
CCL22	Negativa
IL-10	Negativa
IL-8	Negativa
VEGF	Negativa
Ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad	Negativa
IFN γ	Positiva
Número de leucocitos	Positiva
Numero de neutrófilos	Negativa
Porcentaje de neutrófilos como proporción del número de leucocitos	Negativa
Numero de monocitos	Negativa
Porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos	Negativa
Porcentaje de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T	Positiva
Porcentaje de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T	Positiva
Porcentaje de monocitos como proporción de células vivas	Negativa
Porcentaje de MDSC como proporción de células vivas	Negativa
Porcentaje de linfocitos T reguladores (Tregs) FoxP3+ CTLA4+ como proporción de células CD3+	Negativa
Expresión de marcadores de células mieloides por células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	Negativa
Expresión de factores inhibidores inmunitarios por PBMC	Negativa

En consecuencia, en algunas realizaciones de la presente divulgación, el uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT comprenden:

- 5 (a) un marcador de número de MDSC;
- (b) un marcador de actividad de MDSC;
- 10 (c) un marcador de número de linfocitos T reguladores;
- (d) un marcador de actividad de linfocitos T reguladores;
- (e) un marcador de número de linfocitos;
- 15 (f) el porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos;
- (g) un marcador de número de linfocitos T efectores;
- 20 (h) un marcador de actividad de linfocitos T efectores;
- (i) un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;

- (j) el nivel de CXCL10;
- (k) el nivel de CCL20;
- 5 (l) el nivel de CCL22;
- (m) el nivel de IL-10;
- (n) el nivel de IL-8;
- 10 (o) el nivel de VEGF;
- (p) el nivel de ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- 15 (q) el nivel de IFN γ ;
- (r) el número de leucocitos;
- (s) el número de neutrófilos;
- 20 (t) el porcentaje de neutrófilos como proporción del número de leucocitos;
- (u) el número de monocitos;
- 25 (v) el porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos;
- (w) el porcentaje de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T;
- (x) el porcentaje de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T;
- 30 (y) el porcentaje de monocitos como proporción de células vivas;
- (z) el porcentaje de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) como proporción de células vivas;
- 35 (aa) el porcentaje de linfocitos T reguladores (Tregs) FoxP3+ CTLA4+ como proporción de células CD3+;
- (bb) el nivel de expresión de uno o más marcadores de células mieloides por células mononucleares de sangre periférica (PBMC); y/o
- 40 (cc) el nivel de expresión de uno o más factores inhibidores inmunitarios por las PBMC.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden analizar una muestra derivada de sangre obtenida de un paciente para determinar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19 marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT.

45 En algunas realizaciones de la presente divulgación, analizar la muestra derivada de sangre comprende uno o más de:

- (a) determinar el número de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC);
- 50 (b) determinar el nivel de actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC);
- (c) determinar el número de linfocitos T reguladores;
- (d) determinar el nivel de actividad de linfocitos T reguladores;
- (e) determinar el número de linfocitos;
- (f) determinar el porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos;
- 55 (g) determinar el número de linfocitos T efectores;
- (h) determinar el nivel de actividad de linfocitos T efectores;
- (i) determinar la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- (j) determinar el nivel de CXCL10;
- (k) determinar el nivel de CCL20;
- 60 (l) determinar el nivel de CCL22;
- (m) determinar el nivel de IL-10;
- (n) determinar el nivel de IL-8;
- (o) determinar el nivel de VEGF;
- (p) determinar el nivel de ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- 65 (q) determinar el nivel de IFN γ ;
- (r) determinar el número de leucocitos;

- (s) determinar el número de neutrófilos;
- (t) determinar el porcentaje de neutrófilos como proporción del número de leucocitos;
- (u) determinar el número de monocitos;
- (v) determinar el porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos;
- 5 (w) determinar el porcentaje de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T;
- (x) determinar el porcentaje de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T;
- (y) determinar el porcentaje de monocitos como proporción de células vivas;
- (z) determinar el porcentaje de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) como proporción de células vivas;
- 10 (aa) determinar el porcentaje de linfocitos T reguladores (Tregs) FoxP3+ CTLA4+ como proporción de células CD3+;
- (bb) determinar el nivel de expresión de uno o más marcadores de células mieloides por células mononucleares de sangre periférica (PBMC); y/o
- (cc) determinar el nivel de expresión de uno o más factores inhibidores inmunitarios por PBMC.

15 En algunas realizaciones, el uno o más marcadores pronósticos comprenden: un marcador de número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), un marcador de número o actividad de linfocitos T reguladores y/o un marcador de número o actividad de linfocitos T efectoras. En algunas realizaciones, el uno o más marcadores pronósticos comprenden: un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

20 El número o actividad de MDSC puede determinarse mediante el análisis de una o más propiedades de MDSC descritas, por ejemplo, in Greten et al., *Int. Immunopharmacol* (2011) 11:802-807 y Gabrilovich y Nagaraj, *Nat Rev Immunol* (2009) 9:162-174. En algunas realizaciones, las MDSC pueden identificarse por referencia a uno o más de los siguientes marcadores de superficie: CD33+, CD11b+, CD14+, CD16-, CD15-, HLADR^{low}.

25 En algunas realizaciones, un marcador de número o actividad de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), o un marcador de número o actividad de linfocitos T reguladores, se puede seleccionar del grupo que consiste en: CXCL10, CCL20, CCL22, IL-10, IL-8, número de MDSC, el porcentaje de MDSC como proporción de células vivas, el número de monocitos, el porcentaje de monocitos como proporción de células vivas, el porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos, expresión de marcadores de células mieloides por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), expresión de factores inhibidores inmunitarios por PBMC y el porcentaje de linfocitos T reguladores (Treg) FoxP3+ CTLA4+ como proporción de células CD3+.

35 En algunas realizaciones, un marcador de células mieloides y/o un factor/marcador inhibidor inmunitario de acuerdo con la presente divulgación se puede seleccionar de la Tabla 3 (Figura 9). En algunas realizaciones, se puede seleccionar el marcador de células mieloides y/o un factor/marcador inhibidor inmunitario de uno o más de CD68, LILRA5, S100A8, S100A9, S100A12, LILRB4, MSR1, CXCL16, CLEC7A y TREM1. En algunas realizaciones, se puede seleccionar el marcador de células mieloides y/o un factor/marcador inhibidor inmunitario de uno o más de CD68, LILRA5, S100A8 y S100A9.

40 En algunas realizaciones, se puede seleccionar un marcador de células mieloides y/o un factor/marcador inhibidor inmunitario de uno o más de NLRP3, PD-L1 y STAT4.

45 En algunas realizaciones, se puede seleccionar un marcador de células mieloides y/o un factor/marcador inhibidor inmunitario de acuerdo con la presente divulgación de uno o más de IL-10, CCL22, IL-1L-8, VEGF y CCL20.

50 El número o actividad de los linfocitos T se puede determinar mediante el análisis de una o más propiedades de los linfocitos T que son bien conocidas por los expertos. Los marcadores de linfocitos T incluyen polipéptidos CD3 (por ejemplo, CD3γ CD3ε CD3ζ o CD3δ), polipéptidos de TCR (TCRα o TCRβ), CD27, CD28, CD4 y CD8.

55 Como se usa en el presente documento, un "linfocito T regulador" se refiere a un linfocito T que tiene actividad inmunomoduladora. Los linfocitos T reguladores (Tregs) generalmente suprimen/regulan negativamente la inducción, proliferación y/o función de los linfocitos T efectoras. El fenotipo y la función de Treg se revisa por Vignali et al., *Nat Rev Immunol* (2008) 8(7):523-532. Los marcadores de Tregs incluyen la expresión de FoxP3 y CTLA4.

60 Como se usa en el presente documento, un "linfocito T efector" se refiere a linfocitos T que tienen una función efectora. Ejemplos de linfocitos T efectoras (Teffs) incluyen linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T de memoria. El fenotipo y la función de Teff se revisan en Janeway, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*; 5ª Ed. 2001, en el capítulo 8.

65 En algunas realizaciones, se puede seleccionar un marcador de número o actividad de linfocitos T efectoras del grupo que consiste en: IFNγ, número de linfocitos, número de linfocitos T, el porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos, número de linfocitos T efectoras, el porcentaje de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T y el porcentaje de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T.

La cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad se puede determinar mediante análisis, por

ejemplo, de la cantidad de un marcador del agente infeccioso. Por ejemplo, un marcador del agente infeccioso puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) del agente infeccioso o una proteína/péptido del agente infeccioso. En algunas realizaciones, un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: ADN vírico (por ejemplo, ADN genómico vírico), ARN vírico (por ejemplo, ARN genómico vírico), proteína vírica y proteína de envoltura vírica.

En algunas realizaciones, el análisis de la muestra derivada de sangre comprende: determinar el nivel de IFN γ , determinar el nivel de un ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad, determinar el nivel de CXCL10 y/o determinar el nivel de CCL20.

En algunas realizaciones, analizar la muestra derivada de sangre comprende determinar una o más relaciones entre los niveles determinados de marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT. Los niveles y/o las relaciones pueden transformarse (por ejemplo, transformados en log₁₀ o log_e) para ayudar al análisis.

En algunas realizaciones, el análisis comprende determinar la relación del nivel de un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de uno o más marcadores de número o actividad de MDSC y/o uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T reguladores y/o determinar la relación del nivel de un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T efectores.

En algunas realizaciones, el análisis comprende determinar la relación del nivel de una o más moléculas derivadas de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de uno o más factores producidos por MDSC y/o uno o más factores producidos por linfocitos T reguladores y/o determinar la relación del nivel de una o más moléculas derivadas de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de uno o más factores producidos por los linfocitos T efectores.

En algunas realizaciones, el análisis de la muestra derivada de sangre comprende: determinar la relación del nivel de CCL20 al nivel de IFN γ , determinar la relación del nivel de CXCL10 al nivel de IFN γ y/o determinar la relación del nivel de un ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad al nivel de IFN γ .

En algunas realizaciones de los métodos de la presente divulgación, analizar la muestra derivada de sangre comprende comparar el nivel/número/porcentaje determinado de uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo con los valores de referencia para el marcador. En algunas realizaciones, el valor de referencia es un valor para ese marcador que es indicativo de supervivencia a largo plazo o de no supervivencia de un paciente en el tratamiento de una enfermedad por ACT.

En algunas realizaciones, el valor de referencia es el valor para ese marcador en una muestra comparable obtenida de un sujeto de interés. En algunas realizaciones, el sujeto es un individuo de control sano. En algunas realizaciones, el sujeto es paciente que tiene la enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que sobrevive durante más tiempo que la cantidad de tiempo promedio (p. ej., Mediana o media, modo) en el tratamiento de la enfermedad por ACT (es decir, un paciente que sobrevive durante un período de tiempo más largo que la supervivencia promedio de un paciente en el tratamiento de la enfermedad por ACT). En algunas realizaciones, el sujeto es un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que sobrevive durante menos tiempo que la cantidad de tiempo promedio en el tratamiento de la enfermedad por ACT (es decir, un paciente que sobrevive durante un período de tiempo más corto que la supervivencia promedio de un paciente en el tratamiento de la enfermedad por ACT). En algunas realizaciones, el sujeto no es un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

En algunas realizaciones, el valor puede ser un valor promedio (por ejemplo, media, mediana, modo) para el marcador para una pluralidad de sujetos, por ejemplo, una pluralidad de temas de acuerdo con una realización del párrafo anterior.

En algunas realizaciones, la determinación de uno o más de los siguientes en relación con un valor de referencia para un paciente que sobrevive durante menos tiempo que la cantidad de tiempo promedio en el tratamiento de la enfermedad por ACT, un paciente que no es un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT, o un paciente que sobrevive durante la cantidad de tiempo promedio en el tratamiento de la enfermedad por ACT puede predecir supervivencia aumentada y/o a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT:

- (1) menor número de MDSC;
- (2) menor actividad de MDSC;
- (3) menor número de linfocitos T reguladores;
- (4) menor actividad de linfocitos T reguladores;
- (5) mayor número de linfocitos;
- (6) mayor porcentaje de linfocitos como proporción del número de leucocitos;
- (7) mayor número de linfocitos T efectores;

- (8) mayor actividad de linfocitos T efectores;
- (9) menor cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- (10) menor CXCL10;
- (11) menor CCL20;
- 5 (12) menor CCL22;
- (13) menor IL-10;
- (14) menor IL-8;
- (15) menor VEGF;
- (16) menor cantidad de ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- 10 (17) mayor IFN γ ;
- (18) mayor número de leucocitos;
- (19) menor número de neutrófilos;
- (20) menor porcentaje de neutrófilos como proporción del número de leucocitos;
- (21) menor número de monocitos;
- 15 (22) menor porcentaje de monocitos como proporción del número de leucocitos;
- (23) mayor porcentaje de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T;
- (24) mayor porcentaje de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T;
- (25) menor porcentaje de monocitos como proporción del número de células vivas;
- (26) menor porcentaje de MDSC como proporción del número de células vivas;
- 20 (27) menor porcentaje de Tregs FoxP3+ CTLA4+ como proporción del número de células CD3+;
- (28) menor nivel de expresión de uno o más marcadores de células mieloides por PBMC; y/o
- (29) menor nivel de expresión de uno o más factores inhibidores inmunitarios por parte de PBMC.

25 En algunas realizaciones, la determinación de uno o más de los siguientes en relación con un valor de referencia para un paciente que sobrevive durante más tiempo que la cantidad de tiempo promedio en el tratamiento de la enfermedad por ACT, o un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT, puede predecir supervivencia aumentada y/o a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT:

- (1) número comparable o menor de MDSC;
- 30 (2) actividad comparable o menor de MDSC;
- (3) número comparable o menor de linfocitos T reguladores;
- (4) actividad comparable o menor de linfocitos T reguladores;
- (5) número comparable o mayor de linfocitos;
- (6) número comparable o mayor de linfocitos como proporción del número de leucocitos;
- 35 (7) número comparable o mayor de linfocitos T efectores;
- (8) actividad comparable o mayor de linfocitos T efectores;
- (9) cantidad comparable o menor de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- (10) CXCL10 comparable o menor;
- (11) CCL20 comparable o menor;
- 40 (12) CCL22 comparable o menor;
- (13) IL-10 comparable o menor;
- (14) IL-8 comparable o menor;
- (15) VEGF comparable o menor;
- (16) cantidad comparable o menor de ácido nucleico de un agente infeccioso asociado con la enfermedad;
- 45 (17) IFN γ comparable o mayor;
- (18) número comparable o mayor de leucocitos;
- (19) número comparable o menor de neutrófilos;
- (20) porcentaje comparable o menor de neutrófilos como proporción del número de leucocitos;
- (21) número comparable o menor de monocitos;
- 50 (22) porcentaje comparable o menor de monocitos como proporción del número de leucocitos;
- (23) porcentaje comparable o mayor de células CD8+ como proporción del número de linfocitos T;
- (24) porcentaje comparable o mayor de células CD4+ como proporción del número de linfocitos T;
- (25) porcentaje comparable o menor de monocitos como proporción del número de células vivas;
- (26) porcentaje comparable o menor de MDSC como proporción del número de células vivas;
- 55 (27) porcentaje comparable o menor de Tregs FoxP3+ CTLA4+ como proporción del número de células CD3+;
- (28) nivel de expresión comparable o menor de uno o más marcadores de células mieloides por PBMC; y/o
- (29) nivel de expresión comparable o menor de uno o más factores inhibidores inmunitarios por PBMC.

60 En algunas realizaciones, la muestra para dicho análisis se obtiene/ se ha obtenido de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células. En algunas realizaciones, la muestra para dicho análisis se obtiene/ se ha obtenido de un paciente antes de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia y/o ACT) para tratar la enfermedad. En algunas realizaciones, la muestra para dicho análisis se obtiene/ se ha obtenido de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y

65 antes de la administración de células al paciente.

ES 2 795 440 T3

5 En algunas realizaciones, un nivel/número/porcentaje menor en comparación con un valor de referencia es uno de menos de 1 vez, menos de 0,95 veces, menos de 0,9 veces, menos de 0,85 veces, menos de 0,8 veces, menos de 0,75 veces, menos de 0,7 veces, menos de 0,65 veces, menos de 0,6 veces, menos de 0,55 veces, menos de 0,5 veces, menos de 0,45 veces, menos de 0,4 veces, menos de 0,35 veces, menos de 0,3 veces, menos de 0,25 veces, menos de 0,2 menos de 0,15 veces, o menos de 0,1 veces el nivel/número/porcentaje del valor de referencia.

10 En algunas realizaciones, un nivel/número/porcentaje mayor en comparación con un valor de referencia es uno de más de 1 vez, más de 1,1 veces, más de 1,2 veces, más de 1,3 veces, más de 1,4 veces, más de 1,5 veces, más de 1,6 veces, más de 1,7 veces, más de 1,8 veces, más de 1,9 veces, más de 2 veces, más de 2,1 veces, más de 2,2 veces, más de 2,3 veces, más de 2,4 veces, más de 2,5 veces, más de 2,6 veces, más de 2,7 veces, más de 2,8 veces, más de 2,9 veces, más de 3 veces, más de 3,1 veces, más de 3,2 veces, más de 3,3 veces, más de 3,4 veces, más de 3,5 veces, más de 3,6 veces, más de 3,7 veces, más de 3,8 veces, más de 3,9 veces, más de 4 veces, más de 4,1 veces, más de 4,2 veces, más de 4,3 veces, más de 4,4 veces, más de 4,5 veces, más de 4,6 veces, más de 4,7 veces, más de 4,8 veces, más de 4,9 veces o más de 5 veces el nivel/número/porcentaje del valor de referencia.

