

COMBINACIONES DE DIHIDROCLORURO DE HISTAMINA Y USO DE ESTAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto, evitar o retrasar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión, prolongar la remisión del cáncer, aumentar la supervivencia, y disminuir o aliviar los síntomas del cáncer que comprende a) administrar
10 dihidrocloruro de histamina y un inhibidor de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1)/ligando 1 de la muerte programada (PD-L1) o b) administrar opcionalmente un agente que disminuye las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), junto con un agonista del receptor de histamina. La presente invención proporciona,
15 además, métodos para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer basado en una redistribución de las células T citotóxicas, frecuencia de células NK, u otros cambios bioquímicos, y métodos relacionados para evitar la recaída al cáncer y para prolongar la remisión de un cáncer. Además, se proporcionan kits y composiciones
20 relacionadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El dihidrocloruro de histamina se deriva de la amina biogénica histamina.
25 Suprime la producción de especies reactivas de oxígeno que inhiben las funciones de las células T y las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), lo que incluye su capacidad de respuesta a las citocinas inmunoactivadoras. La coadministración de la citocina interleucina (IL)-2 y dihidrocloruro de histamina ayuda a la activación de las células T y las
30 células NK por la IL-2, lo que conduce a la destrucción de las células cancerosas, lo que incluye aquellas de la leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés).

Los pacientes diagnosticados con leucemia mieloide aguda (AML) reciben quimioterapia de inducción con el objetivo de alcanzar la desaparición microscópica de las células leucémicas y la reaparición de la hematopoyesis normal (remisión completa, CR, por sus siglas en inglés). La fase posterior a la remisión incluye la quimioterapia de consolidación con el objetivo de erradicar las células leucémicas indetectables. Sin embargo, la recaída en CR es común, en particular en pacientes de mayor edad (>60 años), y explica significativamente por qué solo una minoría de pacientes con AML adultos alcanzan una supervivencia libre de leucemia a largo plazo (LFS, por sus siglas en inglés). La perspectiva de una supervivencia a largo plazo después de una recaída de AML es pobre. Por lo tanto, se necesita críticamente un método para evitar la recaída de AML en CR y otros cánceres.

Además, los investigadores son conscientes de que los tratamientos contra el cáncer con frecuencia no son eficaces óptimamente porque, aunque el sistema inmunitario puede reconocer células tumorales, puede de todas maneras permanecer quiescente debido a mecanismos inhibidores que limitan o apagan la respuesta antitumoral. Por ejemplo, se descubrieron moléculas de superficie de células T reguladoras negativas que se regulan positivamente en células T activadas para disminuir su actividad, lo que resulta en una muerte menos eficaz de las células tumorales. Estas moléculas inhibitoras se denominaron moléculas coestimuladoras negativas debido a su homología con la molécula CD28 coestimuladora de células T. Estas proteínas, también denominadas proteínas de punto de control inmunitario, funcionan en múltiples vías, lo que incluye la atenuación de las señales de activación temprana, la competencia por la coestimulación positiva y la inhibición directa de las células presentadoras de antígeno.

Una proteína de punto de control inmunitario, PD-1 (proteína 1 de la muerte celular programada) también conocida como CD279 (conglomerado de diferenciación 279), se expresa en células T y B activadas, así como también en monocitos implicados en la regulación del equilibrio entre activación inmunitaria y tolerancia. El principal papel de PD-1 es presumiblemente limitar la actividad de las células T en la periferia durante una respuesta inflamatoria a la infección y limitar la autoinmunidad. Los ligandos de PD-1 B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2 se regulan positivamente en respuesta a diversas citocinas proinflamatorias y pueden unirse a PD-1 en células T activadas en tejidos inflamados, lo que limita de esta manera la respuesta inmunitaria.

Los ligandos de PD-1 se expresan en niveles superiores a los normales en muchos tumores humanos, tales como carcinomas de pulmón, ovario y colon, y melanomas, donde inhiben las respuestas de células T antitumorales locales mediante su unión a PD-1 en linfocitos infiltrantes de tumor. La inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 puede mejorar las respuestas de células T in vitro y mediar la actividad antitumoral preclínica.

El uso de inhibidores del punto de control inmunitario (ICI, por sus siglas en inglés), tales como PD-1, parece representar un enfoque prometedor para la inmunoterapia del cáncer mejorada. Sin embargo, la combinación de inhibidores de PD-1/PD-L1 con otros medios de activación inmunitaria, lo que incluye vacunas, a menudo no condujo a la mejora esperada de la inmunoterapia.

Por lo tanto, se necesita un medio seguro y eficaz para una terapia basada en el tratamiento con ICI, basada particularmente en los inhibidores de la vía PD-1, en particular para una terapia de tumor, cáncer y/o enfermedades infecciosas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la carga tumoral en un sujeto con cáncer primario o metastásico que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera la carga tumoral en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir el riesgo de diseminación tumoral metastásica en un sujeto con cáncer activo que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera el riesgo de diseminación tumoral metastásica en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para evitar o retrasar la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica del cáncer en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que evita o retrasa de esta manera la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para evitar la recaída a un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular

programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que evita de esta manera la recaída de dicho cáncer en dicho sujeto en remisión de dicho cáncer.

5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para retrasar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que retrasa de esta manera la
10 recaída de dicho cáncer en dicho sujeto en remisión de dicho cáncer.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de
15 histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que prolonga de esta manera la remisión de dicho cáncer en dicho sujeto.

20 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la supervivencia de un sujeto en remisión de un cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular
25 programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que aumenta de esta manera la supervivencia de dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar el tiempo de supervivencia de un sujeto en remisión de un
30 cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de

la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que prolonga de esta manera el tiempo de supervivencia de dicho sujeto.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir el crecimiento tumoral maligno en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera el crecimiento del tumor maligno en dicho sujeto.

- En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para disminuir o aliviar los síntomas del cáncer en un sujeto en remisión de un
15 cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que disminuye o alivia de esta manera dichos síntomas de cáncer en dicho sujeto.

- 20 En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende a) una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del
25 ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) e instrucciones para el uso de dicho kit.

- En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que
30 comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento

propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8⁺ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que hay una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T efectoras (T_{eff}) en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay redistribución de células T citotóxicas en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer no será eficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para evitar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8⁺ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, y e) administrar ciclos adicionales de dicho tratamiento a dicho sujeto si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que haya una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T efectoras T (T_{eff}) en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, lo que evita de esta manera la recaída de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8⁺ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, y e) administrar ciclos adicionales de dicho tratamiento a dicho sujeto si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que haya una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T efectoras (T_{eff}) en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, lo que prolonga de esta manera la remisión de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prevenir la recaída a la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto con AML en remisión completa (CR) después de la quimioterapia que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un primer ciclo de dihidrocloruro de histamina e interleucina-2 (IL-2) a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho primer ciclo de tratamiento; d) medir la distribución de fenotipos de células T citotóxicas CD8⁺ en dicha muestra de sangre; y e) administrar ciclos adicionales de dihidrocloruro de histamina e IL-2 a dicho sujeto si hay una redistribución de las células T citotóxicas en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, de manera que hay una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de las células T efectoras (T_{eff}), lo que evita de esta manera la recaída a AML en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir los fenotipos citotóxicos CD8+ e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir la frecuencia de células NK en dicha primera muestra de sangre y en dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay un aumento en la frecuencia de células NK en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay aumento en la frecuencia de células NK en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento de cáncer no será eficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir los niveles de expresión de un biomarcador en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en

donde si hay un aumento en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay aumento en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento de cáncer será ineficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir los niveles de expresión de un biomarcador en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay una disminución en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay disminución en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer no será eficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de:

administrar una cantidad terapéutica de un agente que disminuye las especies reactivas de oxígeno (ROS) a dicho sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

El objeto considerado como la invención se señala particularmente y se reivindica claramente en la porción conclusiva de la descripción. La invención, sin embargo, tanto en organización como en método de operación, junto con objetivos, características y ventajas de esta, puede entenderse mejor por referencia a la descripción detallada siguiente cuando se lee con las figuras adjuntas en las que:

10

Figura 1. Tamaño tumoral individual de cada sujeto en los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra el tamaño del tumor para cada sujeto en los grupos de tratamiento control (n=29), histamina (n=29), α -PD1/PDL1 (n=8) e histamina + α -PD1/PDL1 (n=8) en los días 8, 11 y 13 durante la progresión tumoral. El tamaño del tumor se indica como % del control, donde el 100 % era el tamaño medio de los tumores del control 2 semanas después de la inoculación del tumor.