20 En algunas realizaciones, un número de leucocitos de uno de aproximadamente $7 \times 10^9/l$, $6,5 \times 10^9/l$, $6 \times 10^9/l$, $5,5 \times 10^9/l$, $5 \times 10^9/l$, $4,5 \times 10^9/l$, $4 \times 10^9/l$ o inferior predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo. En algunas realizaciones, la muestra para dicho análisis se obtiene/ se ha obtenido de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

25 En algunas realizaciones, un porcentaje de neutrófilos como proporción de leucocitos de uno de aproximadamente el 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40% o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

30 En algunas realizaciones, un porcentaje de linfocitos como proporción de leucocitos de uno de aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40% o superior predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

35 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de IFN γ de uno de aproximadamente 0,25 pg/ml, 0,3 pg/ml, 0,35 pg/ml, 0,4 pg/ml, 0,45 pg/ml, 0,5 pg/ml, 0,55 pg/ml, 0,6 pg/ml, 0,65 pg/ml, 0,7 pg/ml, 0,75 pg/ml, 0,8 pg/ml, 0,85 pg/ml, 0,9 pg/ml, 0,95 pg/ml, o 1,0 pg/ml o superior predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

40 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de ADN de EBV de uno de aproximadamente 4,0 pg/ml, 3,5 pg/ml, 3,0 pg/ml, 2,5 pg/ml, 2,0 pg/ml, 1,5 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente antes de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia y/o ACT) para tratar la enfermedad, o una muestra obtenida de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y antes a la administración de células al paciente.

50 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de CCL20 de uno de aproximadamente 1,0 pg/ml, 0,9 pg/ml, 0,8 pg/ml, 0,7 pg/ml, 0,6 pg/ml, 0,5 pg/ml, 0,4 pg/ml, 0,3 pg/ml, 0,2 pg/ml, 0,1 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

55 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de CCL22 de uno de aproximadamente 2,0 pg/ml, 1,9 pg/ml, 1,8 pg/ml, 1,7 pg/ml, 1,6 pg/ml, 1,5 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

60 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de IL-10 de uno de aproximadamente 0,5 pg/ml, 0,4 pg/ml, 0,3 pg/ml, 0,2 pg/ml, 0,1 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

65 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de IL-8 de uno de aproximadamente 1,0 pg/ml, 0,9 pg/ml, 0,8 pg/ml, 0,7 pg/ml, 0,6 pg/ml, 0,5 pg/ml, 0,4 pg/ml, 0,3 pg/ml, 0,2 pg/ml, 0,1 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

En algunas realizaciones, un nivel transformado en log10 de VEGF de uno de aproximadamente 2,0 pg/ml, 1,9

ES 2 795 440 T3

pg/ml, 1,8 pg/ml, 1,7 pg/ml, 1,6 pg/ml, 1,5 pg/ml, 1,4 pg/ml, 1,3 pg/ml, 1,2 pg/ml, 1,1 pg/ml, 1,0 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

5 En algunas realizaciones, un nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 de uno de aproximadamente 2,6 pg/ml, 2,55 pg/ml, 2,5 pg/ml, 2,45 pg/ml, 2,4 pg/ml, 2,35 pg/ml, 2,3 pg/ml, 2,25 pg/ml, 2,2 pg/ml, 2,15 pg/ml, 2,1 pg/ml, 2,05 pg/ml, 2,0 pg/ml o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

10 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de ADN de EBV al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 o 2,0 predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

15 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de ADN de EBV al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de menos de aproximadamente 3,0 predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

20 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de CCL20 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

25 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 o 1,0 predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

30 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de menos de aproximadamente 2,5 predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

35 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de ADN de EBV al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 o 2,0 y una relación del nivel transformado en log₁₀ de CCL20 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 predicen supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

40 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de ADN de EBV al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 o 2,0 y una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de uno de menos de aproximadamente 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 o 1,0 predicen supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra

45 obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

50 En algunas realizaciones, una relación del nivel transformado en log₁₀ de ADN de EBV al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de menos de aproximadamente 3,0 y una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ de menos de aproximadamente 2,5 predicen supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

55 En algunas realizaciones, un recuento normalizado del número de copias de ARN CD68 (por ejemplo, determinado por análisis de nanocadenas) de aproximadamente 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90 o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

60 En algunas realizaciones, un recuento normalizado del número de copias de ARN S100A8 (por ejemplo, determinado por análisis de nanocadenas) de aproximadamente 3500, 3250, 3000, 2750, 2500, 2250, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000 o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

65 En algunas realizaciones, un recuento normalizado del número de copias de ARN S100A9 (por ejemplo, determinado por análisis de nanocadenas) de aproximadamente 4500, 4250, 4000, 3750, 3500, 3250, 3000, 2750, 2500, 2250, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000 o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo,

en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

5 En algunas realizaciones, un recuento normalizado del número de copias de ARN LILR5A (p. ej., determinado por análisis de nanocadenas) de aproximadamente 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30 o menor predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

10 En algunas realizaciones, un porcentaje de monocitos como proporción de leucocitos de uno de menos del 15%, 14 %, 13%, o 12% predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra de un paciente antes de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia y/o ACT) para tratar la enfermedad, o una muestra obtenida de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y antes a la administración de células al paciente.

15 En algunas realizaciones, un porcentaje de monocitos como proporción de células vivas de uno de menos del 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, o 45 % predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente antes de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia y/o ACT) para tratar la enfermedad, o una muestra obtenida de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y antes a la administración de células al paciente.

20 En algunas realizaciones, un porcentaje de monocitos como proporción de células vivas de uno de menos del 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, o 35 % predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

25 En algunas realizaciones, un porcentaje de neutrófilos como proporción de leucocitos de uno de menos del 80%, 75 %, 70 %, o 65 % predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

30 En algunas realizaciones, un número de linfocitos como proporción del número de leucocitos de uno de mayor que el 15%, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y antes de la administración de células al paciente, o una muestra obtenida de un paciente después de que se haya administrado una dosis (por ejemplo, una primera dosis) de células al paciente por ACT, por ejemplo, dentro de las 4 semanas de la administración de las células.

35 En algunas realizaciones, un porcentaje de MDSC como proporción de células vivas de uno de menos del 15%, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6% o 5% predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente después de completar una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) para tratar la enfermedad y antes de la administración de células al paciente.

40 En algunas realizaciones, un porcentaje de Tregs FoxP3+, CTLA4+ como proporción de células CD3+ de uno de menos del 6%, 5,5 %, 5 %, 4,5 %, 4 %, 3,5 %, o 3 % predice supervivencia aumentada y/o a largo plazo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente antes de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia y/o ACT) para tratar la enfermedad.

50 Predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento por ACT

Los métodos de la presente invención implican predecir, basándose en el análisis de una muestra derivada de sangre obtenida del paciente, si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

55 En algunas realizaciones, se predice que el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT basándose en la determinación de uno o más predictores positivos de supervivencia aumentada y/o a largo plazo como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se predice que el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT basándose en la determinación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más predictores positivos de supervivencia aumentada y/o a largo plazo. En algunas realizaciones, se predice que el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT basándose en la determinación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 predictores positivos de supervivencia aumentada y/o a largo plazo.

65 Tratamiento de una enfermedad por ACT

La presente invención proporciona métodos para tratar a un paciente por ACT, una forma de inmunoterapia. ACT

5 puede implicar aislar al menos una célula de un sujeto; tratar la al menos una célula, y; administrar la célula tratada a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto del que se aísla la célula es el sujeto administrado con la célula tratada (es decir, la transferencia adoptiva es de células autólogas). En algunas realizaciones, el sujeto del que se aísla la célula es un sujeto diferente al sujeto al que se administra la célula tratada (es decir, la transferencia adoptiva es de linfocitos T alogénicos).

10 En algunas realizaciones, el tratamiento consiste en aumentar el número de células. En algunas realizaciones, el tratamiento consiste en generar o aumentar el número de un tipo celular que es eficaz para tratar la enfermedad. Por ejemplo, cuando la enfermedad es una enfermedad provocada o agravada por una infección con EBV, el tratamiento de las células puede ser generar o aumentar el número de células específicas de EBV (por ejemplo, linfocitos T específicos de EBV, por ejemplo, CTL específicos de EBV), que se introducen después en el paciente. El tratamiento puede llevarse a cabo *in vitro*. El tratamiento puede comprender la estimulación con células infectadas con EBV, por ejemplo, células de línea celular linfoblastoide (LCL, por sus siglas en inglés) transformada por EBV.

15 Cuando la enfermedad es una enfermedad provocada o agravada por una infección con el VPH, el tratamiento de las células puede ser generar o aumentar el número de células específicas de VPH (por ejemplo, linfocitos T específicos de VPH, por ejemplo, CTL específicos de VPH), que se introducen después en el paciente. El tratamiento puede llevarse a cabo *in vitro*. El tratamiento puede comprender la estimulación con células infectadas con VPH.

20 Los expertos en la materia conocen bien los métodos para aumentar los linfocitos T específicos de virus. Se pueden determinar fácilmente las condiciones de cultivo típicas (es decir, medios de cultivo celular, aditivos, temperatura, atmósfera gaseosa), relaciones de células que responden a células estimuladoras, períodos de cultivo para las etapas de estimulación, etc., por referencia, por ejemplo, a Bollard et al., J Exp Med (2004), 200(12): 1623-1633 y Straathof et al., Blood (2005), 105(5): 1898-1904.

25 En algunas realizaciones, el método puede comprender una o más de las siguientes etapas: tomar una muestra de sangre de un sujeto; aislar y/o aumentar al menos un linfocito T de la muestra de sangre; cultivar al menos un linfocito T en cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*; estimular al menos un linfocito T; recoger al menos un linfocito T; mezclar el linfocito T modificado con un adyuvante, diluyente o vehículo; administrar al menos un linfocito T a un sujeto.

30 El sujeto a tratar de acuerdo con la invención puede ser cualquier animal o ser humano. El sujeto es preferentemente mamífero, más preferentemente ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano, pero es más preferentemente ser humano. El sujeto puede ser hombre o mujer. El sujeto puede ser un paciente. Un sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección que requiere tratamiento, puede sospecharse que tiene una enfermedad o afección de este tipo, o puede estar en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección.

35 La administración de células es preferentemente en una cantidad "terapéuticamente eficaz" o "profilácticamente eficaz", siendo esta suficiente para generar beneficio al sujeto. La cantidad real administrada y la velocidad y el curso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o trastorno. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos y normalmente se tiene en cuenta la enfermedad/trastorno a tratar, la condición del sujeto individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Se describe la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus, por ejemplo, in Cobbold et al., (2005) J. Exp. Med. 202: 379-386 y Rooney et al., (1998), Blood 92:1549-1555.

40 En algunas realizaciones, el método comprende una intervención terapéutica o profiláctica adicional. En algunas realizaciones, la intervención terapéutica o profiláctica se selecciona de quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, cirugía, vacunación y/o terapia hormonal. En algunas realizaciones, la intervención terapéutica o profiláctica adicional se realiza simultáneamente con el tratamiento de la enfermedad por ACT y/o puede realizarse antes y/o después del tratamiento de la enfermedad por ACT.

45 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente por transferencia celular adoptiva (ACT), comprendiendo el método:

- 50
- (i) administrar una dosis de células a un paciente;
 - (ii) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
 - 60 (iii) basándose en el análisis de la etapa (ii), predecir la supervivencia a largo plazo del paciente mediante el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
 - (iv) administrar una o más dosis adicionales de células al paciente.

65 En algunas realizaciones, el análisis/predicción de si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT influye en la decisión de si tratar o continuar tratando, la enfermedad por ACT.

En algunas realizaciones, el método se utiliza para estratificar pacientes para los que se predice que el tratamiento por ACT se asocia con la supervivencia a largo plazo, en comparación con los pacientes para los que no se predice que el tratamiento por ACT se asocie con la supervivencia a largo plazo.

5 Es decir, la presente invención puede emplearse para la identificación y/o selección de (i) una subpoblación de pacientes que padecen una enfermedad a tratar por ACT en la que se predice que el tratamiento por ACT se asocia con una supervivencia a largo plazo, y/o (ii) una subpoblación de pacientes que padecen una enfermedad a tratar por ACT en la que se predice que el tratamiento por ACT no se asocia con la supervivencia a largo plazo.

10 En consecuencia, en un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende:

(i) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
15 (ii) basándose en el análisis de la etapa (i), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
(iii) seleccionar un paciente que se prevé que sea un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT para el tratamiento de la enfermedad por ACT.

20 En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa inicial de administrar una dosis de células a un paciente. La dosis de células puede administrarse de acuerdo con un método de tratamiento de la enfermedad por ACT, o puede administrarse como una etapa de exploración inicial para evaluar la respuesta probable del paciente al tratamiento de la enfermedad por ACT.

25 En un aspecto relacionado adicional, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento continuado de una enfermedad por transferencia celular adoptiva (ACT), que comprende:

(i) administrar una dosis de células a un paciente de acuerdo con el tratamiento de una enfermedad por ACT;
30 (ii) analizar una muestra derivada de sangre obtenida del paciente para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT;
(iii) basándose en el análisis de la etapa (ii), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT; y
(iv) seleccionar un paciente que se prevé que sea un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT para tratamiento continuado de la enfermedad por ACT.

35 El método puede comprender además la etapa (v) administrar una o más dosis de células a pacientes seleccionados en (iv).

Mejora de la supervivencia a largo plazo de un paciente en el tratamiento de la enfermedad por ACT

40 La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento de una enfermedad por ACT y/o métodos para potenciar la eficacia del tratamiento de una enfermedad por ACT, que comprende administrar a un paciente uno o más agentes para modificar el nivel de uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT.

45 En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar uno o más agentes para disminuir el número o actividad de MDSC y/o disminuir el número o actividad de linfocitos T reguladores, para aumentar el número o actividad de linfocitos T efectoros y/o para reducir la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

50 En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran a un paciente después del análisis de acuerdo con un método para predecir si un paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT, un método para tratar a un paciente por ACT, o un método para seleccionar a un paciente para el tratamiento de una enfermedad por ACT como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran basándose en la predicción de que el paciente no será un superviviente a largo plazo en el
55 tratamiento de la enfermedad por ACT.

60 En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran antes de la administración de una dosis de células al paciente. En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran después de que se haya administrado una dosis de células al paciente. En algunas realizaciones, el uno o más agentes se administran simultáneamente con el tratamiento de la enfermedad por ACT.

65 La presente divulgación también proporciona un agente para su uso en un método descrito en el presente documento, uso de un agente en la fabricación de un medicamento para su uso en un método descrito en el presente documento y el uso de un agente en un método descrito en el presente documento.

El experto es capaz de identificar agentes para disminuir el número o actividad de MDSC y/o disminuir el número o

actividad de linfocitos T reguladores, para aumentar el número o actividad de linfocitos T efectores y/o para reducir la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

5 En algunas realizaciones, el efecto capaz del agente redujo o aumentó la expresión y/o función de genes/proteínas influyendo en la transcripción, procesamiento de ARNm (por ejemplo, empalme), estabilidad de ARNm, traducción, procesamiento postraduccion, estabilidad de proteínas, degradación de proteínas y/o función/actividad de proteínas. Ejemplos de agentes incluyen moléculas de unión a antígeno antagonistas/agonistas, ácidos nucleicos (p. ej., ARNip, ARNhc), inhibidores/agonistas de moléculas pequeñas, etc.

10 Kits

La presente divulgación también proporciona kits para su uso de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, el kit puede ser adecuado para analizar una muestra derivada de sangre como se describe en el presente documento, para determinar uno o más marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo en el tratamiento de una enfermedad por ACT. El kit puede emplearse para predecir si un paciente será o no un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT.

20 De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un kit que comprende medios para detectar un marcador de número o actividad de MDSC y/o número o actividad de linfocitos T reguladores y medios para detectar un marcador de número o actividad de linfocitos T efectores, comprendiendo además, opcionalmente, medios para detectar un marcador de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

25 El kit puede tener al menos un recipiente con una cantidad predeterminada de: uno o más reactivos para detectar el nivel de uno o más marcadores de número o actividad de MDSC y/o uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T reguladores, uno o más reactivos para detectar el nivel de uno o más marcadores de número o actividad de linfocitos T efectores, y/o uno o más reactivos para detectar el nivel de uno o más marcadores de la cantidad de un agente infeccioso asociado con la enfermedad.

30 El experto en la materia es capaz de identificar fácilmente reactivos adecuados para determinar el nivel de la expresión o actividad relevante de gen/proteína en una muestra. Los reactivos adecuados pueden incluir, por ejemplo, cebadores oligonucleotídicos, pares de anticuerpos ELISA, aptámeros etc. Los reactivos adecuados pueden incluir marcadores detectables para detección y cuantificación.

35 En algunas realizaciones, el kit contiene todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo en una muestra derivada de sangre para predecir si un paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de la enfermedad por ACT, incluyendo todos los controles, instrucciones/indicaciones para llevar a cabo los ensayos y cualquier programa informático necesario para el análisis y presentación de los resultados.

40 La presente invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritos, exceptuando cuando tal combinación sea claramente inaceptable o se evita expresamente.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

45 Ahora se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas. Serán evidentes para los expertos en la materia aspectos y realizaciones adicionales.

50 A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, incluyendo las reclamaciones que siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implica la inclusión de un elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o etapas.

55 Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el" o "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En el presente documento los intervalos se pueden expresar como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma análoga, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular constituye otra realización.

60 **Breve descripción de las figuras**

Las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención se analizarán ahora con referencia a las figuras adjuntas.

65 **Figura 1.** Esquema que muestra los puntos temporales de la recogida de muestras a lo largo del ensayo clínico

de Fase II.