15

20

Figura 2. Tamaño medio del tumor en los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra la media $\pm$ error estándar de la media (s.e.m., por sus siglas en inglés) del tamaño tumoral en los grupos de tratamiento control (n=29), histamina (n=29), α -PD1/PDL1 (n=8) e histamina + α -PD1/PDL1 (n=8) en los días 8, 11 y 13 durante la progresión del tumor. Los grupos se compararon estadísticamente mediante el uso de un ANOVA de dos vías. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Todos los valores de p indicados son bilaterales. El tamaño del tumor se indica como % del control, donde el 100 % era el tamaño medio de los tumores del control 2 semanas después de la inoculación del tumor.

25

30

Figura 3. Tamaño del tumor en los cuatro grupos de tratamiento.

El tamaño de los tumores en los cuatro grupos de tratamiento se muestra como diagramas de caja en los puntos de tiempo respectivos de la medición del tumor. Los cuadros muestran los cuartiles 25^{to} y 75^{to} del tamaño del tumor con la mediana del tamaño del tumor indicada por una línea horizontal. Los bigotes indican los valores más altos y más bajos del tamaño del tumor. Los valores de p se calcularon mediante el uso de la prueba t de Student. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. Todos los valores de p indicados son bilaterales. El tamaño del tumor se indica como % del control, donde el 100 % era el tamaño medio de los tumores del control 2 semanas después de la inoculación del tumor.

Figura 4. Descripción general del ensayo fase IV Re:Mission.

Los pacientes con AML elegibles en la primera remisión completa (CR) recibieron diez ciclos de 3 semanas de HDC/IL-2 durante 18 meses. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de la sangre colectada antes y después de los ciclos 1 y 3. Los pacientes fueron seguidos durante 6 meses después de completar el último ciclo de tratamiento.

Figura 5. Pacientes analizados. Diagrama de flujo que muestra el número de pacientes incluidos en el estudio y el número de muestras analizadas exitosamente.

Figura 6. Distribución de subconjuntos CD8⁺ en pacientes con AML sin recaída y con recaída durante la inmunoterapia con HDC/IL-2. (A)

Conteos sanguíneos de células T CD8⁺ antes (ciclo 1, día 1, C1D1) y después (C1D21) del primer y tercer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2 (C1D1 n=62; C1D21 n=54; C3D1 n=52; C3D21 n=51). **(B)** Estrategia de clasificación para determinar células vírgenes (T_N; CD45RA⁺CCR7⁺), de memoria central (T_{CM}; CD45RO⁺CCR7⁺), de memoria efectora (T_{EM};

CD45RO⁺CCR7⁻) y efectoras (T_{eff}; CD45RA⁺CCR7⁻) dentro del compartimiento de células T CD8⁺. **(C-F)** Frecuencia de las subpoblaciones de células T CD8⁺ T_N **(C)**, T_{CM} **(D)**, T_{EM} **(E)** y T_{eff} **(F)** en pacientes sin recaída (n=18) y con recaída (n=26) al inicio (C1D1) o al final (C1D21) del primer ciclo de inmunoterapia. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student pareada.

Figura 7. Impacto de los subconjuntos CD8+ al inicio de la inmunoterapia en la LFS. Los pacientes se dicotomizaron en base al porcentaje medio de células T CD8⁺ T_N (A) T_{CM} (B), T_{EM} (C) y T_{eff} (D) en muestras de sangre colectadas antes del primer ciclo de tratamiento de HDC/IL-2. La LFS se analizó mediante la prueba de rangos logarítmicos.

Figura 8. Impacto de la distribución alterada de subconjuntos CD8+ en el resultado clínico de pacientes que reciben HDC IL-2. En (A-D) todos los pacientes, y en (F) los pacientes > 60 años, se dicotomizaron en base a la inducción o reducción de la frecuencia de subconjuntos de células T CD8⁺ durante el primer ciclo de tratamiento, seguido por el análisis de LFS y OS mediante la prueba de rangos logarítmicos. En (E) todos los pacientes, y en (J) los pacientes > 60 años de edad, se dicotomizaron en base a la transición (trans) o ninguna transición de células T_{EM} a T_{eff}, y la LFS y la OS se analizaron mediante la prueba de rangos logarítmicos. Un paciente se consideró positivo a la transición por la aparición de una reducción de las células T_{EM} (%) y una inducción simultánea de células T_{eff} (%) durante el primer ciclo de tratamiento.

Figura 9. Correlación negativa entre los cambios en la distribución de células T_{EM} y T_{eff} durante la inmunoterapia. Se correlacionaron los cambios en la frecuencia de T_{EM} (eje-y) y T_{eff} (eje-x) CD8⁺ durante el primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2. Los pacientes sin recaídas se

marcan con puntos rojos, mientras que los pacientes con recaídas se marcan con puntos negros.

Figura 10. Distribución de poblaciones de células T CD8+ en pacientes de menor edad y de mayor edad que recibieron HDC/IL-2.

(A-D) Frecuencia de las subpoblaciones de células T_N , T_{CM} , T_{EM} y T_{eff} CD8+ en pacientes <60 años (n=17) y pacientes >60 años (n=27) antes (ciclo 1, día 1; C1D1) o después (C1D21) del ciclo 1 de la inmunoterapia con HDC/IL-2. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student pareada. En (E-L) los pacientes <60 años de edad se dicotomizaron en base a la inducción o reducción de la frecuencia de los diferentes subconjuntos CD8+ durante el primer ciclo de tratamiento, seguidos de los análisis de la LFS y la OS mediante la prueba de rangos logarítmicos. En (M-N), los pacientes <60 años de edad se dicotomizaron en base a la transición o ninguna transición de células T_{EM} a T_{eff} , y la LFS y la OS se analizaron mediante la prueba de rangos logarítmicos.

Figura 11. Expresión de marcadores de activación en células T CD8+ durante la inmunoterapia con HDC/IL-2.

Frecuencia de células (A) CD25+ y (B) CD69+ dentro de la población **CD3+CD8+** (ciclo 1, día 1; C1D1 n=62; C1D21 n=63). (C) Intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de HLA-DR en células T CD3+ CD8+ (n=44). (D) Las muestras de sangre colectadas al inicio (C1D1) o al final (C1D21) del primer ciclo de inmunoterapia se estimularon con PMA/ionomicina seguido por tinción intracelular de IFN- γ . Los diagramas de caja muestran la frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN- γ antes y después del primer ciclo de tratamiento (C1D1 n=58; C1D21 n=63). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student pareada. La reducción de la intensidad de HLA-DR durante el ciclo 1 (que se muestra en el panel C) se mantuvo significativa estadísticamente en el análisis no paramétrico (prueba de rango con signo de Wilcoxon, P=0.0003).