- 5 **Figura 2.** Gráficos que muestran números/porcentajes de leucocitos de sangre periférica a las dos semanas después de la primera infusión de CTL (es decir, en el punto temporal T1) frente a la supervivencia general. (A) Número de glóbulos blancos, (B) Neutrófilos como porcentaje de leucocitos, (C) Linfocitos como porcentaje de leucocitos y (D) monocitos como porcentaje de leucocitos.
- 10 **Figura 3.** La Tabla 1 muestra los resultados del análisis estadístico de la correlación de los números de leucocitos de sangre periférica con la supervivencia general en diferentes puntos temporales.
- 15 **Figura 4.** Gráficos que muestran los niveles séricos de citocinas/quimiocinas y ADN de EBV a las dos semanas después de la primera infusión de CTL (es decir, en el punto temporal T1) frente a la supervivencia general. (A) IFN γ , (B) ADN de EBV, (C) CCL20 y (D) CCL10.
- 20 **Figura 5.** La Tabla 2 muestra los resultados del análisis estadístico de la correlación de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas y ADN de EBV con la supervivencia general en diferentes puntos temporales.
- 25 **Figura 6.** Gráficos que muestran un análisis de analito único de los niveles séricos de (A) IFN γ y (B) ADN de EBV a las dos semanas después de la primera infusión de CTL (es decir, en el punto temporal T1).
- 30 **Figura 7.** Gráficos que muestran el análisis de la relación de analitos séricos a las dos semanas después de la primera infusión de CTL (es decir, en el punto temporal T1). (A) CCL20:IFN γ frente a ADN de EBV:IFN γ y (B) CCL10:IFN γ frente a ADN de EBV:IFN γ .
- 35 **Figura 8.** Esquema que muestra la red Bayesiana de análisis de nanocadenas de ARN obtenido de PBMC de pacientes en el punto temporal T1.
- 40 **Figura 9.** La Tabla 3 muestra los resultados del análisis estadístico de la correlación del nivel de transcritos de PBMC con la supervivencia general en el punto temporal T1.
- 45 **Figura 10.** Gráficos que muestran el nivel de transcritos de ARN a las dos semanas después de la primera infusión de CTL (es decir, en el punto temporal T1) frente a la supervivencia general. (A) CD68, (B) S100A8 y (C) LILRA5.
- 50 **Figura 11.** Gráficos que muestran números de monocitos en diferentes puntos temporales. (A) Monocitos como porcentaje de leucocitos y (B) Monocitos como porcentaje del número total de células vivas.
- 55 **Figura 12.** Gráficos que muestran la proporción de tipos celulares como porcentaje de leucocitos en diferentes puntos temporales. (A) Neutrófilos como porcentaje de leucocitos y (B) Linfocitos como porcentaje de leucocitos.
- 60 **Figura 13.** Diagramas de dispersión que muestran la estrategia de selección para MDSC para citometría de flujo.
- 65 **Figura 14.** Gráficos que muestran el número de MDSC como porcentaje del número total de células vivas en diferentes puntos temporales. (A) Media \pm desviación estándar para supervivientes a los dos años y no supervivientes y (B) Puntos de datos individuales para cada paciente.
- Figura 15.** Gráfico que muestra el número de Tregs FoxP3 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ como porcentaje de células CD3 $^{+}$ en diferentes puntos temporales.
- Figura 16.** Gráficos que muestran (A) Tregs FoxP3 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ como porcentaje de células CD3 $^{+}$ en T1 en pacientes con números elevados de MDSC y (B) Tregs FoxP3 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ como porcentaje de células CD3 $^{+}$ frente a la supervivencia general.
- Figura 17.** Gráfico que muestra el nivel de citocinas séricas para no supervivientes y supervivientes a largo plazo (más de 2 años) en todos los puntos temporales.
- Figura 18.** Gráficos que muestran el nivel de transcritos de ARN en T-1 (pre-quimioterapia) y T0 (post-quimioterapia) entre. (A) NLRP3, (B) CD274 (PD-L1) y (C) STAT4.
- Figura 19.** Esquema que muestra la red Bayesiana de análisis de nanocadenas de ARN obtenido de PBMC de pacientes en el punto temporal T1.
- Figura 20.** Gráficos que muestran el nivel de transcritos de ARN para diferentes marcadores en T1 en no supervivientes (círculos) y supervivientes a largo plazo (más de 2 años; cuadrados). (A) CD68, (B) LILRA5 y (C) S100A9.

Figura 21. La Tabla 4 muestra los resultados del análisis estadístico de la correlación del nivel de transcritos de PBMC con la supervivencia en el punto temporal T1.

5 **Figura 22.** Esquema de la red Bayesiana de análisis de nanocadenas de ARN obtenido de PBMC de pacientes en el punto temporal T0.

Figura 23. La Tabla 5 muestra los resultados del análisis estadístico de la correlación del nivel de transcritos de PBMC con la supervivencia en el punto temporal T0.

10 Ejemplos

En los siguientes Ejemplos, los inventores describen el análisis de muestras recogidas de un ensayo clínico de Fase II en el que los pacientes con carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV) se tratados con gemcitabina y carboplatino durante cuatro ciclos, seguido de tratamiento por transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ específicos de EBV autólogos, expandidos *in vitro*.

Los inventores realizaron un análisis multifactorial para determinar las correlaciones del suero inmunitario sistémico que influyen y determinan la terapia exitosa y examinaron el entorno inmunitario celular utilizando PBMC criopreservadas de muestras recogidas antes y después de la quimioterapia y durante la inmunoterapia, para evaluar el estado inmunosupresor de los pacientes.

Los inventores demuestran diferencias clave entre los no supervivientes y los supervivientes a largo plazo en términos de relaciones Tefector:Treg y si existe o no expansión o contracción del compartimento de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

25 Ejemplo 1: Procedimientos Experimentales

1.1 Ensayo de inmunoterapia y recogida de muestras

30 Se realizó un ensayo clínico de Fase II en el que los pacientes con carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV) se tratados con gemcitabina y carboplatino durante cuatro ciclos, seguido de tratamiento por transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ específicos de EBV autólogos, expandidos *in vitro*.

Los resultados demostraron una eficacia sin precedentes. La tasa de supervivencia general de dos años fue del 62,9% y la tasa de supervivencia general de tres años fue del 37,1%. Estas tasas de supervivencia general de dos y tres años se encuentran entre las mejores tasas de supervivencia para el tratamiento de NPC avanzado. El análisis de los datos del ensayo de Fase II mostró que había una correlación positiva entre los supervivientes a largo plazo y la capacidad de sus CTL para producir IFN- γ en respuesta a la presentación del antígeno LMP2.

40 A lo largo del ensayo de inmunoterapia, se tomaron muestras de sangre periférica de los pacientes. Los puntos temporales examinados fueron:

- 45 Previo a quimioterapia (T-1);
- Posterior a quimioterapia, previo a inmunoterapia (T0);
- Posterior a la primera infusión de CTL (T1);
- Posterior a la segunda infusión de CTL (T2); y Posterior a la tercera infusión de CTL (T3).

1.2 Análisis de citocinas en suero

50 Se usó un kit de ensayo luminex multiplex con matriz de perlas de citocinas y quimiocinas 27-plex humanas Invitrogen; Carlsbad, CA) para medir los niveles de las siguientes citocinas en plasma diluido obtenido de las muestras: IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, IL-21, (CXCL10) IP-10, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL20 (MIP-3 α), MCP-1, IFN- α 2, IFN- γ , EGF, FGF-2, VEGF, TGFA, CD40L, fractalquina, GM-CSF, G-CSF, GRO, MDC y eotaxina.

55 Las placas se lavaron utilizando lavador Biotek ELx405 (Biotek, EE. UU.) Y se 'leyeron' con los sistemas Flexmap 3D (Luminex Corp, Austin, TX, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron usando el programa informático Bio-Plex manager 6.0 con un algoritmo de ajuste de curva de 5 parámetros aplicado para cálculos de curva patrón.

60 1.3 Inmunofenotipificación de PBMC

Las PBMC obtenidas de muestras de pacientes congeladas recogidas en los puntos temporales T-1 a T3 se tiñeron con dos paneles de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia diferentes (panel Treg o panel MDSC) para determinar el linaje celular y el estado de activación.

Panel Treg: BUV 395 anti-CD25, Pacific Blue anti-FoxP3, BV 711 anti-CD127, FITC anti-CD4, PE anti-CTLA4, PECF594 anti-CD45RA, PECy5 anti-CD3, PE Cy7 anti-CCR7, tinte de células vivas/muertas de infrarrojo cercano.

5 Los Tregs se identificaron usando una estrategia de selección con ventana de análisis de célula única, negativa con células vivas/muertas, positiva con CD3, positiva con CD4, positiva con CD25, positiva con CD127, positiva con FOXP3, positiva con CTLA4.

Panel MDSC: BUV 395 anti-CD15, FITC anti-CD16, PE anti-CD33, PECF594 anti-CD34, PE Cy7 anti-CD11b, APC anti-CD14, APC H7 anti-HLA-DR, tinte violeta de células vivas/muertas.

10 Los MDSC monocíticos se identificaron utilizando una estrategia de selección con ventana de análisis de célula única negativa con células vivas/muertas, negativa con CD16, negativa con CD15, negativa con CD34, positiva con CD11b, positiva con CD33, intermedia con CD14, negativa baja con HLA-DR. Las células se adquirieron usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el programa informático Diva (BD Biosciences) y Flowjo (Treestar).

1.4 Aislamiento de ARN

20 Se sedimentaron 1×10^5 PBMC descongeladas de los puntos temporales T-1, T0, T1, T2 y T3 por centrifugación en tubos eppendorf. Posteriormente, las muestras se sometieron a extracción de ARN utilizando un Micro kit QIAGEN RNAEasy. Las muestras se procesaron de acuerdo con las pautas del fabricante. El volumen de elución final fue en 15 μ l de agua sin RNasa.

1.5 Procesamiento de nanocadenas

25 La expresión génica se analizó usando un panel inmunitario Nanostring PanCancer. Se prepararon 100 ng de cada muestra de paciente según las pautas del fabricante. La cuantificación de la expresión génica se determinó utilizando la plataforma nCounter, los recuentos sin procesar se procesaron utilizando nSolver. Los recuentos se normalizaron utilizando el método ComBat.

1.6 Análisis de red bayesiana

30 Se calcularon redes bayesianas de datos combinados de luminex y nanocadenas para cada punto temporal por separado usando BayesiaLab. El estado de supervivencia de dos años se excluyó de la red inicial, que se formó utilizando el algoritmo de árbol de máxima expansión (coeficiente estructural = 1). Los nodos se agruparon utilizando la función de agrupación variable. Se utilizó aprendizaje tabú, con supervivencia de dos años incluida para formar la red final.

1.7 Análisis estadístico

40 La correlación con la supervivencia general se evaluó por análisis utilizando la correlación clasificada de Spearman. La correlación con la supervivencia a dos años se analizó utilizando ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

45 Ejemplo 2: Los supervivientes a largo plazo experimentan un aumento de número de linfoides pero una disminución de mieloides después de la inmunoterapia con CTL

50 A lo largo del ensayo de inmunoterapia, se tomaron muestras de sangre periférica de los pacientes. Para evaluar el impacto del análisis de inmunoterapia se centró en el punto temporal dos semanas después de la primera infusión de inmunoterapia (T1; véase la Figura 1).

Se evaluaron los números de leucocitos de sangre periférica en el punto temporal T1 para detectar cualquier cambio importante en el sistema inmunitario como resultado de la inmunoterapia. Los resultados se muestran en las Figuras 2A a 2E.

55 Hubo una correlación negativa significativa entre el número de leucocitos y la supervivencia general ($r = -0,43$; Figura 2A). Los números de neutrófilos (como proporción de leucocitos) también se asociaron significativamente, de forma negativa con la supervivencia, aunque con mala correlación ($r = -0,32$; Figura 2B). Por el contrario, hubo una correlación positiva significativa entre números de linfocitos (como proporción de leucocitos) y la supervivencia general ($r = 0,46$; (Figura 2C). No se observó correlación entre el número de monocitos (como proporción de leucocitos) y la supervivencia general (Figura 2D). El análisis de los números de leucocitos en los puntos temporales antes de la inmunoterapia (T0) o antes de la quimioterapia (T-1) no reveló una correlación estadísticamente significativa con la supervivencia general (Figura 3; Tabla 1).

65 Tomados en conjunto, los resultados sugirieron que los supervivientes a largo plazo experimentan un cambio en la composición de los leucocitos dentro de las dos semanas posteriores a la primera inyección de inmunoterapia, que

da como resultado una disminución de números de células mieloides y un aumento de números de linfocitos T efectores. Los resultados también demuestran que este cambio en la población de células inmunitarias se produce como resultado directo de la inmunoterapia y no es atribuible a la quimioterapia.

5 Ejemplo 3: La inmunoterapia con CTL exitosa da como resultado un aumento de IFN γ

Para evaluar si el aumento en los números de linfocitos también influía o no en la carga vírica y en la producción de citocinas, se analizaron sueros de pacientes para determinar la producción de citocinas mediante el ensayo Luminex y se cuantificó el ADN de EBV por qPCR. Los resultados de los análisis se muestran en las Figuras 4A a 4F. Los datos mostrados en las Figuras 4A a 4D, 5, 6 y 7A y 7B se basan en el análisis de suero obtenido de muestras aisladas en el punto temporal T1, es decir, dos semanas después de la primera infusión de CTL específicos de EBV.

Dentro de dos semanas después de la primera infusión de inmunoterapia hubo una correlación positiva significativa entre la producción de IFN γ y la supervivencia (Figura 4A). Antes de la inmunoterapia (es decir, en T0), no se observó correlación entre la supervivencia y las concentraciones de IFN γ en los sueros (Tabla 2, Figura 5). Por el contrario, la supervivencia se correlacionó fuertemente con una disminución significativa en la carga vírica de EBV (Figura 4B). La producción de quimiocinas expresadas en mieloides, tal como CCL20, disminuyó de manera similar en los supervivientes a largo plazo (Figura 4C). Mientras que otras citocinas producidas por células mieloides tales como CCL10 no se asociaron significativamente con la supervivencia (Figura 4D).

Para investigar estas correlaciones para servir como biomarcadores para la supervivencia asociada con el tratamiento con CTL específicos de EBV autólogos, los pacientes se clasificaron en grupos de pacientes que sobrevivieron durante dos años (Superviviente a los dos años) y pacientes que no sobrevivieron durante dos años (No superviviente). Se eligió la supervivencia a dos años como punto de corte debido al hecho de que los pacientes con NPC en Estadio IV EBV+ tienen un intervalo de supervivencia promedio de 11-22 meses.

El análisis de analitos únicos no estratificó suficientemente a los no supervivientes frente a los supervivientes a los dos años (Figuras 6A y 6B). Por lo tanto, los inventores analizaron las relaciones de los niveles séricos de varias citocinas diferentes y ADN de EBV a la única citocina que se correlacionó positivamente con la supervivencia, IFN γ . IFN γ se utilizó como resultante y los analitos que se correlacionaron con la no supervivencia se utilizaron como anterior.

Los resultados se muestran en las Figuras 7A y 7B. Usando una combinación de ADN de EBV:IFN γ frente a CCL20:IFN γ , o de ADN de EBV:IFN γ frente a CCL10:IFN γ , los inventores fueron capaces de identificar correctamente a los supervivientes a los dos años con una verdadera tasa positiva del 85 %. Así, los inventores demostraron la capacidad de los niveles séricos de combinaciones de marcadores a las dos semanas después del comienzo del tratamiento con CTL específicos de EBV autólogos para predecir la supervivencia a largo plazo de los pacientes.

Para validar los hallazgos, los valores radiométricos se introdujeron en el algoritmo del programa informático de aprendizaje automático Weka. La metodología de regresión logística también fue capaz de clasificar correctamente a los pacientes con una tasa de éxito del 85 %. Para evaluar la eficacia de las relaciones en lugar de los valores reales, se introdujeron los mismos datos reemplazando las relaciones con mediciones de analitos únicos. La eliminación de uno de los analitos de las relaciones redujo la tasa clasificada correctamente al 57 %.

En conjunto, los resultados muestran que la inmunoterapia exitosa induce una mayor producción de IFN γ en los supervivientes a largo plazo, mientras que se reduce el nivel de producción de quimiocinas producidas por las células mieloides.

50 Ejemplo 4: Los no supervivientes expresan un aumento de los transcritos asociados con las células mieloides

Los inventores decidieron, a continuación, investigar las razones del fracaso terapéutico en individuos que sobrevivieron durante menos de dos años.

Las PBMC de pacientes obtenidos en el punto temporal T1 se sometieron a análisis de nanocadenas para la cuantificación de los transcritos. Los recuentos de ARN se normalizaron, se filtraron para determinar su significación y posteriormente se analizaron utilizando una red Bayesiana (Figura 8). El examen de esta red reveló un enriquecimiento de los transcritos asociados con marcadores de células mieloides y marcadores inhibidores inmunitarios. La correlación clasificada de Spearman se utilizó para filtrar adicionalmente e identificar asociaciones con el fracaso terapéutico. Las correlaciones más fuertes observadas con la supervivencia general fueron la transcripción de CD68, LILRA5 y S100A8, todos los cuales están asociados con las células mieloides y la expresión de marcadores inhibidores (Figura 10A, 10B y 10C).

Además, la transcripción de CD8 también se halló que estaba asociada significativamente con la supervivencia general (Tabla 3, Figura 9).

Las Figuras 18A a 18C muestran análisis de nanocadenas de la transcripción de los marcadores inflamatorios e inhibidores NLRP3, CD274 (PD-L1) y STAT4 en los puntos temporales T-1 (pre-quimioterapia) y T0 (post-quimioterapia) para no supervivientes y supervivientes a largo plazo.