Figura 12. Impacto de la expresión de HLA-DR y las células T CD8⁺ específicas de la leucemia en la LFS en pacientes que recibieron HDC/IL-2.

(A) Los pacientes se dicotomizaron mediante la expresión media de HLA-DR en células T CD3⁺CD8⁺ al inicio de la terapia (C1D1, n=44) o después del primer ciclo de tratamiento (C1D21; n=47). La LFS y la OS se analizaron mediante la prueba de rangos logarítmicos. **(B-C)** Se estimularon muestras de sangre de pacientes sometidos a tratamiento con HDC/IL-2 con un conjunto de péptidos de antígenos asociados a la leucemia (péptidos de AML) o un conjunto de péptidos de CMV, EBV y virus de la influenza (péptidos de CEF), o sin péptidos (control negativo). El porcentaje de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ se determinó por citometría de flujo. En **(B)** diagramas de puntos representativos muestran la producción de IFN- γ en muestras sin estimulación y muestras estimuladas con péptidos de AML o CEF. En **(C)** los pacientes se dicotomizaron en base a la presencia o ausencia de células T CD8⁺ específicos de la AML o CEF, seguidos del análisis de la LFS mediante la prueba de rangos logarítmicos. En los últimos análisis solo se consideraron los pacientes sin eventos que se produjeran antes del último punto de análisis de las células T específicas de antígeno (C3D21; 105 días).

Figura 13. Impacto de la transición de células T_{EM} a T_{eff} y expresión de NKp46 de células NK sobre el resultado clínico.

(A-B) Los pacientes se consideraron positivos a la transición cuando mostraron una reducción de células T_{EM} (%) y una inducción simultánea de células T_{eff} (%) durante el primer ciclo de tratamiento, y se consideraron NKp46^{alta} cuando sus células NKCD16⁺ expresaron niveles superiores a la mediana de NKp46 después del primer ciclo de inmunoterapia (C1D21). Los datos muestran la LFS y la OS (analizadas mediante la prueba de rangos logarítmicos para la tendencia) de pacientes con transición T_{EM}-T_{eff} y

NKp46^{alta} (ambos), solo transición, solo NKp46^{alta}, sin transición T_{EM}-T_{eff} y baja expresión de NKp46 (ninguno).

Figura 14. Inducción y activación de células NK en pacientes por

debajo y por encima de los 60 años de edad. Los diagramas de caja en el panel A-F muestran el número de células NK CD16⁺ o CD56^{brillante} en sangre **(A y D)** y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de NKp30 **(B y E)** y NKp46 **(C y F)** en células NK CD16⁺ o CD56^{brillante} antes (C1D1) y después (C1D21) del primer ciclo de tratamiento de 21 días con HDC/IL-2 en pacientes <60 años (joven, blanco; conteos de células NK, $n = 17$, expresión de NCR, $n = 21$) y >60 años (viejo, gris; conteos de células NK, $n = 30$, expresión de NCR, $n = 35$). La inducción de los conteos de células NK y la expresión de NCR se analizaron mediante el uso de la prueba t de Student pareada.

Figura 15: Impacto de la expresión de NCR de las células NK en la supervivencia libre de leucemia (LFS) y la supervivencia general (OS, por sus siglas en inglés) en pacientes con AML de mayor edad.

En los paneles A-D, se muestran la LFS y la OS para pacientes de mayor edad (>60), dicotomizados en base a la mediana por encima (roja) o por debajo (negra) de NKp30 **(A y C)** o NKp46 **(B y D)** expresión en células NK CD16⁺ antes **(A y B)** o después **(C y D)** del primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2.

Figura 16. La inmunoterapia con HDC/IL-2 aumenta los conteos de glóbulos blancos y disminuye los niveles de monocitos en la sangre. Los paneles A-D muestran conteos de sangre periférica de **(A)** glóbulos blancos, **(B)** eosinófilos, **(C)** neutrófilos y **(D)** monocitos antes (día 1; D1) y después (día 21; D21) de ciclos 1 (C1) y 3 (C3) de inmunoterapia con HDC/IL-2. Se empleó la prueba t de Student pareada para analizar las diferencias entre puntos de tiempo. En los paneles, los pacientes **E-F** se dicotomizaron en base a la reducción media de monocitos durante el ciclo

1, seguido por el análisis de la LFS y la OS mediante la prueba de rangos logarítmicos.

Figura 17. Impacto de la expresión del H2R de histamina en la LFS y

la OS. Los paneles **A-B** muestran la expresión de H2R de monocitos **(A)** CD14++ y **(B)** CD16⁺ durante los ciclos de HDC/IL-2 según se analizaron mediante la prueba t de Student pareada. En los paneles **C-F** los pacientes se dicotomizaron en base a la expresión media de H2R (MFI) de monocitos **(C y E)** CD14++ o **(D y F)** CD16⁺ en ciclo 1 día 21 (C1D21) de inmunoterapia seguido de análisis de la LFS y la OS mediante la prueba de rangos logarítmicos.

Figura 18. Redistribución de marcadores de superficie mieloides durante la inmunoterapia con HDC/IL-2. El panel **A** muestra la

expresión de HLA-DR, CD40 y CD86 (MFI) en monocitos CD14⁺ en ciclos 1 y 3 en los días 1 y 21. Los paneles **B-D** muestran los datos de expresión correspondientes para **(B)** monocitos CD16⁺, **(C)** DC CD1c⁺ y **(D)** DC CD141⁺. Se empleó la prueba t de Student pareada para analizar las diferencias entre los puntos de tiempo.

Figura 19. La expresión de HLA-ABC en células mieloides predice la LFS durante el tratamiento con HDC/IL-2. Los paneles **A-D** muestran

la expresión de HLA-ABC en puntos de tiempo indicados para los subconjuntos siguientes de células mieloides: **(A)** monocitos CD14⁺, **(B)** monocitos CD16⁺, **(C)** DC CD1c⁺ y **(D)** DC CD141⁺. Se empleó la prueba t de Student pareada para analizar las diferencias entre los puntos de tiempo. En los paneles **E** (LFS) y **F** (OS) los pacientes se dicotomizaron en base a la expresión media de HLA-ABC de monocitos CD14⁺ en el ciclo 1 día 1 (C1D1) seguido del análisis de la LFS y la OS mediante la prueba de rangos logarítmicos.

Figura 20. Impacto de la expresión de HLA-ABC en monocitos sobre el resultado de pacientes con o sin conteos altos de TEM CD8+ al comienzo de la inmunoterapia o transición de TEM a TEff durante la inmunoterapia. En los paneles **A-C**, los pacientes con conteos altos o bajos de células TEM CD8+ en el ciclo 1 día 1 (C1D1) se dicotomizaron en base a la expresión media de HLA-ABC en monocitos CD14+ en C1D1 seguido del análisis de la LFS o la OS mediante la prueba de rangos logarítmicos. Los paneles **D-F** muestran los resultados correspondientes para pacientes que alcanzaron o no la transición de células TEM a TEff CD8+ durante el ciclo 1 de inmunoterapia.