5 Las Figuras 19 a 21 muestran los resultados de análisis adicionales de nanocadenas y redes Bayesianas de ARN obtenido de PBMC de pacientes en el punto temporal T1. El examen de esta red reveló un enriquecimiento de los transcritos asociados con marcadores mieloides e inhibidores. La correlación clasificada de Spearman se utilizó para filtrar adicionalmente e identificar asociaciones con el fracaso terapéutico. Las correlaciones más fuertes observadas con la supervivencia general fueron la transcripción de CD68, LILRA5 y S100A9, todos los cuales están asociados con las células mieloides y la expresión de marcadores inhibidores (Figura 20A, 20B y 20C). Además, la transcripción de CD8B también se halló que estaba asociada significativamente con la supervivencia general (Tabla 4, Figura 21).

15 En conjunto, Estos resultados sugieren que la presencia de una firma de leucocitos mieloides/inhibidores en la sangre periférica afecta negativamente la supervivencia del paciente a largo plazo, al crear, potencialmente, un ambiente inhibitor que influye negativamente en la eficacia de la infusión de CTL.

Ejemplo 5: Los no supervivientes experimentan un aumento de las células supresoras derivadas de mieloides después de la quimioterapia

20 Para examinar adicionalmente el impacto de esta firma mieloides/inhibidora sobre la supervivencia, los inventores extendieron el análisis de los recuentos de sangre completa a puntos temporales antes de la inmunoterapia (es decir, T-1 y T0), ya que se ha demostrado recientemente que el éxito de la vacunación con linfocitos T depende de la ablación del compartimiento mieloides (Welters, M. J., van der Sluis, T. C., van Meir, H., Loof, N. M., van Ham, V. J., van Duikeren, S., et al. (2016). La vacunación durante el agotamiento de las células mieloides por quimioterapia contra el cáncer fomenta respuestas de linfocitos T potentes. Science Translational Medicine, 8(334), 334ra52-334ra52. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8307>).

30 El análisis de la red bayesiana del punto temporal posterior a la quimioterapia (es decir, T0) reveló que la expresión de CD68 estaba correlacionada negativamente con la supervivencia a dos años. Esto sugiere que un aumento de la presencia de células mieloides contribuye a una disminución de la supervivencia del paciente después de la ablación de las células inmunitarias (Figura 22; Table 5, Figure 23).

35 La discretización de los pacientes basándose en la supervivencia a dos años (no supervivientes y supervivientes a los dos años) mostró que los números de monocitos (como proporción de leucocitos) aumentó en ambos grupos después de la quimioterapia en comparación con antes de la quimioterapia (es decir, en T0 en comparación con T-1), mostrando, los no supervivientes, el mayor aumento (Figura 11A). Estos resultados se confirmaron por análisis de citometría de flujo, sin embargo, la tasa de aumento para los supervivientes a los dos años fue mucho menor que la observada en los recuentos clínicos de sangre completa (Figura 11B). En ambos análisis, el número de monocitos en ambos grupos fue similar a las dos semanas después de la primera inmunoterapia (T1).

45 Por el contrario, el análisis del curso temporal del compartimento de neutrófilos por supervivencia a dos años mostró disminuciones graves en el número de neutrófilos (como proporción de leucocitos), que no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos (Figura 12A). También se observaron diferencias en el compartimento de linfocitos, con supervivientes a los dos años que tenían mayores números de linfocitos (como proporción de leucocitos) a lo largo del curso temporal en comparación con los no supervivientes (Figura 12B).

50 Los inventores examinaron, a continuación, el fenotipo de los leucocitos periféricos criopreservados, centrándose en particular en MDSC monocíticas y linfocitos T reguladores (Figura 13). Los puntos temporales examinados fueron previo a quimioterapia (T-1), posterior a quimioterapia, previo a inmunoterapia (T0), posterior a primera infusión de CTL (T1), posterior a segunda infusión de CTL (T2) y posterior a tercera infusión de CTL (T3).

55 La proporción de MDSC en diferentes puntos temporales como proporción del número total de células vivas se muestra en las Figuras 14A y 14B. No se observó diferencia en los números de MDSC entre los supervivientes a los dos años y los no supervivientes previamente a la quimioterapia (es decir, en T-1). Después del tratamiento quimioterapéutico en T0, se observó un aumento significativo de los números de MDSC en los no supervivientes, mientras que los supervivientes a largo plazo presentaron un aumento pequeño pero no significativo. El número de MDSC en no supervivientes disminuyó después pero permaneció en niveles superiores al número de MDSC en supervivientes a largo plazo (T1). En puntos temporales posteriores, los dos grupos de pacientes mostraron números de MDSC comparables, que estaban en niveles por debajo del punto temporal previo a la quimioterapia (Figura 14A y 14B). Los resultados muestran que las personas que no se sometieron a un tratamiento inmunoterapéutico exitoso poseen un mayor número de monocitos, la mayoría de los cuales estaban compuestos de MDSC monocíticas, en el momento de la primera infusión de CTL. Los mayores números de MDSC en el momento de la primera infusión puede proporcionar un entorno inhibitorio, inhibiendo así la función de los CTL infundidos.

Ejemplo 6: Los supervivientes a largo plazo con números de MDSC elevados poseen números de Tregs activados

disminuidos

Del análisis de MDSC se observó que un subconjunto de supervivientes a los dos años tiene números elevados de MDSC posteriormente a la quimioterapia (> 5,12 % de células vivas; véase, por ejemplo, la Figura 14B), sin embargo, estos individuos todavía se sometieron a un tratamiento inmunoterapéutico exitoso. Para investigar el papel de otros subconjuntos de leucocitos inhibidores que podrían explicar esta discrepancia, también se examinaron las PBMC crioconservadas para determinar los números de linfocitos T reguladores (Treg) en diferentes puntos temporales.

Los resultados se muestran en la Figura 15. El número de Tregs activados durante el ensayo clínico no fue significativamente diferente entre los no supervivientes y los supervivientes a los dos años. Sin embargo, los no supervivientes mostraron un mayor número de Tregs CTLA4+ antes de la quimioterapia (es decir, en T-1). Estos números disminuyeron en ambos grupos posteriormente a la quimioterapia (T0) y los no supervivientes poseían cantidades ligeramente superiores de Tregs durante el curso temporal examinado (Figura 15). El examen del subconjunto de individuos con números elevados de MDSC reveló una correlación negativa entre la supervivencia a largo plazo y los números de Treg en el punto temporal T0, lo que podría explicar la terapia exitosa en el subconjunto de supervivientes a los dos años que tienen números elevados de MDSC (Figura 16A y 16B).

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que los pacientes que sobrevivieron durante dos años tuvieron una disminución en los números de MDSC y Tregs posteriormente a la quimioterapia, lo que permitió el establecimiento de potentes respuestas de CTL como se evidencia por el aumento de los niveles de IFN γ .

Ejemplo 7: Datos en todos los puntos temporales

Los niveles de IFN γ , CCL22, IL-10, IL-8, CCL20 (es decir, MIP3 α) y VEGF determinados en muestras obtenidas de no supervivientes y supervivientes a largo plazo (es decir, más de 2 años) detectados en muestras obtenidas de pacientes en diferentes puntos temporales en el transcurso del ensayo clínico se unieron y analizaron.

Los resultados se muestran en la Figura 17 y muestran que el nivel de IFN γ se correlacionó positivamente con la supervivencia a largo plazo, mientras que los niveles de cada uno de CCL22, IL10, IL8, MIP3 α y VEGF se correlacionan negativamente con la supervivencia a largo plazo.

Referencias

1. Chang, C. M., Yu, K. J., Mbulaiteye, S. M., Hildesheim, A. y Bhatia, K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res.* 143, 209-221 (2009).
2. Wee, J. et al. Randomized trial of radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy in patients with American Joint Committee on Cancer/International Union against cancer stage III and IV nasopharyngeal cancer of the endemic variety. *J. Clin. Oncol.* 23, 6730-6738 (2005).
3. Gerdemann, U. et al. Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol. Ther.* 17, 1616-1625 (2009).
4. Chia, W. K. et al. A phase II study evaluating the safety and efficacy of an adenovirus- Δ LMP1-LMP2 transduced dendritic cell vaccine in patients with advanced metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Ann. Oncol.* 23, 997-1005 (2012).
5. Moosmann, A. et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960-2970 (2010).
6. Louis, C. U. et al. Enhancing the *in vivo* expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients. *Blood* 113, 2442-2450 (2009).
7. Straathof, K. C. M. et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood* 105, 1898-1904 (2005).
8. Louis, C. U. et al. Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma. *J. Immunother.* 33, 983-990 (2010).
9. Smith, C. et al. Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy. *Cancer Res.* 72, 1116-1125 (2012).
10. Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R. & Albelda, S. M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* 11, 6713-6721 (2005).
11. Nowak, A. K., Robinson, B. W. S. & Lake, RA La gemcitabina ejerce un efecto selectivo sobre la respuesta inmunitaria humoral: implicaciones for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 62, 2353-2358 (2002).
12. Shevchenko, I. et al. Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 133, 98-107 (2013).
13. Kan, S. et al. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction *in vitro*. *Anticancer Res* 32, 5363-5369 (2012).
14. Rettig, L. et al. Gemcitabine depletes regulatory T-cells in human and mice and enhances triggering of vaccine-specific cytotoxic T-cells. *Int. J. Cancer* 129, 832-838 (2011).

15. Wesolowski, R., Markowitz, J. & Carson, W. E., III Myeloid derived suppressor cells - a new therapeutic target in the treatment of cancer. 1, 1-1 (2013).
16. Dumitru, C. A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S. & Brandau, S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1155-1167 (2012).
- 5 17. Filipazzi, P., Huber, V. & Rivoltini, L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 255-263 (2011).
18. Ding, Z.-C. et al. Immunosuppressive myeloid cells induced by chemotherapy attenuate antitumor CD4+ T cell responses through the PD-1/PD-L1 axis. *Cancer Res.* (2014).doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3596.
- 10 19. Huang, A. et al. Increased CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1439-1451 (2013).

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir si un paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento de un cáncer positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV) por transferencia celular adoptiva (ACT) de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de EBV, que comprende:
- 5
- (i) determinar en una muestra derivada de sangre obtenida del paciente: a) la relación del nivel de CXCL10 y/o CCL20 al nivel de IFN γ y b) la relación del nivel de ácido nucleico de EBV al nivel de IFN γ ; y
- 10 (ii) basándose en el análisis de la etapa (i), predecir si el paciente será un superviviente a largo plazo en el tratamiento del cáncer por ACT de CTL específicos de EBV.
2. Linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de EBV para su uso en un método para tratar un cáncer positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV) en un paciente por transferencia celular adoptiva (ACT) de CTL específicos de EBV, en donde el método comprende:
- 15
- (i) determinar en una muestra derivada de sangre obtenida del paciente: a) la relación del nivel de CXCL10 y/o CCL20 al nivel de IFN γ y b) la relación del nivel de ácido nucleico de EBV al nivel de IFN γ ; y
- (ii) administrar una o más dosis de CTL específicos de EBV al paciente donde se determina que el paciente tiene
- 20 (a) una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 2,5 y/o una relación del nivel transformado en log₁₀ de CCL20 en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 1,0 y (b) una relación del nivel transformado en log₁₀ de ácido nucleico de EBV en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 3,0.
3. Un método para seleccionar a un paciente para el tratamiento de un cáncer positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV) mediante transferencia celular adoptiva (ACT) de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de EBV, que comprende:
- 25
- (i) determinar en una muestra derivada de sangre obtenida del paciente: a) la relación del nivel de CXCL10 y/o CCL20 al nivel de IFN γ y b) la relación del nivel de ácido nucleico de EBV al nivel de IFN γ ; y
- 30 (ii) seleccionar un paciente para el tratamiento por ACT de CTL específicos de EBV donde se determina que el paciente tiene (a) una relación del nivel transformado en log₁₀ de CXCL10 en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 2,5 y/o una relación del nivel transformado en log₁₀ de CCL20 en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 1,0 y (b) una relación del nivel transformado en log₁₀ de ácido nucleico de EBV en pg/ml al nivel transformado en log₁₀ de IFN γ en pg/ml de menos de 3,0.
- 35
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, los CTL específicos de EBV para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o el método de la reivindicación 3, en donde el método comprende adicionalmente una etapa inicial de administrar una dosis de CTL específicos de EBV al paciente.
- 40
5. El método, o los CTL específicos de EBV para su uso, de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la muestra se obtiene del paciente dentro de un período de 4 semanas después de la etapa inicial de administración de una dosis de CTL específicos de EBV al paciente.
- 45
6. El método o los CTL específicos de EBV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el análisis de la etapa (i) comprende adicionalmente:
- (c) determinar el vínculo entre la relación de (a) y la relación de (b).
- 50
7. El método, o los CTL específicos de EBV para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cáncer se selecciona de carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para EBV, cáncer de hígado positivo para EBV, cáncer de pulmón positivo para EBV y cáncer gástrico positivo para EBV.
8. El método, o los CTL específicos de EBV para su uso, de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer positivo para EBV es NPC positivo para EBV.

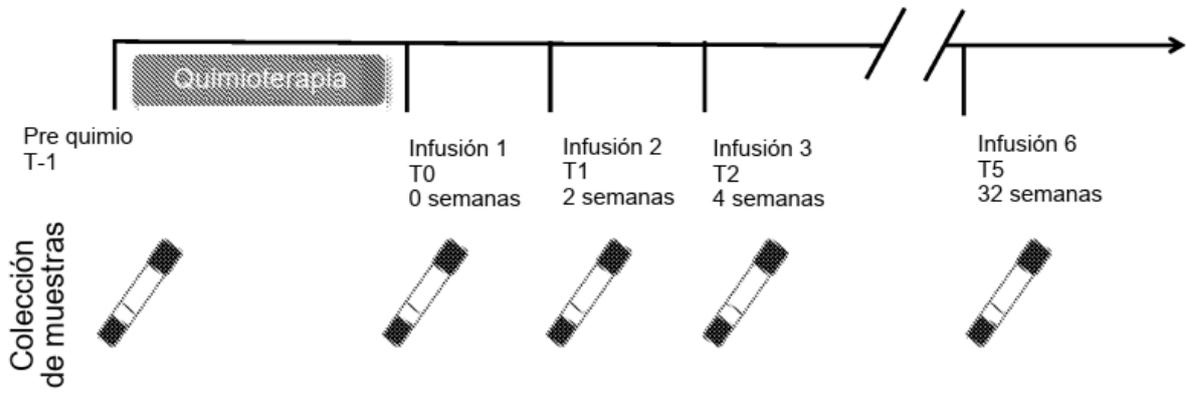


Figura 1

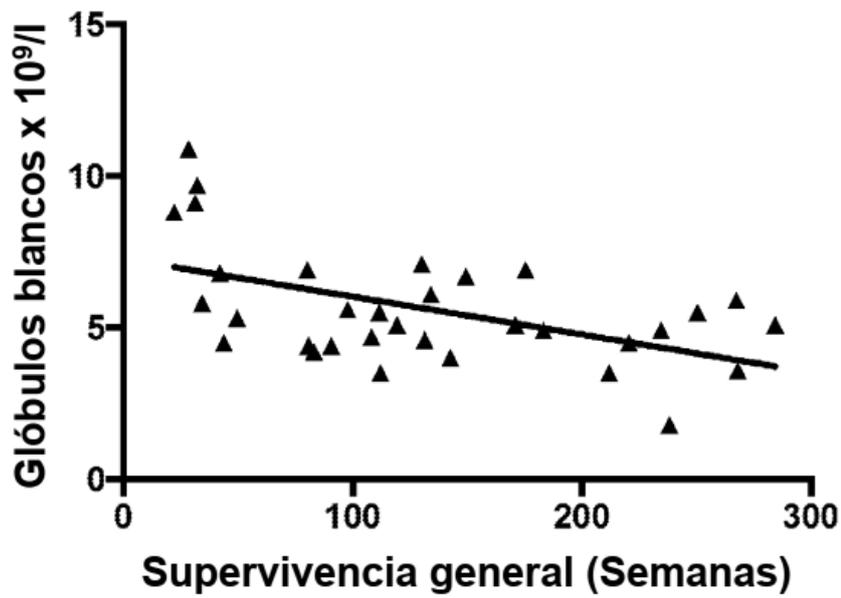


Figura 2A

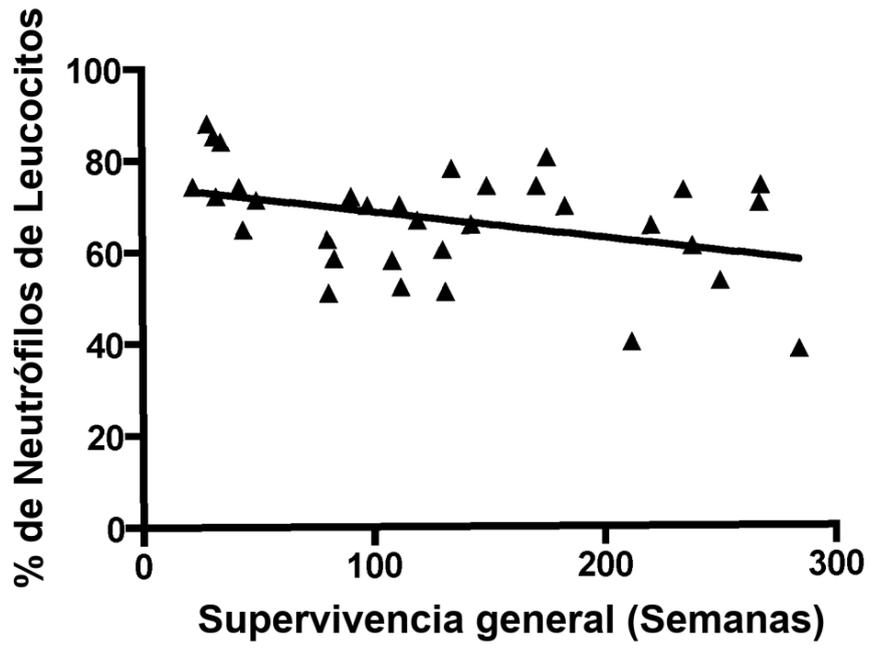


Figura 2B

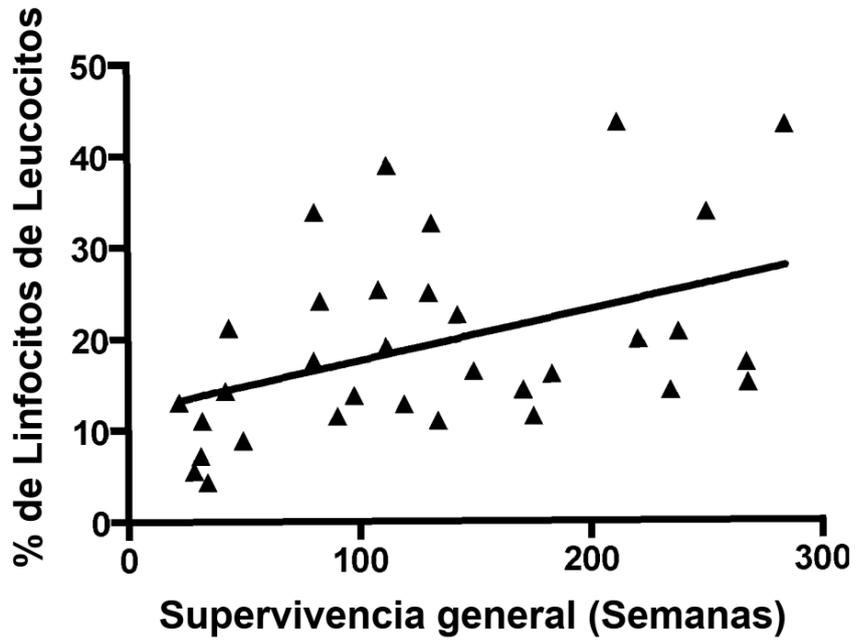


Figura 2C

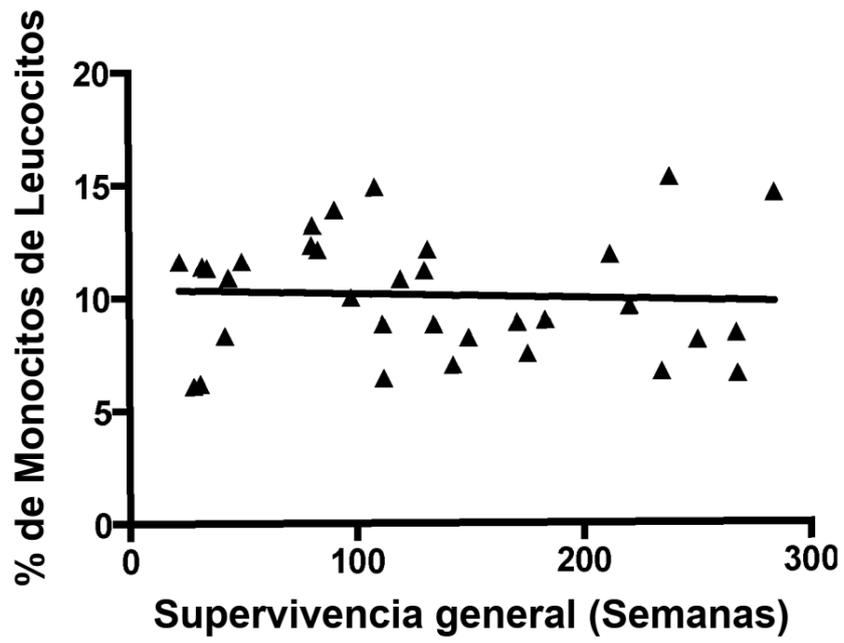


Figura 2D

Tabla 1

		T-1	T0	T1
GB	r de Spearman	-0,2263	-0,3247	-0,4367
	Valor de p	0,1981	0,061	0,0111
Neutrófilos	r de Spearman	-0,167	-0,1051	-0,3188
	Valor de p	0,3451	0,554	0,0706
Linfocitos	r de Spearman	0,2251	0,3299	0,456
	Valor de p	0,2006	0,0567	0,0076
Monocitos	r de Spearman	0,02828	-0,1329	-0,105
	Valor de p	0,8739	0,4536	0,561

Figura 3

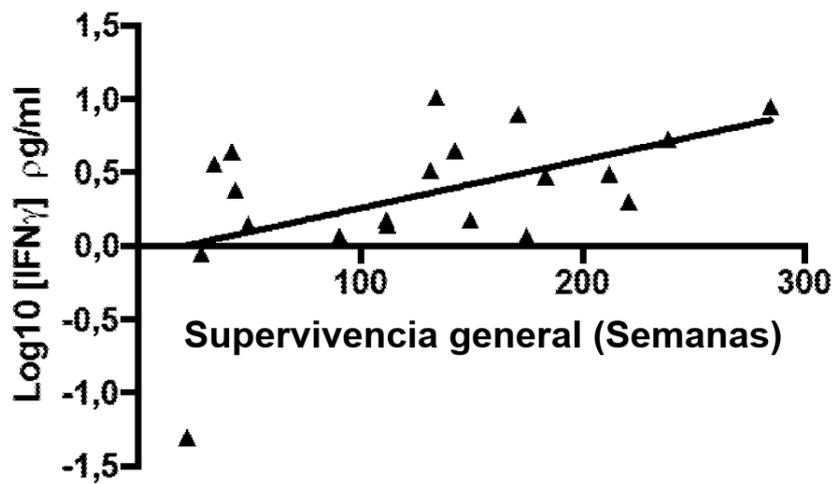


Figura 4A

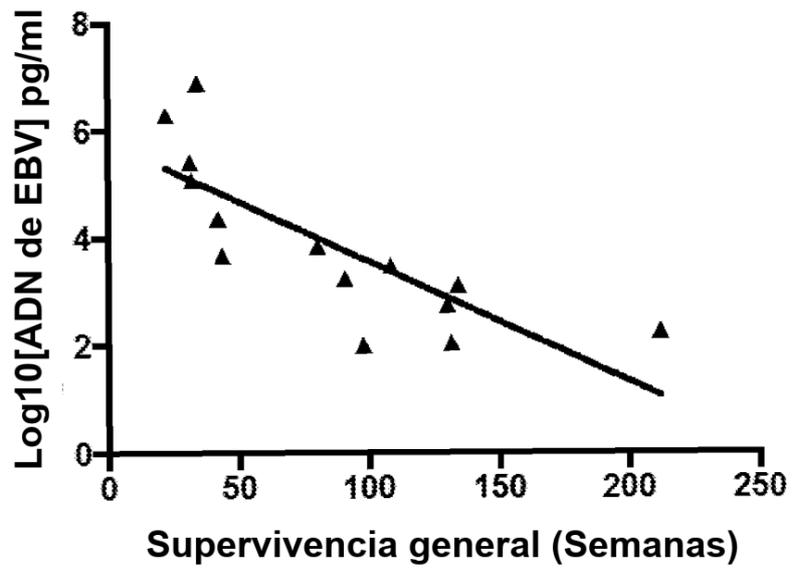


Figura 4B

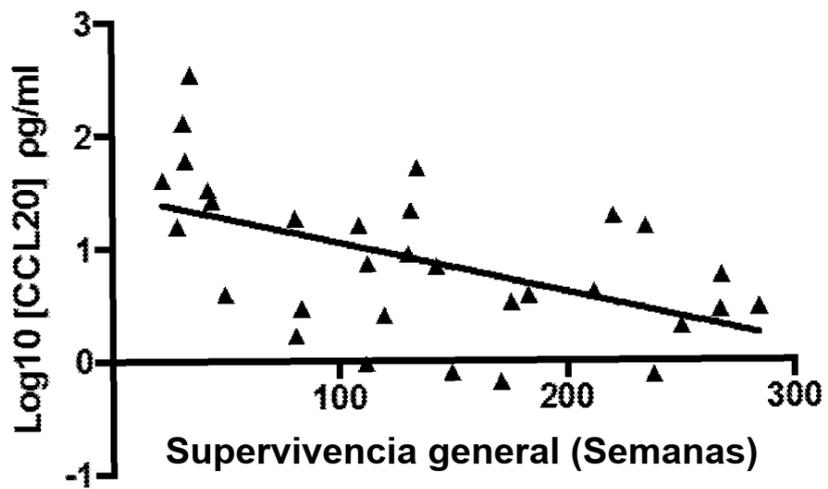


Figura 4C

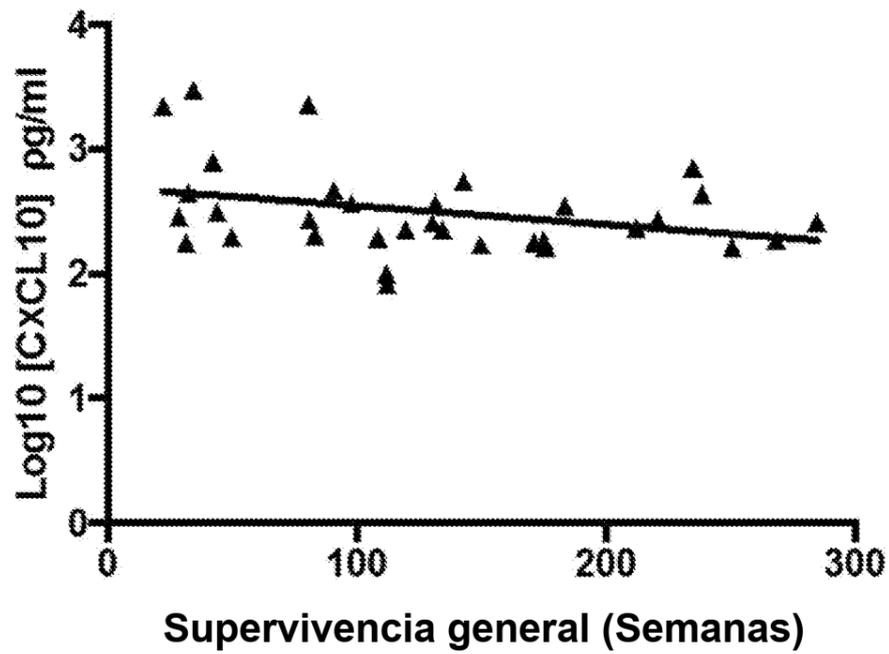


Figura 4D

Tabla 2

		T0	T1
IFNg	r de Spearman	-0,04045	0,4637
	Valor de p	0,8511	0,0395
ADN de EBV	r de Spearman	-0,8818	-0,8725
	Valor de p	0,0007	0,0001
CCL20	r de Spearman	-0,3951	-0,5472
	Valor de p	0,0339	0,0014
CXCL10	r de Spearman	-0,2425	-0,3155
	Valor de p	0,1671	0,0737