Figura 21. Los pacientes con CMML presentan células leucémicas con propiedades inmunosupresoras. El panel **A** muestra una estrategia de clasificación representativa para células mononucleares CMML en sangre periférica. La población verde comprende células CD14+ leucémicas maduras, mientras que los blastos CD34+ inmaduros se representan en azul. **(B)** Análisis de citometría de flujo de gp91phox y H2R en células CD14+ y CD34+ en sangre periférica de pacientes con CMML (n=11) y controles sanos (n=10). El panel C muestra una medición de ROS representativa de células CMML CD14+ ordenadas por FACS con o sin inhibición con HDC (50 μ M), ranitidina (10 μ M) y AH202399AA (10 μ M), mientras que el panel D muestra 11 experimentos combinados mediante el uso del inhibidor de NOX2 HDC (100 μ M, $p < 0.001$). El panel D se analizó mediante el uso de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos pareados.

Figura 22. Las células de CMML que producen ROS deterioran la función de las células NK. El panel **A** muestra una micrografía confocal que representa la interacción entre una célula NK (izquierda) y una célula de CMML CD14+ (derecha). La mancha azul representa la tinción DAPI del núcleo y el colorante verde se une al gp91phox unido a la membrana.

(B) degranulación contra células CMML CD14+ por células NK estimuladas con IL-2 (n=9) en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD33 lintuzumab (1 µg/ml) y HDC (100 µM). Los datos se analizaron mediante el uso de la prueba t de Student pareada con la corrección de Bonferroni. El panel C muestra la muerte de células NK (n=6) después de una incubación durante toda la noche con células CMML en proporciones que oscilan entre 16:1 y 1:1. Para cada donante, el grado de células apoptóticas NK de la primera relación NK:CMML con al menos 50 % de células NK apoptóticas se muestra en la figura. Cuando se indica, el inhibidor de NOX2 HDC (100 µM), el inhibidor de PARP-1 PJ34 (0.5 µM), el inhibidor de NOX2 DPI (3 µM) o la catalasa (200 U/ml) estuvieron presentes durante la incubación durante toda la noche. El efecto de los inhibidores sobre la apoptosis de células NK inducida por CMML se analizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 23. Las células T CD8+ son sensibles a la muerte celular mediada por ROS inducida por células CMML. El panel A muestra la apoptosis de células T CD8+ (n=4) después de la incubación durante toda la noche con células CMML en relación 1:1 en presencia o ausencia de inhibidores HDC (100 µM), inhibidor de PARP-1 PJ34 (0.5 µM), inhibidor de NOX2 DPI (3 µM) o catalasa (200 U/ml). Analizado por ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En el panel B, los subconjuntos de células T CD8+ indicadas se ordenaron e incubaron durante toda la noche con células CMML en una relación 1:1 con o sin inhibidor de NOX2 DPI (3 µM, n=3). Las células TN se definieron como CD45RA+CCR7+, las T_{CM} como CD45RO+CCR7+, las T_{EM} como CD45RO+CCR7- y las T_{Eff} como CD45RA+CCR7-. Analizado por ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 24. Expresión de receptores de células NK activadores en pacientes con CMML. El panel **A** muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los receptores NKp30, NKp46, NKp80, NKG2D, DNAM-1 y 2B4, mientras que el panel **B** muestra el porcentaje de células NK positivas para los receptores correspondientes. En el panel **A** y **B**, los pacientes con CMML (n=10) se dividieron en blastocitos CD34+ por encima (n=5) o por debajo (n=5) del 2 % en PBMC y se compararon con controles emparejados por edad (H.D, n=10). Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student.

Figura 25. Regulación negativa mediada por ROS de receptores activadores. (A) Se incubaron conjuntamente células NK y monocitos de donantes sanos durante toda la noche en presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1 PJ34 (0.5 μ M). Se muestran las intensidades medias de fluorescencia (MFI) para los receptores NKp46, NKp80, DNAM-1 y CD16. Datos analizados por la prueba t de Student.

Se apreciará que, por simplicidad y claridad de las ilustraciones, los elementos mostrados en las figuras no se dibujaron necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden exagerarse con relación a otros elementos para mayor claridad. Además, cuando se consideró apropiado, las referencias numéricas pueden repetirse entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

En la siguiente descripción detallada se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una mejor comprensión de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede practicarse sin estos detalles específicos. En otros casos los

métodos, procedimientos y componentes bien conocidos no se describen en detalle para no oscurecer la presente invención.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el
5 tratamiento de un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de:
administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de
histamina con otro agente terapéutico a dicho sujeto, de esta manera se
trata dicho cáncer en dicho sujeto. En una modalidad, el agente
10 terapéutico es un inhibidor de la proteína 1 de la muerte celular
programada (PD-1). En otra modalidad, el agente terapéutico es un
inhibidor del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1).

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para
reducir la carga tumoral en un sujeto con cáncer primario o metastásico
15 que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de
dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte
celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular
programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera la
carga tumoral en dicho sujeto.

20

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para
reducir el riesgo de diseminación tumoral metastásica en un sujeto con
cáncer activo que comprende la etapa de: administrar una cantidad
25 terapéutica de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1
de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte
celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera
el riesgo de diseminación tumoral metastásica en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para
30 evitar o retrasar la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica
del cáncer en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una

cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que evita o retrasa de esta manera la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para evitar la recaída a un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que evita de esta manera la recaída de dicho cáncer en dicho sujeto en remisión de dicho cáncer.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para retrasar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que retrasa de esta manera la recaída de dicho cáncer en dicho sujeto en remisión de dicho cáncer.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que prolonga de esta manera la remisión de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la supervivencia de un sujeto en remisión de un cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que aumenta de esta manera la supervivencia de dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar el tiempo de supervivencia de un sujeto en remisión de un cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que prolonga de esta manera el tiempo de supervivencia de dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir el crecimiento tumoral maligno en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que reduce de esta manera el crecimiento del tumor maligno en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para disminuir o aliviar los síntomas del cáncer en un sujeto en remisión de un cáncer que comprende la etapa de: administrar una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) a dicho sujeto, lo que disminuye o alivia de esta manera dichos síntomas de cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende a) una cantidad terapéutica de un agonista del receptor de histamina e inhibidores de la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) o del
5 ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1) e instrucciones para el uso de dicho kit.

Inhibidores de PD-1

10 En una modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención comprende la administración de un inhibidor de PD-1, en combinación con uno o más agentes terapéuticos como se describe en la presente. En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista o un
15 anticuerpo codificado por ácido nucleico (intracuerpo). En otra modalidad, el inhibidor de PD-1 es un ARNip, un ARN antisentido, una proteína que comprende (o un ácido nucleico que codifica para) una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a PD-1 pero que impide la señalización de PD-1 (por ejemplo, una proteína de fusión de un fragmento de PD-L1 o
20 PD-L2 y la parte Fc de una inmunoglobulina), una proteína soluble (o un ácido nucleico que codifica una proteína soluble) que compite con la PD-1 unida a la membrana para la unión de sus ligandos PD-L1 y PD-L2; o un inhibidor de molécula pequeña capaz de inhibir la señalización de la vía PD-1.

25 En una modalidad, el inhibidor de PD-1 es el anticuerpo anti-PD1 Nivolumab (MDX-1 106/BMS-936558/ONO-4538), (Brahmer y otros, 2010. J Clin Oncol. 28(19):31 67-75; PMID: 2051 6446); o Pidilizumab (CT-01 1), (Berger y otros, 2008. Clin Cancer Res. 14(10):3044-51; PMID: 18483370); y MK-3475 (SCH 900475). En otra modalidad, el anticuerpo
30 anti-PD1 es Pembrolizumab.

En otra modalidad, el inhibidor de la vía de PD-1 es un anticuerpo (o un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo) dirigido contra un ligando de PD-1, en una modalidad, un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del ligando PD-1 o PD-2. En una modalidad, el anticuerpo se une de forma proximal y disruptiva al sitio de unión de PD-1 o PD-2 en el ligando.