Figura 5

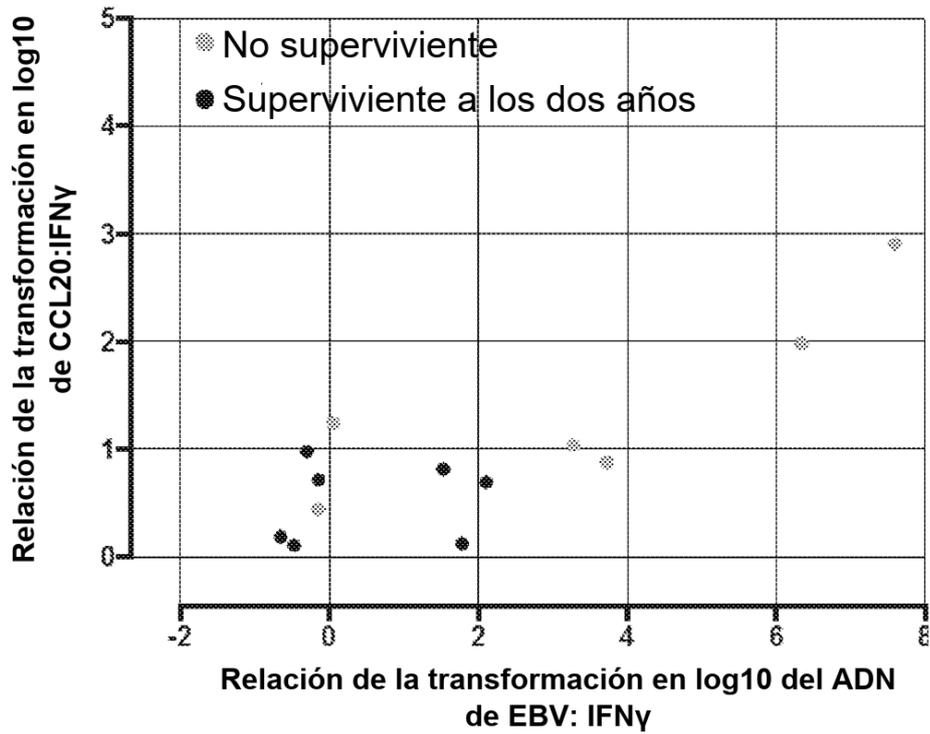


Figura 7A

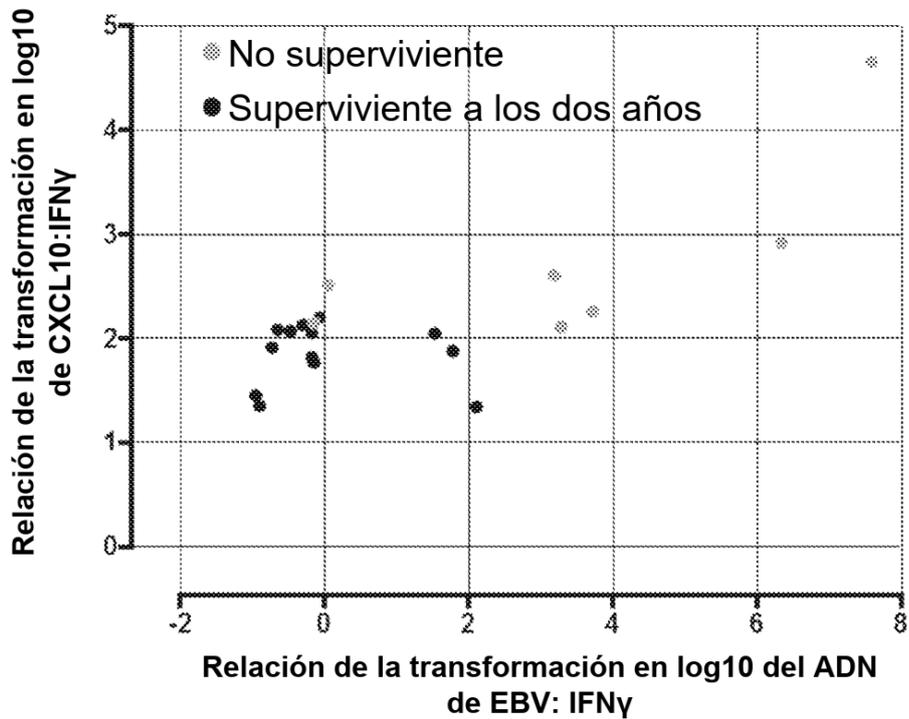


Figura 7B

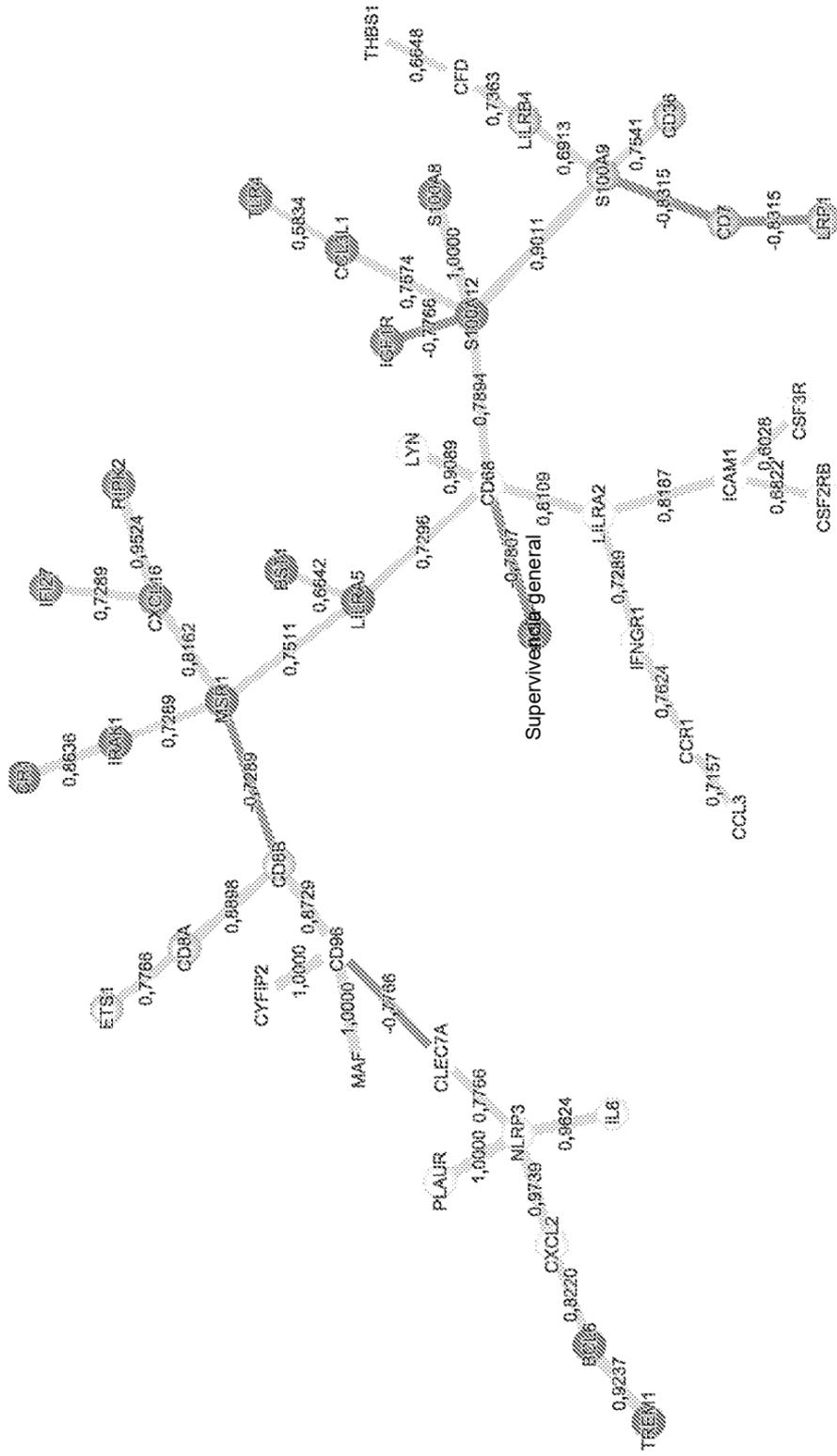


Figura 8

Tabla 3

Nodo	Comentario	Prueba G	Valor de P	Nodo	Comentario	Prueba G	Valor de P
CD68		25,6321	0,00%	RIPK2		14,9087	0,49%
LYN		18,9824	0,08%	CFD		6,8513	3,25%
S100A12		16,0967	0,03%	CCL3		9,4611	0,88%
S100A8		16,0967	0,03%	IRAK1		12,6548	0,18%
LILRA5		19,5592	0,06%	CD8B		12,6548	0,18%
LILRA2		12,6548	0,18%	CD8A		8,9097	1,16%
CCL3L1		13,1642	1,05%	CR1		17,7032	0,14%
S100A9		12,4488	0,20%	CD96		9,6182	0,82%
ICAM1		13,4633	0,92%	CYFIP2		9,6182	0,82%
IGF1R		9,6182	0,82%	MAF		9,6182	0,82%
CD7		11,1156	0,39%	IFI27		12,6548	0,18%
LILRB4		21,4721	0,03%	CSF3R		4,2733	11,81%
CD36		16,1435	0,28%	THBS1		11,6529	0,29%
BST1		13,3248	0,98%	ETS1		4,2473	11,96%
IFNGR1		7,8656	1,96%	CLEC7A		16,0967	0,03%
TLR4		8,6354	7,09%	CXCL2		11,7112	1,96%
LRP1		12,4488	0,20%	IL8		16,8312	0,21%
MSR1		15,5298	0,04%	PLAUR		9,6182	0,82%
CCR1		15,4178	0,39%	NLRP3		9,6182	0,82%
CSF2RB		12,3965	0,20%	TREM1		20,2311	0,05%
CXCL16		15,5298	0,04%	BCL6		8,9097	1,16%