Inhibidores de PD-L1

En una modalidad, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1 105/BMS-936559 (Brahmer y otros, 2012. N Engl J Med. 366(26):2455-65; PMID: 22658128); MPDL3280A/RG7446, o MEDI4736. En otra modalidad, el inhibidor de la vía de PD-1 es una proteína que comprende (o un ácido nucleico que codifica para) una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a PD-1 pero que impide la señalización de la vía de PD-1. En una modalidad, el inhibidor de la vía de PD-1 es una proteína de fusión de un fragmento de ligando PD-L1 o PD-L2. En una modalidad, el inhibidor de la vía de PD-1 es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de PD-L1 o PD-L2 o un fragmento de este capaz de unirse a PD-1 y a una porción Fc de una inmunoglobulina. Un ejemplo de dicha proteína de fusión se representa por AMP-224 (dominio extracelular de PD-L2/B7-DC murino fusionado a la porción Fc no modificada de la proteína IgG2a murina; Mkrtychyan y otros, 2012. J Immunol. 189(5):2338-47; PMID: 22837483).

Histamina

En una modalidad, se usa histamina en los métodos y composiciones de la presente invención. En otra modalidad, se usa un agonista del receptor de histamina en los métodos y composiciones de la presente invención. En una modalidad, la histamina de la presente invención es dihidrocloruro

de histamina. En otra modalidad, la histamina de la presente invención es N-metil-histamina. En otra modalidad, la histamina de la presente invención es 4-metil-histamina. En otra modalidad, la histamina de la presente invención comprende otros agonistas del receptor H2 de histamina.

El dihidrocloruro de histamina está disponible comercialmente y los métodos para producir dihidrocloruro de histamina, así como también otras formas de histamina, se conocen en la técnica (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,528,654, que se incorpora en la presente descripción como referencia).

Modos de administración

En una modalidad, la administración de los inhibidores de PD-1 o PD-L1 y la histamina puede producirse simultáneamente o escalonada, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración.

En otra modalidad, cualquiera de los fármacos o compuestos terapéuticos o profilácticos descritos en la presente puede administrarse simultáneamente. En otra modalidad, pueden administrarse a diferentes tiempos entre sí. En una modalidad, pueden administrarse dentro de unos pocos minutos entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de unas pocas horas entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de 1 hora entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de las 2 horas entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de las 5 horas entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de las 12 horas entre sí. En otra modalidad, pueden administrarse dentro de las 24 horas entre sí.

En una modalidad, cualquiera de los fármacos o compuestos terapéuticos o profilácticos descritos en la presente puede administrarse en el mismo sitio de administración. En otra modalidad, pueden administrarse en diferentes sitios de administración.

5

Inmunoestimulantes

En otra modalidad, los métodos de la presente invención en los que se administran inhibidores de PD-1 o PD-L1 e histamina comprenden, además, la etapa de administrar un inmunoestimulante adicional. En una modalidad, el inmunoestimulante adicional es interleucina-2 (IL-2). La administración de IL-2 puede producirse simultáneamente o escalonada, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración que los inhibidores de PD-1 o PD-L1 y la histamina.

15

En otra modalidad, se administran inhibidores de PD-1 o PD-L1 e histamina como un tratamiento de combinación con un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1), sipuleucel-T, u otras vacunas, o sus combinaciones. En otra modalidad, los inhibidores de PD-1 o PD-L1 y la histamina se administran como un tratamiento de combinación con anti-CD40, anti-CD27, anti-4-1BB, o una combinación de estos. En otra modalidad, los inhibidores de PD-1 o PD-L1 y la histamina se administran como un tratamiento de combinación con otros inmunoestimulantes. En una modalidad, el inmunoestimulante es IFN, IL-21, receptor similar a inmunoglobulina anti-asesino [KIR], o una combinación de estos.

25

En otra modalidad, se administra una vacuna contra el cáncer en los métodos de la presente invención además de la administración de inhibidores de PD-1 o PD-L1 e histamina. En una modalidad, la vacuna

30

es Gardasil®. En otra modalidad, la vacuna es Cervarix®. En otra modalidad, la vacuna es sipuleucel-T.

5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende a) una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina y de inhibidores de PD-1 o PD-L1, e instrucciones para el uso de dicho kit.

10 En una modalidad, la histamina es un inmunoestimulante. En una modalidad, el kit comprende un inmunoestimulante adicional además del dihidrocloruro de histamina. En una modalidad, el inmunoestimulante adicional es IL-2. En otra modalidad, el kit comprende un tratamiento adicional, lo que incluye los descritos anteriormente en la presente descripción, además de dihidrocloruro de histamina e inhibidores de PD-1 o PD-L1.

Predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer

20 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto.

25 En una modalidad, se usa un biomarcador para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto. En una modalidad, el biomarcador es H2R. En otra modalidad, el biomarcador es NKp30. En otra modalidad, el biomarcador es NKp46.

30 En otra modalidad, el biomarcador es antígeno leucocitario humano - relacionado con antígeno D (HLA-DR), CD86, CD40, o sus combinaciones. En otra modalidad, el biomarcador es la expresión baja de HLA-ABC. En otra modalidad, una reducción del conteo de monocitos en sangre pronostica la supervivencia libre de leucemia.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento
5 propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir la frecuencia de células NK en dicha primera muestra de sangre y en dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay un aumento en la frecuencia de células NK en dicha segunda muestra
10 de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay aumento en la frecuencia de células NK en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento de cáncer
15 no será eficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que
20 comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir los niveles de expresión de un biomarcador en
25 dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay un aumento en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay aumento en el
30 nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se

predice que dicho tratamiento de cáncer será ineficaz en dicho sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; (b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento
10 propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; (c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y (d) medir los niveles de expresión de un biomarcador en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay una disminución en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera
15 muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay disminución en el nivel de expresión del biomarcador en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer no será eficaz en dicho
20 sujeto, lo que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

- En una modalidad, los métodos para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer como se describe en la presente pueden usarse junto
25 con un método para evitar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer, un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto, un método para evitar la recaída a la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto con AML en remisión completa (CR) después de la quimioterapia, o una combinación de estos, en donde dicho
30 método comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un

tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; d) medir el biomarcador usado en el método de predicción de la eficacia del tratamiento del cáncer en el sujeto en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, y e) administrar ciclos adicionales de dicho tratamiento a dicho sujeto si dicho biomarcador ha cambiado desde dicha primera muestra de sangre a dicha segunda muestra de sangre de una manera que es predictiva de la eficacia del tratamiento del cáncer como se describe en la presente descripción.

Redistribución de células T citotóxicas

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; y d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8+ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, en donde si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que hay una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T efectoras (T_{eff}) en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento de cáncer será eficaz en dicho sujeto y en donde si no hay redistribución de citotóxicos Células T en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, entonces se predice que dicho tratamiento contra el cáncer no será efectivo en dicho sujeto, lo

que predice de esta manera la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para evitar la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8+ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, y e) administrar ciclos adicionales de dicho tratamiento a dicho sujeto si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que haya una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células efectoras T (T_{eff}) en dicha segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, lo que evita de esta manera la recaída de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: a) obtener una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un ciclo de un tratamiento o un tratamiento propuesto para dicho cáncer a dicho sujeto; c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez completado dicho ciclo de tratamiento; d) medir la frecuencia de fenotipos de células T citotóxicas CD8+ en dicha primera muestra de sangre y dicha segunda muestra de sangre, y e) administrar ciclos adicionales de dicho tratamiento a dicho sujeto si hay una redistribución de células T citotóxicas de manera que haya una reducción en la frecuencia de células de memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T efectoras (T_{eff}) en dicha segunda muestra

de sangre en comparación con dicha primera muestra de sangre, lo que prolonga de esta manera la remisión de dicho cáncer en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para
5 evitar la recaída a la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto con
AML en remisión completa (CR) que comprende las etapas de: a) obtener
una primera muestra de sangre de dicho sujeto; b) administrar un primer
ciclo de dihidrocloruro de histamina e interleucina-2 (IL-2) a dicho sujeto;
10 c) obtener una segunda muestra de sangre de dicho sujeto una vez
completado dicho primer ciclo de tratamiento; d) medir la frecuencia de
fenotipos de células T citotóxicas CD8+ en dicha muestra de sangre; y e)
administrar ciclos adicionales de dihidrocloruro de histamina e IL-2 a dicho
sujeto si hay una redistribución de las células T citotóxicas en dicha
segunda muestra de sangre en comparación con dicha primera muestra
15 de sangre, de manera que hay reducción en la frecuencia de células de
memoria T efectoras (T_{EM}) y un aumento en la frecuencia de células T
efectoras (T_{eff}), lo que evita de esta manera la recaída a AML en dicho
sujeto.

20 ***Especies reactivas de oxígeno (ROS)***

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para
tratar un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de: administrar una
cantidad terapéutica de un agente que disminuye las especies reactivas
25 de oxígeno (ROS). En una modalidad, el método comprende la etapa de
administrar una cantidad terapéutica de un agente que disminuye las
ROS extracelulares.

En una modalidad, el agente es un inhibidor de la formación de ROS. En
30 otra modalidad, el agente es un depurador de ROS extracelulares.

En una modalidad, el método comprende además la etapa de administrar un agonista del receptor de histamina. En una modalidad, el cáncer es leucemia. En una modalidad, la leucemia es leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

5

Cánceres

En una modalidad, los métodos para el tratamiento del cáncer como se describe en la presente comprenden métodos para evitar o retrasar la
10 recaída de un cáncer en un sujeto en remisión, lo que prolonga la remisión del cáncer, aumenta la supervivencia, disminuye o alivia los síntomas del cáncer o sus combinaciones. En otra modalidad, los métodos para tratar el cáncer como se describen en la presente comprenden métodos para reducir la carga tumoral en un sujeto con cáncer primario o metastásico,
15 lo que reduce el riesgo de diseminación tumoral metastásica en un sujeto con cáncer activo, lo que evita o retrasa la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica del cáncer en un sujeto, lo que evita la recaída de un cáncer en un sujeto, lo que retrasa la recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer, lo que prolonga la remisión de un
20 cáncer en un sujeto, lo que aumenta la supervivencia de un sujeto en remisión de un cáncer, lo que prolonga el tiempo de supervivencia de un sujeto en remisión de un cáncer, lo que reduce el crecimiento tumoral maligno en un sujeto, lo que disminuye o alivia los síntomas de cáncer en un sujeto en remisión de un cáncer, o sus combinaciones.

25

En una modalidad, un sujeto tratado mediante los métodos de la presente invención tiene o sufre de un cáncer o tumor. En otra modalidad, un sujeto tratado mediante los métodos de la presente invención está en remisión de un cáncer o tumor. En otra modalidad, el sujeto está en remisión
30 completa (CR). En una modalidad, la CR es de leucemia. Los métodos para evaluar la remisión completa se conocen bien en la técnica.

En otra modalidad, un sujeto tratado mediante los métodos de la presente invención tiene un tumor o linfoma sólido y mostró una "respuesta" a un tratamiento contra el cáncer anterior. En otra modalidad, un sujeto tratado mediante los métodos de la presente invención tiene un tumor o linfoma sólido y mostró una "respuesta completa" a un tratamiento contra el cáncer anterior.

En una modalidad, el sujeto que tiene cáncer o un tumor se ha tratado con cirugía, quimioterapia, radioterapia, una terapia dirigida, lo que incluye terapias que se destinan a estimular respuestas del sistema inmune contra el cáncer, o sus combinaciones. En otra modalidad, el sujeto que tiene cáncer o un tumor se trata con inhibidores de histamina y de PD-1 o PD-L1.

En una modalidad, el sujeto en los métodos de la presente invención tiene o tuvo cáncer. En otra modalidad, el sujeto tiene o tuvo un tumor. En otra modalidad, el sujeto tiene una enfermedad neoplásica. En otra modalidad, el sujeto tiene una malignidad. En otra modalidad, el sujeto tiene o tuvo una condición precancerosa o una condición premaligna.

En una modalidad, el cáncer es una leucemia. En una modalidad, la leucemia es leucemia mieloide aguda (AML). En otra modalidad, la leucemia es leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, la leucemia es leucemia mielomonocítica crónica (CMML). En otra modalidad, la leucemia es leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, la leucemia es leucemia de células pilosas.

En una modalidad, el tumor es un tumor sólido. En una modalidad, el tumor sólido es un carcinoma de colon, cáncer de próstata, cáncer de

mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello u otro tumor sólido.

- 5 En una modalidad, el cáncer o tumor se encuentra en la mama, próstata, pulmón, colon, estómago, páncreas, ovario o cerebro. En otra modalidad, el cáncer es un cáncer hematopoyético, un neuroblastoma o un glioma maligno.
- 10 En otra modalidad, el cáncer se selecciona de uno o más de los siguientes: Carcinoma corticosuprarrenal, cánceres relacionados con el SIDA, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma primario del SNC, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoide atípico, sistema nervioso central, carcinoma de
- 15 células basales - ver cáncer de piel (no melanoma), cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco encefálico, tumor cerebral, astrocitomas, tumores de cerebro y de médula espinal Descripción general del tratamiento, glioma de tronco
- 20 encefálico, tumor teratoideo/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso central, craneofaringioma, ependimoma, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, ver Linfoma no Hodgkin, tumor carcinoide, gastrointestinal, carcinoma de
- 25 sitio primario desconocido, tumores cardíacos (de corazón), sistema nervioso central, tumor teratoideo/rabdoide atípico, embrionaria I Tumores, tumor de células germinales, linfoma, primario, cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, cordoma, neoplasias mieloproliferativas crónicas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma
- 30 cutáneo de células T - ver Micosis fungoide y síndrome de Sezary, carcinoma ductal in situ (DCIS) , Tumores embrionarios, sistema nervioso

central, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioneuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio,

5 histiocitoma fibroso de hueso, maligno, y osteosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores estromales gastrointestinales (TEGI), tumor de células germinales, sistema nervioso central, extracraneal, extragonadal, ovárico, testicular, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma - ver

10 tumor cerebral tronco encefálico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, células de Langerhans, linfoma Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos, sarcoma de Kaposi, riñón, células renales, tumor de Wilms

15 y otros tumores renales infantiles, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), mielógena crónica (CML), cáncer de células pilosas, cáncer de cavidad oral y de labios, cáncer de hígado (primario), cáncer de pulmón, células no pequeñas,

20 células pequeñas, linfoma, relacionado con el SIDA, Burkitt. Linfoma de Hodgkin, Células T cutáneas - ver Micosis Fungoide y síndrome de Sézary, Hodgkin, no Hodgkin, Sistema Nervioso Central Primario (SNC), macroglobulinemia de Waldenström - ver linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma,