Figura 9

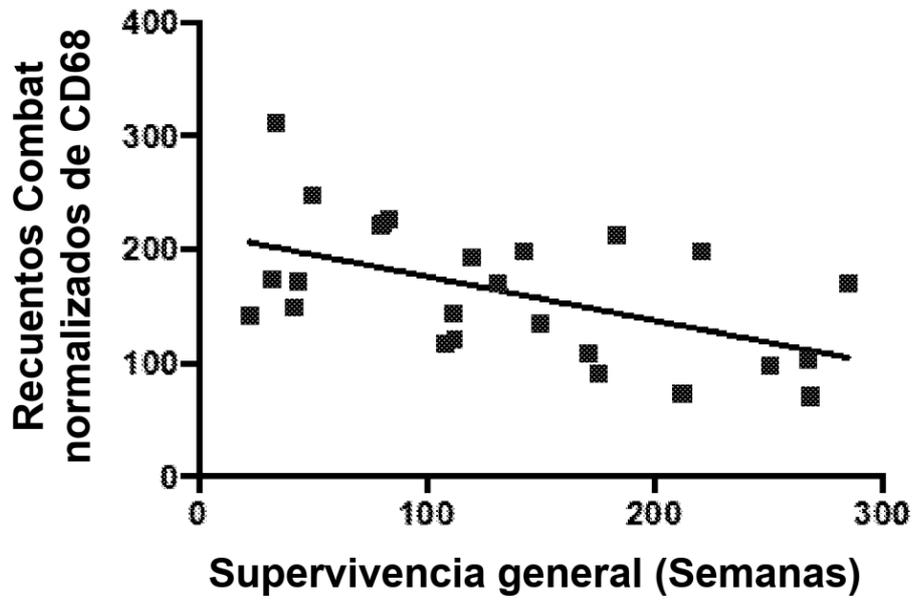


Figura 10A

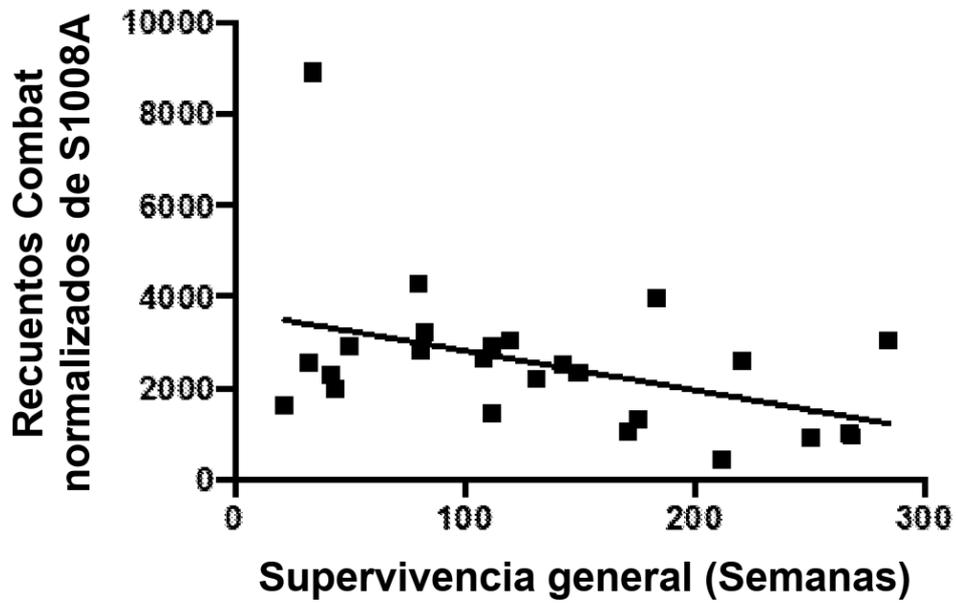


Figura 10B

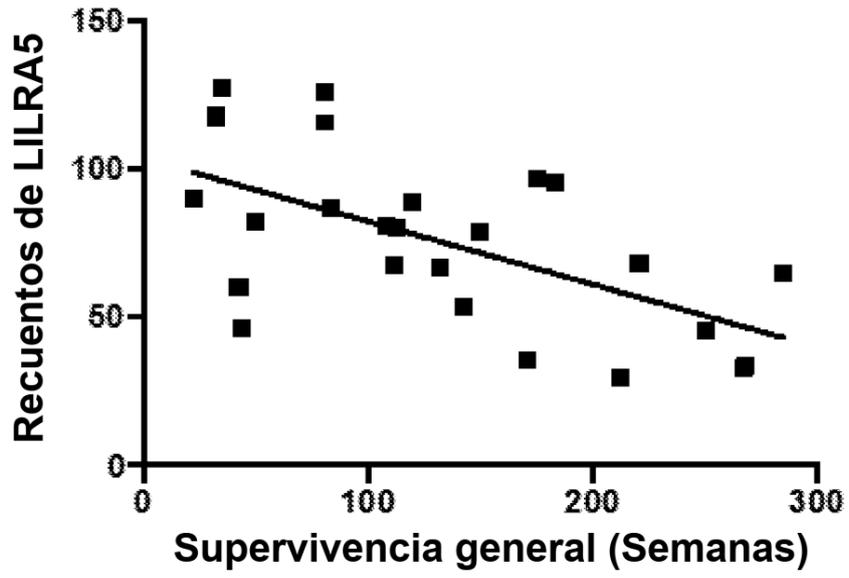


Figura 10C

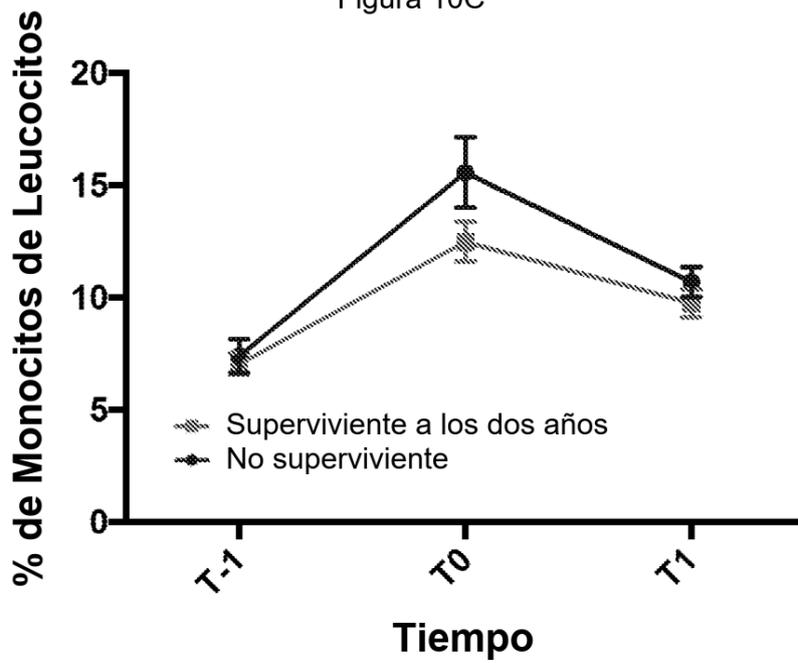


Figura 11A

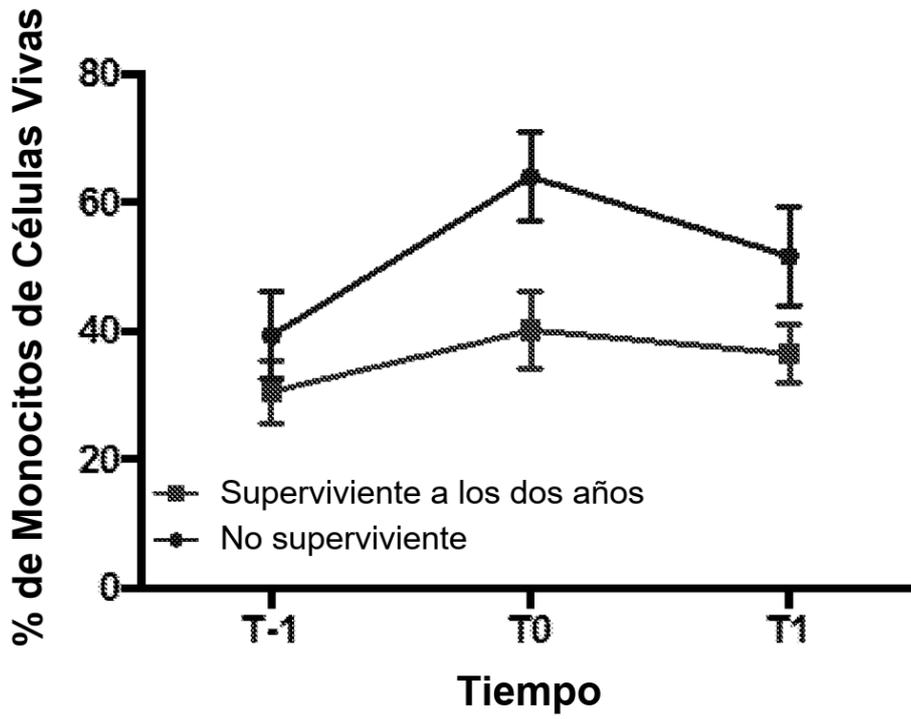


Figura 11B

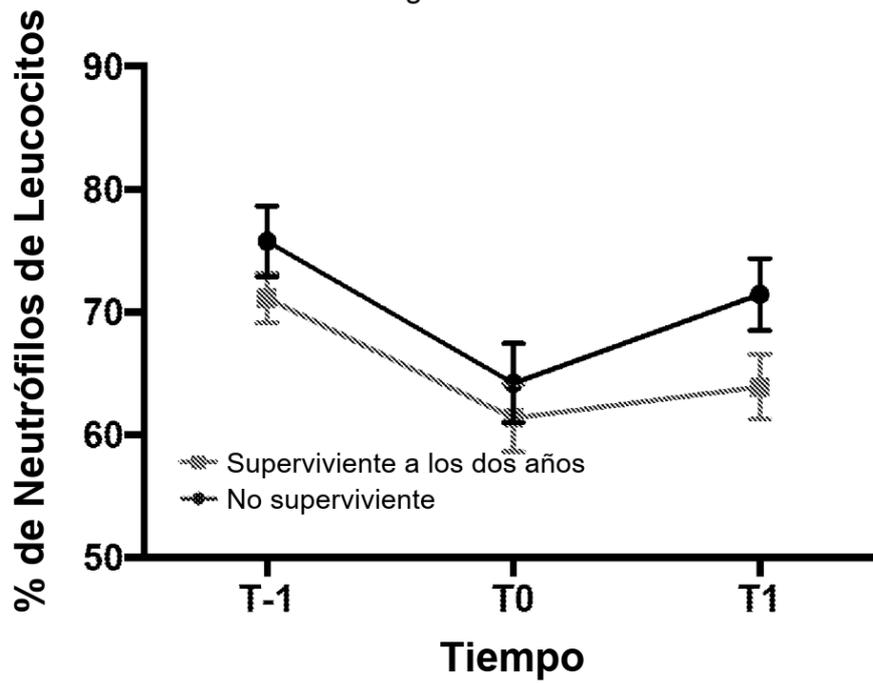


Figura 12A

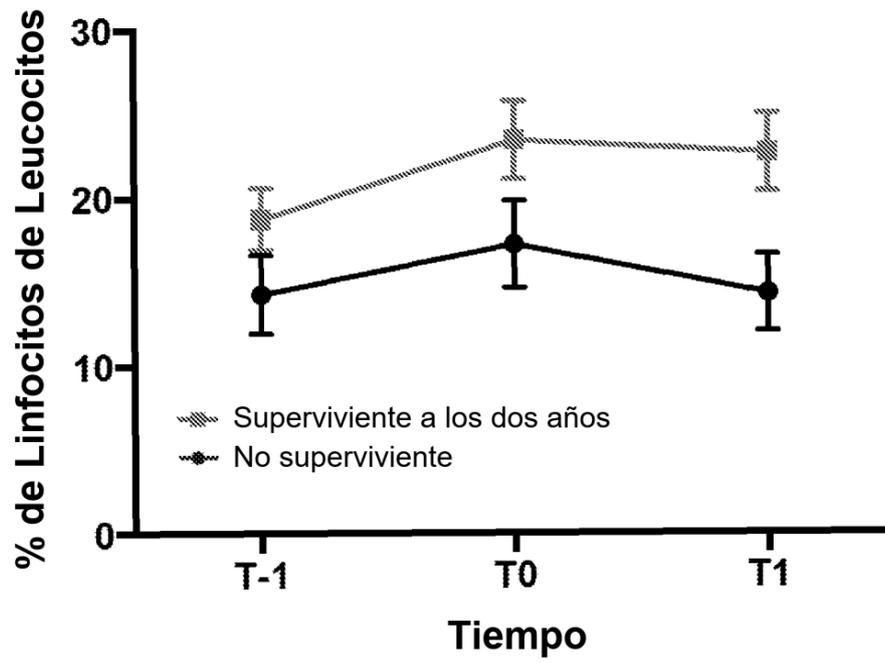


Figura 12B

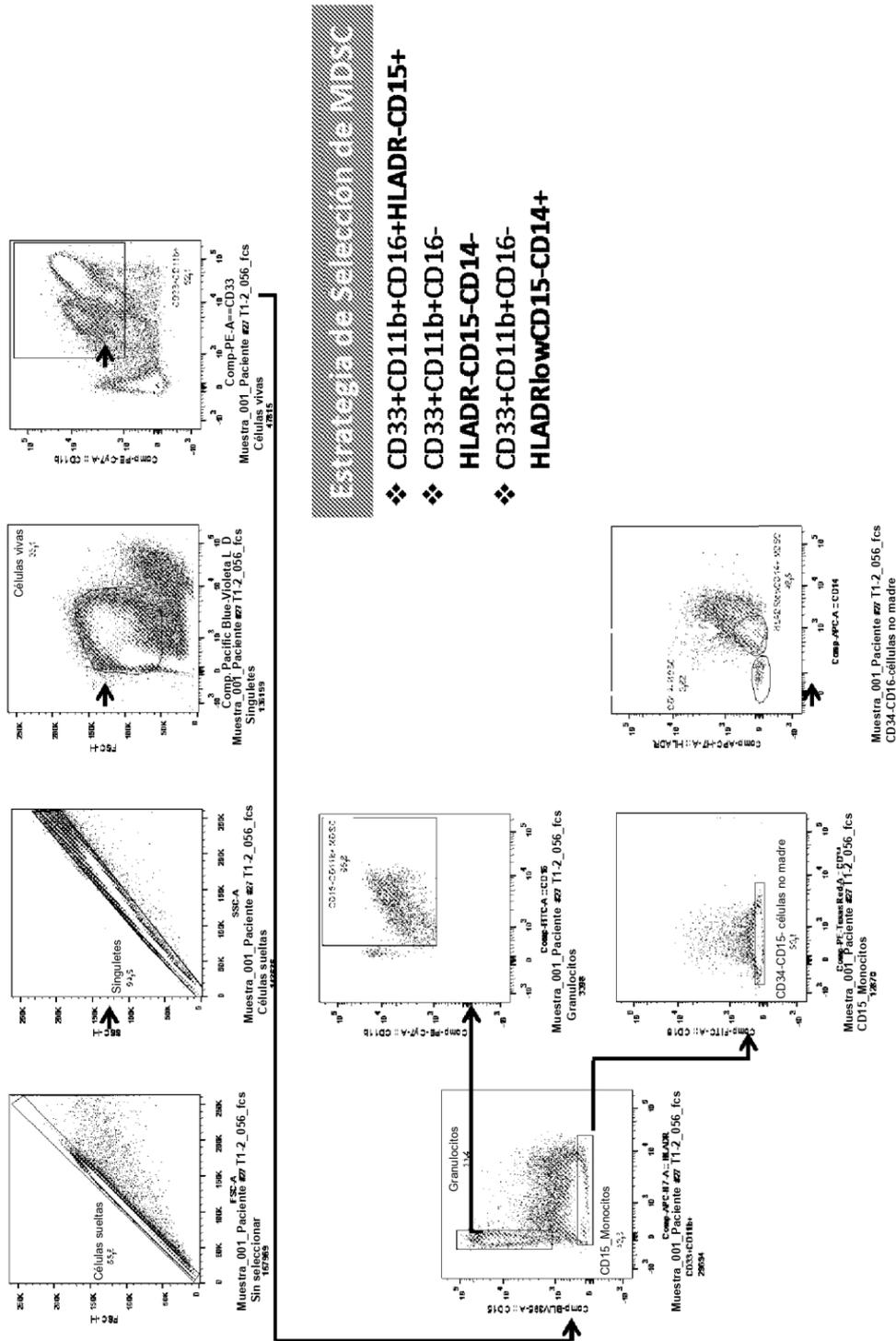


Figura 13

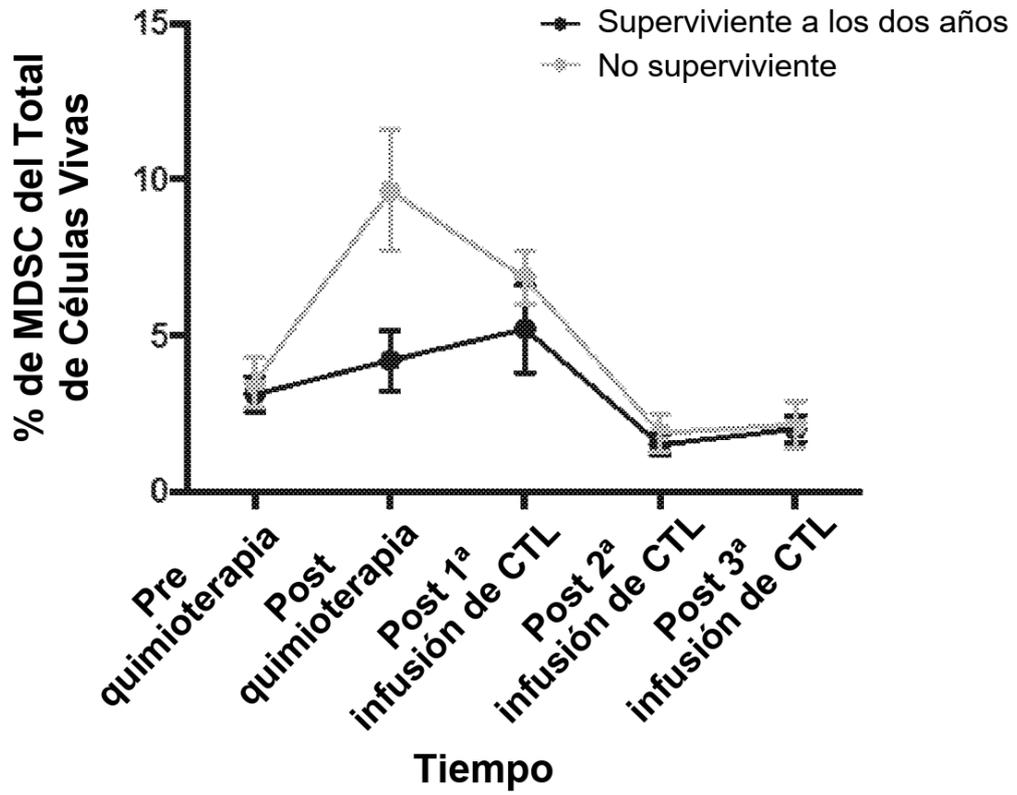


Figura 14A

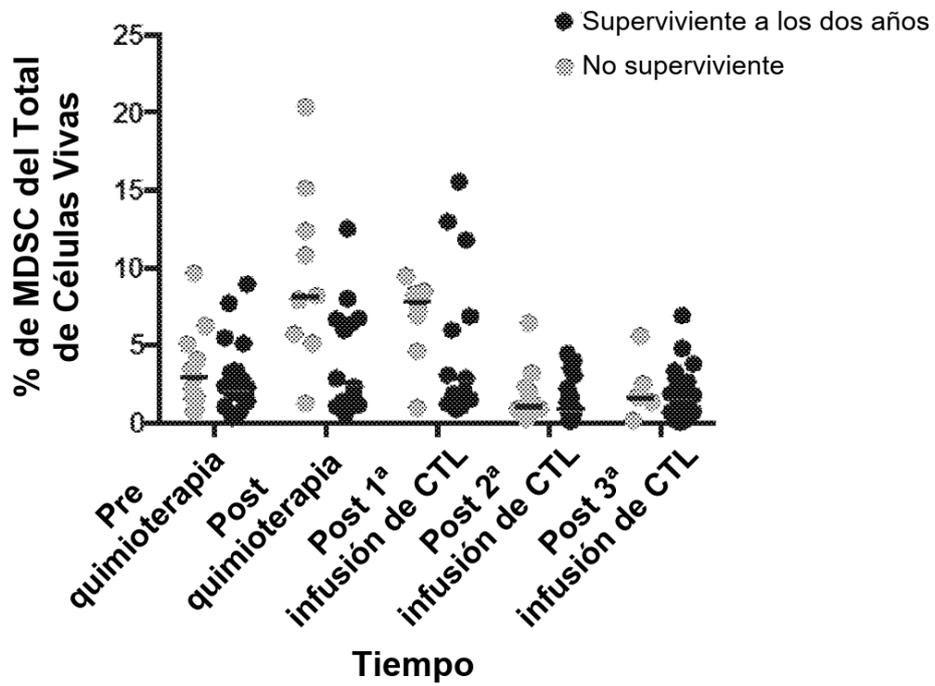


Figura 14B

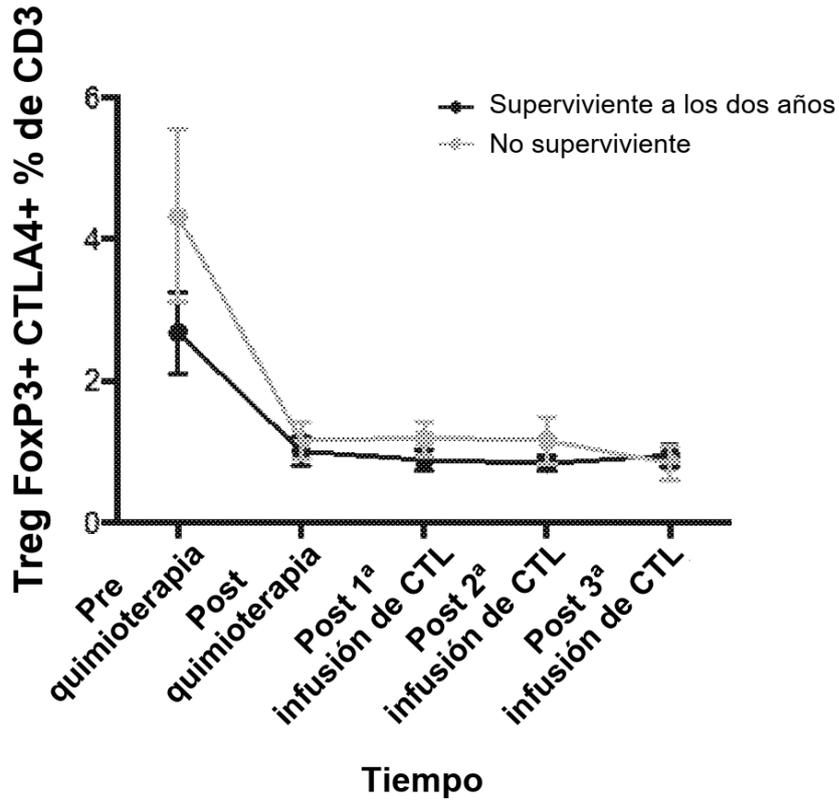


Figura 15

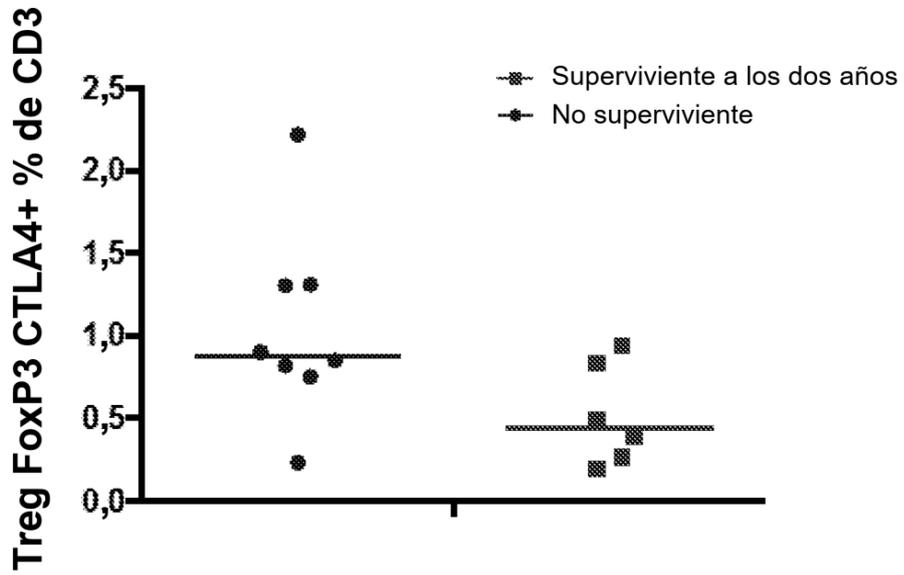


Figura 16A

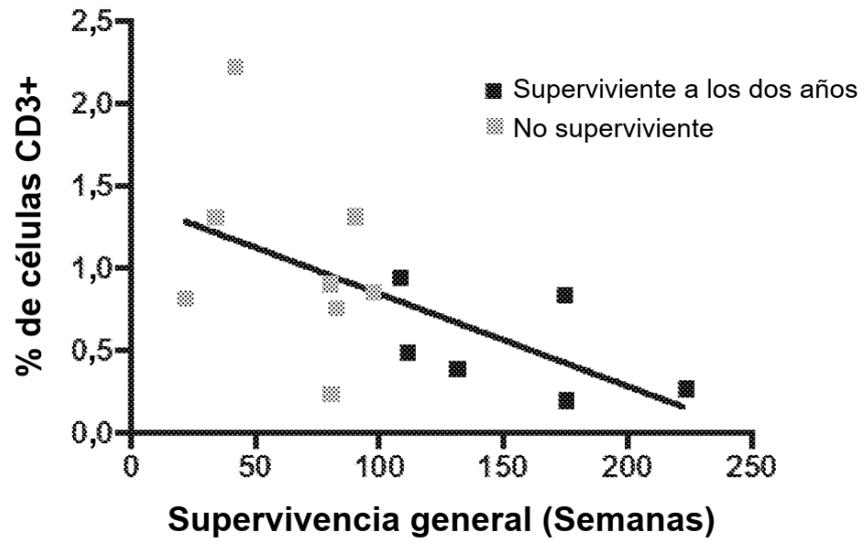


Figura 16B

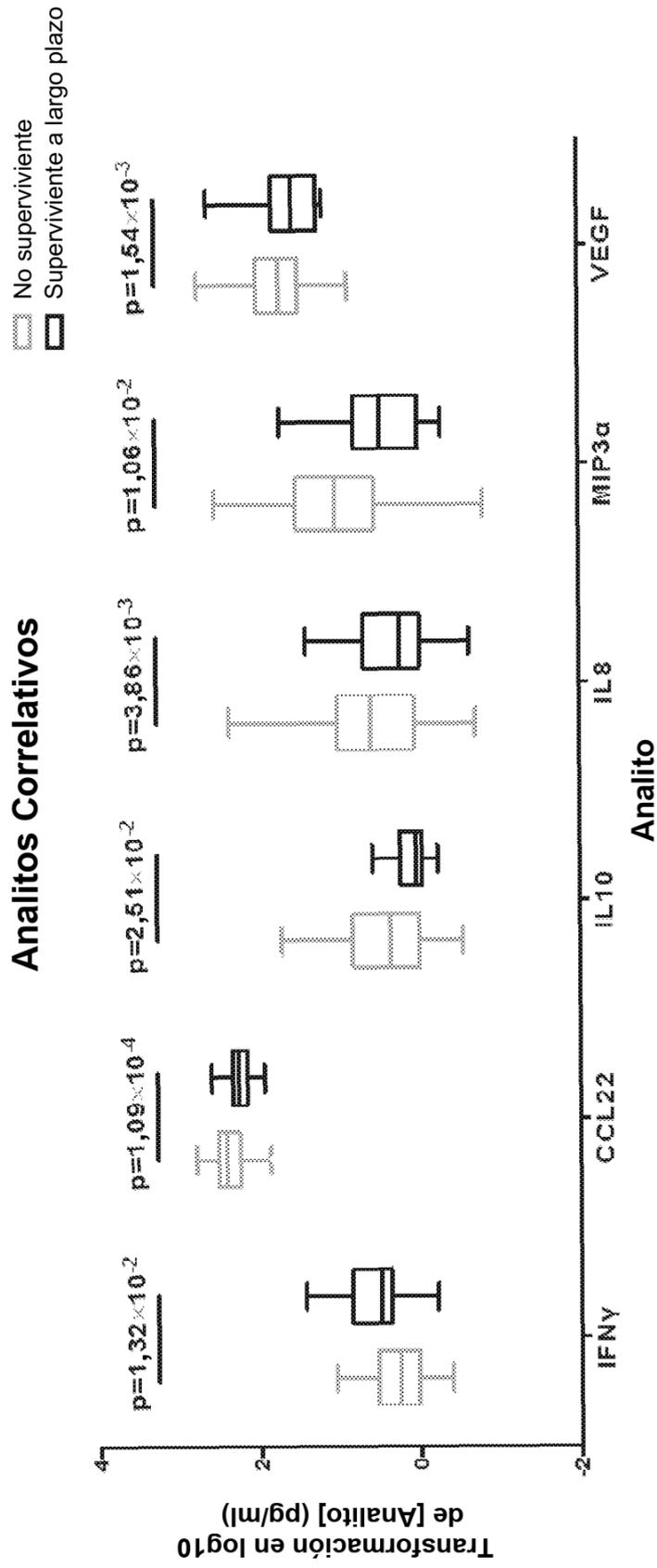


Figura 17

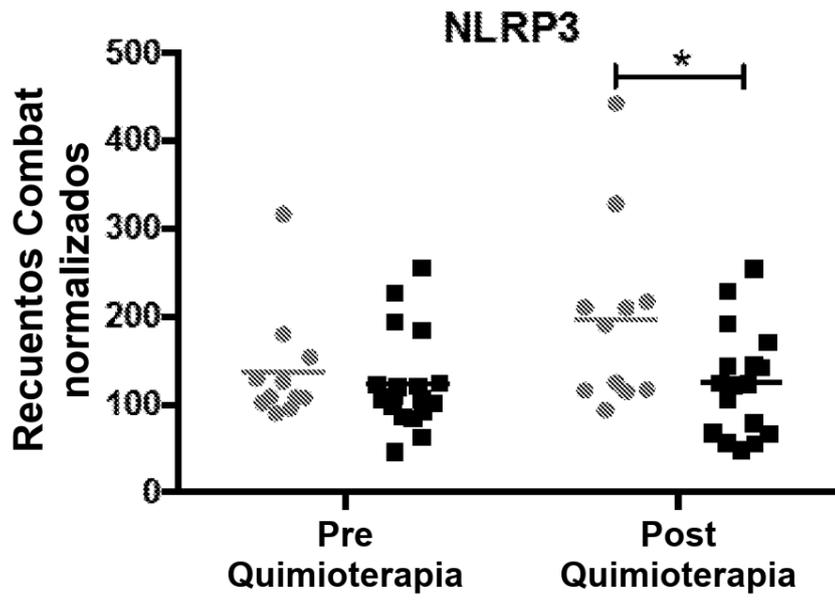


Figura 18A

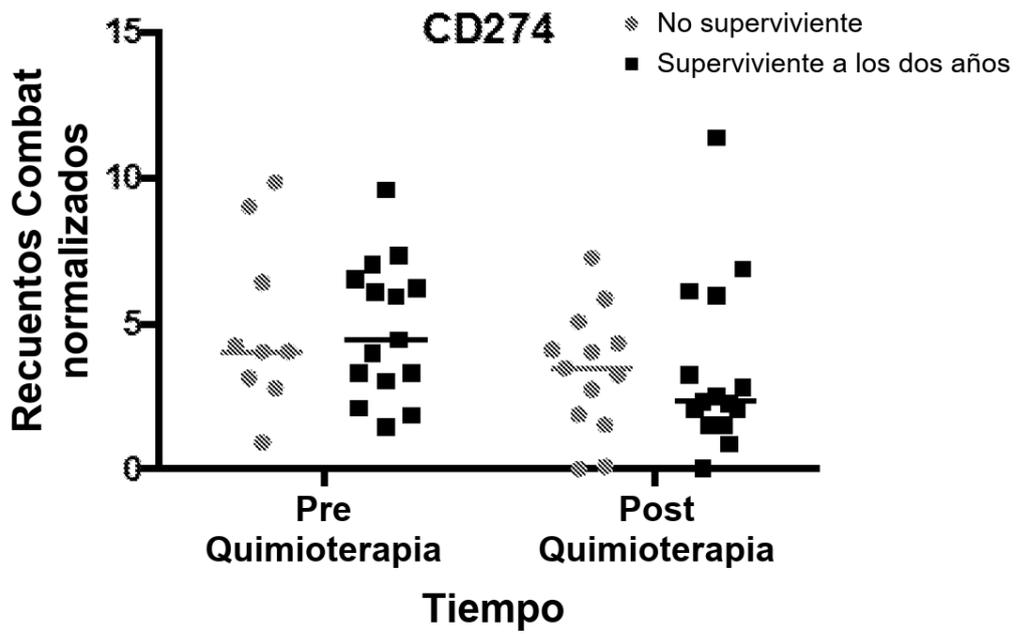


Figura 18B

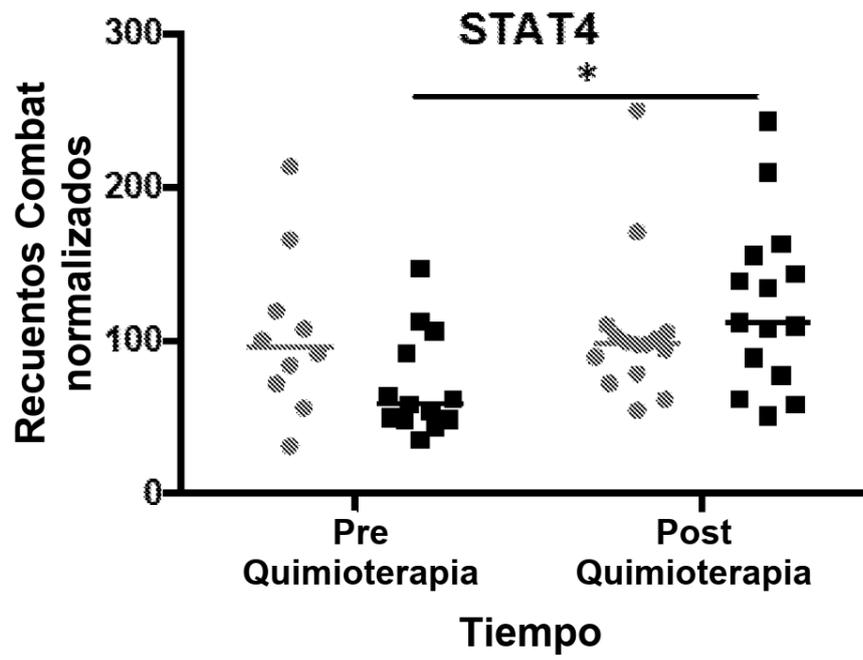


Figura 18C

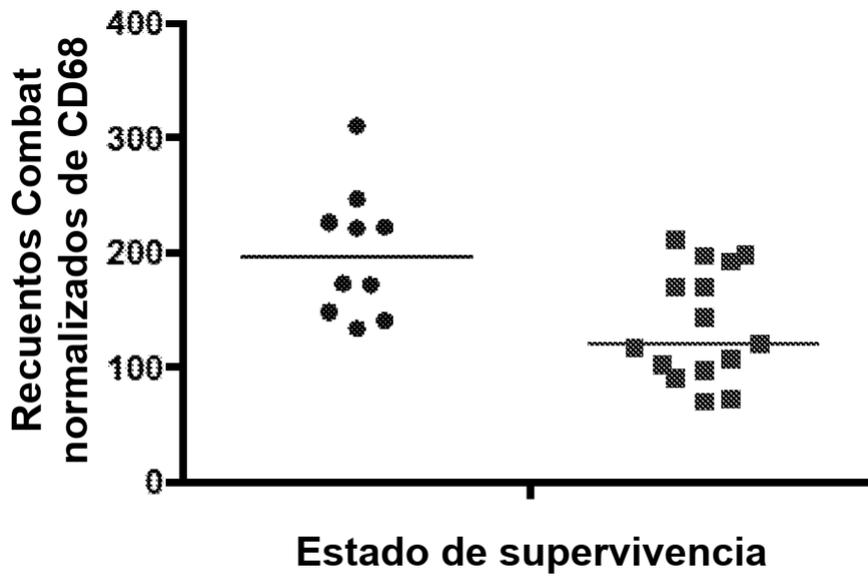


Figura 20A

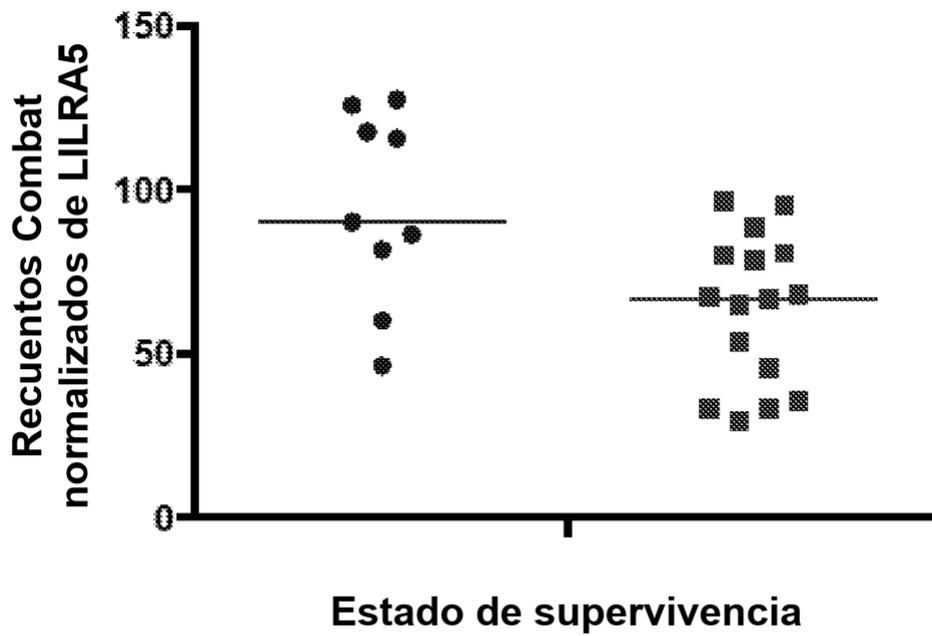


Figura 20B

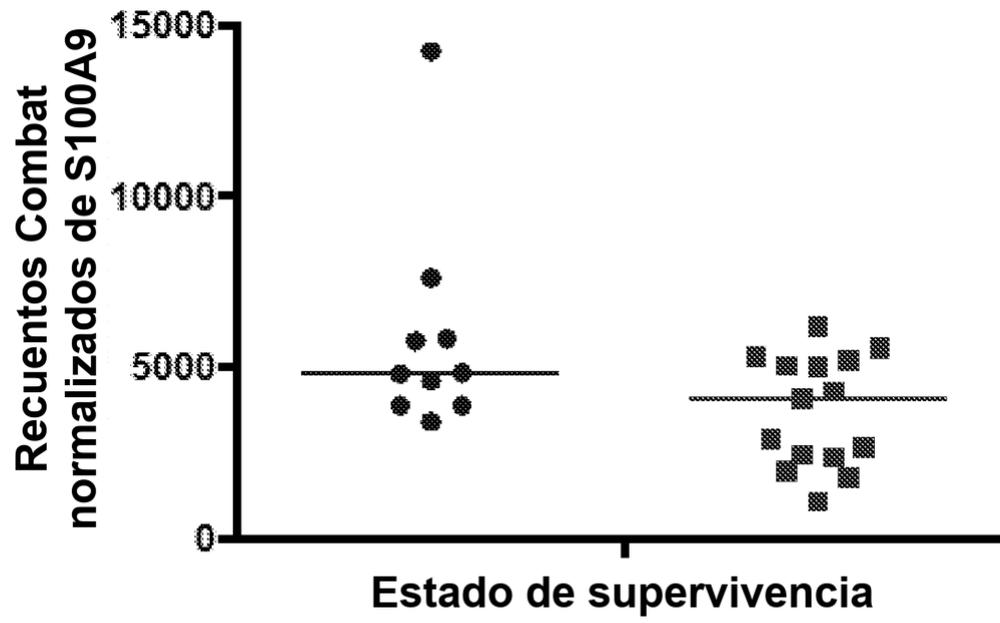


Figura 20C

Tabla 4

Nodo	Comentario	Prueba G (Datos)	Grados de libertad (Datos)	Valor de P (Datos)	Nodo	Comentario	Prueba G (Datos)	Grados de libertad (Datos)	Valor de P (Datos)
[Factor 0]	MIF_(5)	20,113	2	1,00E-06	[Factor 10]	S100A8_(4)	7,7176	1	5,50E-03
MIF		20,113	2	1,00E-06	S100A8		7,7176	1	5,50E-03
[Factor 4]	CD68_(5)	16,3703	2	3,00E-04	IF127		12,6548	1	4,00E-04
[Factor 5]	EBV_DNA_L_(4)	16,0967	1	1,00E-04	KLRB1		9,0687	2	1,07E-02
EBV_DNA_L		16,0967	1	1,00E-04	ETS1		6,889	1	8,70E-03
CXCL16		14,3274	1	2,00E-04	LILRA5		12,5729	2	1,90E-03
[Factor 16]	CXCL16_(3)	14,3274	1	2,00E-04	BST1		5,7712	2	5,58E-02
CD68		18,2503	2	1,00E-04	[Factor 21]	IFNGR1_(3)	11,0796	1	9,00E-04
RIPK2		12,1	2	2,40E-03	CD8B		20,6909	2	0,00E+00
CD3G		12,6548	2	1,80E-03	IFNGR1		7,8296	1	5,10E-03
MIP3a_L		12,6548	1	4,00E-04	LYN		9,0508	2	1,08E-02
S100A9		10,3436	2	5,70E-03	TLR2		7,7292	2	2,10E-02
IP-10_L		12,5729	2	1,90E-03	S100A12		4,2112	1	4,02E-02
[Factor 1]	LILRA5_(5)	15,8571	2	4,00E-04	CD7		5,2935	2	7,09E-02
FCGR2A		6,9438	2	3,11E-02	IRAK1		12,6548	1	4,00E-04
MSR1		14,3274	1	2,00E-04	[Factor 26]	THBS1_(2)	12,4806	1	4,00E-04
LGALS3		9,1628	1	2,50E-03	THBS1		18,2503	2	1,00E-04
PNMA1		8,0563	2	1,78E-02	TLR4		6,8957	2	3,18E-02
IL-6_L		7,7074	1	5,50E-03	LRP1		10,6121	2	5,00E-03
					CR1		9,6182	1	1,90E-03

Figura 21

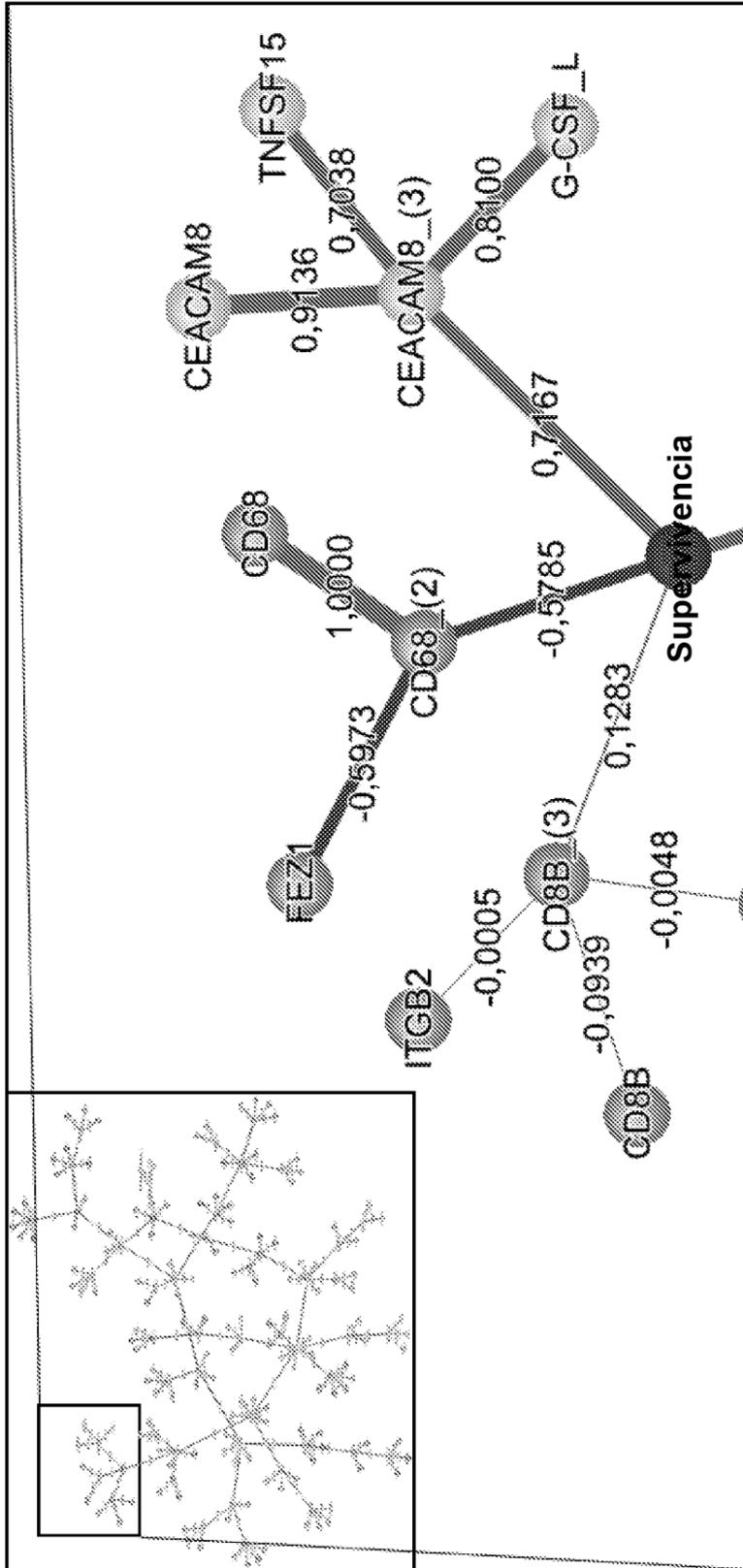


Figura 22

Tabla 5

Nodo	Comentario	Prueba G (Datos)	Grados de libertad (Datos)	Valor de P (Datos)	Nodo	Comentario	Prueba G (Datos)	Grados de libertad (Datos)	Valor de P (Datos)
[Factor 21]	CEACAM8_ (3)	17,0702	1	1,00E-06	FEZ1		8,7242	2	1,28E-02
[Factor 32]	CD8B_ (3)	15,3658	2	5,00E-04	LTB		10,1333	2	6,30E-03
[Factor 30]	TCF7_ (3)	13,9383	1	2,00E-04	IFITM1		4,1626	2	1,25E-01
CEACAM8		11,4761	1	7,00E-04	NFA1C3		8,429	1	3,70E-03
CD8B		11,9131	2	2,60E-03	CD96		9,4495	2	8,90E-03
CD8A		12,5173	2	1,90E-03	[Factor 15]	ITK_ (4)	9,692	1	1,90E-03
CD28		11,1181	1	9,00E-04	ITK		9,692	1	1,90E-03
CD68		11,1181	1	9,00E-04	LCK		6,8478	2	3,26E-02
[Factor 43]	CD68_ (2)	11,1181	1	9,00E-04	IL7R		14,7743	1	1,00E-04
TCF7		8,7262	1	3,10E-03	LRRN3		12,8737	2	1,60E-03
G-CSF_L		8,7262	1	3,10E-03	[Factor 1]	CD5_ (5)	10,0575	3	1,81E-02
CXCR3		6,781	2	3,37E-02	[Factor 33]	IL2RG_ (3)	9,6147	2	8,20E-03
TNFSF15		6,3319	1	1,19E-02	KLRB1		6,2338	1	1,25E-02
[Factor 3]	ETS1_ (5)	11,7656	2	2,80E-03	[Factor 20]	IL16_ (4)	6,2359	2	4,42E-02
ITGB2		4,4714	2	1,07E-01	ITGA6		2,8375	2	2,42E-01
ETS1		11,2922	1	8,00E-04	CD3E		6,5831	2	3,72E-02
[Factor 57]	JAK3_ (2)	4,2493	1	3,93E-02	CD5		6,2623	2	4,37E-02
JAK3		7,1161	2	2,85E-02	IL21R		6,4683	2	3,94E-02
CCR7		4,7404	2	9,35E-02	FLT3LG		6,6811	2	3,54E-02
[Factor 50]	CCR7_ (2)	4,5497	1	3,29E-02	[Factor 36]	FLT3LG_ (3)	6,0297	1	1,41E-02

Figura 23