25 melanoma, intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello maligno con tumor primario oculto, carcinoma del tracto de la línea media con compromiso del gen NUT, cáncer de boca, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple /neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide,

30 síndromes mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, mieloma, neoplasias

mieloproliferativas múltiples, crónico, cáncer de seno paranasal y de
cavidad nasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no
Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer
de cavidad oral, cáncer de orofaringe, labio, y cavidad oral, osteosarcoma
5 e histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, epitelial, tumor
de células germinales, tumores de bajo potencial maligno, cáncer de
páncreas, tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de
los islotes), papilomatosis, paraganglioma, cáncer paranasal y nasal,
cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe,
10 feocromocitoma, tumor pituitario, neoplasia de células
plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, embarazo y
cáncer de mama, linfoma del sistema nervioso central (SNC), cáncer
primario de peritoneo, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células
renales (riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición,
15 retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de la glándula salival,
sarcoma, Ewing, Kaposi, osteosarcoma (cáncer óseo),
rhabdomyosarcoma, tejido blando, tumores vasculares y uterinos, síndrome
de Sézary, cáncer de piel, melanoma, carcinoma de células de merkel, no
melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino
20 delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas - ver
cáncer de piel (no melanoma), cáncer escamoso metastásico de cuello
con tumor primario oculto, cáncer de estómago (gástrico), linfoma de
células T, cutáneo - ver Micosis fungoide y síndrome de Sèzary, cáncer
testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de
25 tiroides, cáncer de células en transición de la pelvis renal y uréter,
carcinoma primario, pelvis urinaria y renal, cáncer de células en
transición, cáncer uretral, cáncer uterino, endometrio, sarcoma uterino,
cáncer vaginal, tumores vasculares, cáncer de vulva, macroglobulinemia
de Waldenstrom: ver Linfoma no Hodgkin y tumor de Wilms.

En una modalidad, el estado precanceroso es queratosis actínica, esófago de Barrett, gastritis atrófica, carcinoma ductal in situ, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, elastosis solar, displasia cervical, leucoplasia, eritroplasia, o sus combinaciones. En una modalidad, la afección precancerosa es una displasia o una neoplasia benigna. En una modalidad, la condición precancerosa es neoplasia intraepitelial prostática (PIN, por sus siglas en inglés), atrofia inflamatoria proliferativa (PIA, por sus siglas en inglés), proliferación acinar pequeña atípica (ASAP, por sus siglas en inglés), lesión intraepitelial escamosa (SIL, por sus siglas en inglés), hiperplasia endometrial atípica, displasia epitelial ovárica, calcificaciones de la mama, MGUS (gammapatía monoclonal de significado incierto), neoplasia vulvar intraepitelial (VIN, por sus siglas en inglés), carcinoma lobulillar in situ (LCIS, por sus siglas en inglés) neoplasia vaginal intraepitelial, o VAIN liquen escleroso vulvar y liquen plano, neoplasia intraepitelial cervical (NIC, por sus siglas en inglés), esófago de Barrett, o sus combinaciones.

En una modalidad, el tratamiento para el cáncer descrito en los métodos de la presente invención se proporciona a un sujeto en remisión. En una modalidad, el sujeto está en remisión de un cáncer hematopoyético. En una modalidad, se proporciona a un sujeto que ha experimentado una terapia de inducción. En una modalidad, la quimioterapia de inducción comprende una combinación de citarabina y daunorrubicina. En una modalidad, se proporciona a un sujeto que ha completado una terapia de consolidación. En una modalidad, la quimioterapia de consolidación comprende una combinación de citarabina y daunorrubicina. En otra modalidad, la fase de consolidación comprende 2-4 ciclos de citarabina en dosis altas, a veces con la adición de una antraciclina (en una modalidad, daunorrubicina o, en otra modalidad, idarrubicina). En otra modalidad, la fase de consolidación comprende dosis altas de citarabina

sin la adición de antraciclinas. En otra modalidad, la fase de consolidación comprende un trasplante alogénico o autólogo. En otra modalidad, el sujeto recibe un trasplante alogénico o autólogo después de completada la fase de consolidación.

5

En una modalidad, el tratamiento del cáncer es un tratamiento inmunológico o una inmunoterapia. En una modalidad, el tratamiento fortalece la respuesta inmunitaria en el sujeto al cáncer. En otra modalidad, el tratamiento induce una respuesta inmunitaria en el sujeto al
10 cáncer. En una modalidad, el tratamiento comprende la administración de una citocina al sujeto. En una modalidad, la citocina es un inmunoestimulante.

Citocinas

15

En una modalidad, la citocina es una interleucina. En una modalidad, la interleucina es IL-2. En otra modalidad, la interleucina es IL-12. En otra modalidad, la interleucina es IL-15. En una modalidad, la interleucina se administra a una dosis baja.

20

En una modalidad, la IL-2 se administra a una dosis de 16,400 U/kg dos veces al día.

25

En otra modalidad, la citocina es un interferón. En una modalidad, el interferón es interferón-alfa. En otra modalidad, el interferón es interferón-beta. En otra modalidad, el interferón es interferón-gamma.

30

En otra modalidad, la citocina es un factor de crecimiento hematopoyético. En una modalidad, el factor de crecimiento hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en: Eritropoyetina, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés)

y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), o sus combinaciones.

En una modalidad, los métodos de la presente invención incluyen
5 administrar anti-CTLA-4 y composiciones de la presente invención que comprenden anti-CTLA-4. En una modalidad, CTLA4 o CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), también conocida como CD152 (conglomerado de diferenciación 152), es un receptor de proteína que, al funcionar como un punto de control inmunitario, regula negativamente el
10 sistema inmunitario. En una modalidad, se administra anti-CTLA-4 a un sujeto para mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

En una modalidad, la terapia de consolidación proporcionada a un sujeto en remisión o a un sujeto que tiene cáncer comprende la administración
15 de un agonista del receptor de histamina al sujeto. En una modalidad, la histamina es un inmunoestimulante. En una modalidad, la histamina es dihidrocloruro de histamina.

En una modalidad, se administran 0.5 mg de dihidrocloruro de histamina.
20 En una modalidad, los agentes terapéuticos como se describen en la presente, lo que incluye IL-2, histamina e inhibidores de PD-1 o PD-L1 se administran una vez al día. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto dos veces por día. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto tres veces por día. En
25 otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto cuatro veces por día. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto una vez a la semana. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto dos veces por semana. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto tres veces
30 por semana. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran

a un sujeto cuatro veces por semana. En otra modalidad, los agentes terapéuticos se administran a un sujeto una vez cada dos semanas.

En una modalidad, el tratamiento contra el cáncer comprende administrar
5 dihidrocloruro de histamina e interleucina-2 (IL-2). En una modalidad,
dihidrocloruro de histamina administrado a 0.5 mg dos veces al día e IL-2
administrada a 16,400 U dos veces al día, como se describe en el ejemplo
3 en la presente descripción más abajo, fue altamente eficaz para evitar
la recaída en pacientes en remisión de AML, como se describe en el
10 ejemplo 4 en la presente descripción más abajo cuando la primera o
tercera ronda de tratamientos con IL-2 e histamina indujeron una
redistribución de células T citotóxicas en la que hubo una reducción en la
frecuencia de células de memoria T efectoras y un aumento concomitante
de células T efectoras.

15 En una modalidad, el tratamiento contra el cáncer descrito en los métodos
en la presente descripción es una terapia posterior a la consolidación,
como se describe en la Figura 4, o terapia de mantenimiento.

20 En una modalidad, algunos de los métodos de la presente invención se
ponen en práctica en una primera y una segunda muestras extraídas de
un sujeto antes y después de una ronda de terapia posterior a la
consolidación. En una modalidad, las muestras se toman antes y después
de completarse la terapia posterior a la consolidación. En otra modalidad,
25 las muestras se toman antes y después de la primera ronda de terapia
posterior a la consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman
antes y después de la tercera ronda de terapia posterior a la
consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman antes y después
de la primera y tercera rondas de terapia posteriores a la consolidación.
30 En otra modalidad, las muestras se toman antes y después de la primera
a la cuarta ronda de terapia posteriores a la consolidación. En otra

modalidad, las muestras se toman antes y después de la segunda ronda de terapia posterior a la consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman antes y después de la cuarta ronda de terapia posterior a la consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman antes de la primera ronda y después de la tercera ronda de terapia posteriores a la consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman antes de la primera ronda y después de la segunda ronda de terapia posteriores a la consolidación. En otra modalidad, las muestras se toman antes de la primera ronda y después de la cuarta ronda de terapia posteriores a la consolidación.

En una modalidad, cada ciclo de tratamiento dura 3 semanas como se describe en el Ejemplo 3. En otra modalidad, cada ciclo de tratamiento dura 1-5 semanas. En otra modalidad, cada ciclo de tratamiento dura 1 semana. En otra modalidad, cada ciclo de tratamiento dura 2 semanas. En otra modalidad, cada ciclo de tratamiento dura 4 semanas.

En una modalidad, la terapia posterior a la consolidación comprende 10 ciclos, como se describe en el ejemplo 3 en la presente descripción más abajo. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 1-5 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 5-10 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 10-15 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 5 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 15 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 7 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 12 ciclos. En otra modalidad, la terapia de consolidación comprende 3 ciclos.

En una modalidad, las muestras del sujeto son muestras de tejido. En otra modalidad, las muestras del sujeto son muestras de sangre. En una modalidad, la muestra de sangre es una muestra de sangre periférica. En

otra modalidad, las muestras del sujeto son muestras de fluido cerebroespinal (CSF, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, las muestras del sujeto son muestras de orina. En otra modalidad, las muestras del sujeto son muestras fecales.

5

Kit

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende
10 una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir fenotipos citotóxicos CD8+ e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para evitar la
15 recaída de un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir fenotipos citotóxicos CD8+ e instrucciones para el uso de dicho kit.

20 En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir fenotipos citotóxicos CD8+ e instrucciones para el uso de dicho kit.

25

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para evitar la recaída a la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto con AML en remisión completa (CR) después de la quimioterapia que comprende una
30 cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir fenotipos citotóxicos CD8+ e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona kits para predecir la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir un biomarcador como se describe en la presente, e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para evitar la recaída a un cáncer en un sujeto en remisión de dicho cáncer que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir un biomarcador como se describe en la presente e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir un biomarcador como se describe en la presente, e instrucciones para el uso de dicho kit.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un kit para evitar la recaída a la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto con AML en remisión completa (CR) después de la quimioterapia que comprende una cantidad terapéutica de dihidrocloruro de histamina, un inmunoestimulante, un medio para medir un biomarcador como se describe en la presente, e instrucciones para el uso de dicho kit.

En una modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención evita la recaída a un cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención evita la recurrencia de un cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención retrasa la recaída de un cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención retrasa la

recurrencia de un cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención prolonga la remisión de un cáncer. En otra modalidad, un tratamiento de cáncer de la presente invención aumenta la supervivencia de un sujeto con cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención prolonga el tiempo de supervivencia de un sujeto con cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención trata el cáncer en un sujeto. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención disminuye los síntomas de cáncer en un sujeto. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención alivia los síntomas del cáncer en un sujeto. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención prolonga la remisión libre de cáncer. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención reduce el tamaño de los tumores malignos en un sujeto. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención reduce la carga tumoral en pacientes con cáncer primario o metastásico. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención reduce el riesgo de diseminación tumoral metastásica en pacientes con cáncer activo. En otra modalidad, un tratamiento contra el cáncer de la presente invención evita o retrasa la reaparición, recurrencia o diseminación metastásica del cáncer en pacientes que se han sometido a cirugía, quimioterapia o cualquier otro tratamiento para reducir la carga de cáncer.

En una modalidad, la remisión comprende la remisión de un cáncer hematopoyético. En una modalidad, la remisión del cáncer hematopoyético se produce cuando los sujetos están libres microscópicamente de células cancerosas (en médula ósea, sangre u otros órganos) junto con la reaparición de la hematopoyesis normal, en una modalidad, después de la quimioterapia de inducción.

En una modalidad, la remisión del cáncer es una disminución o desaparición de los signos y síntomas del cáncer. En una modalidad, la remisión es una remisión parcial, que, en una modalidad, es cuando algunos, pero no todos, los signos y síntomas de cáncer han desaparecido. En otra modalidad, la remisión es una remisión completa, que, en una modalidad, es cuando todos los signos y síntomas de cáncer han desaparecido, aunque aún puede haber cáncer en el cuerpo.

En una modalidad, un sujeto entra en remisión después de la terapia de inducción, que, en una modalidad, comprende cirugía, quimioterapia u otros medios para reducir la carga tumoral.

En una modalidad, "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es evitar o disminuir la afección o trastorno patológico específico como se describió anteriormente. Por lo tanto, en una modalidad, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto mientras el sujeto está en remisión del cáncer después de la quimioterapia o cirugía u otros tratamientos. En otra modalidad, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que ha recaído en cáncer. En otra modalidad, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que tiene cáncer activo.

Por lo tanto, en una modalidad, el tratamiento puede incluir directamente afectar o curar, suprimir, inhibir, evitar, reducir una incidencia, reducir la severidad de, retrasar el inicio de, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o condición, o sus combinaciones. Por lo tanto, en una modalidad, "tratamiento" se refiere, entre otros, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de, o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o sus combinaciones. En

otra modalidad, el tratamiento se refiere a reducir la patogénesis de, mejorar los síntomas de, mejorar los síntomas secundarios de, o prolongar la latencia a una recaída de un cáncer en un sujeto. En una modalidad, "evitar" se refiere, entre otros, a retrasar la aparición de síntomas, evitar la recaída a una enfermedad, disminuir el número o frecuencia de episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o sus combinaciones. En una modalidad, "suprimir" o "inhibir", se refiere, entre otros, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir la cantidad de síntomas, reducir la incidencia de los síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o sus combinaciones.

En una modalidad, los métodos de la presente invención alivian los síntomas en un sujeto. En una modalidad, los síntomas son primarios, mientras que, en otra modalidad, los síntomas son secundarios. En una modalidad, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo del cáncer, mientras que, en una modalidad, "secundario" se refiere a un síntoma que se deriva de o es consecuente a una causa primaria. En una modalidad, los métodos de la presente invención tratan síntomas primarios o secundarios o complicaciones secundarias relacionadas con el cáncer.

En otra modalidad, los "síntomas" pueden ser cualquier manifestación de un cáncer, lo que incluye espasmos, calambres, rigidez de los músculos; debilidad muscular que afecta un brazo o una pierna; habla arrastrada o nasal; dificultad para masticar o tragar; debilidad general, atrofia o sus combinaciones.

De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención y en una modalidad, el sujeto es humano. En otra modalidad, el sujeto es un primate no humano. En otra modalidad, el sujeto es murino, que en una modalidad es un ratón, y, en otra modalidad, es una rata. En otra
5 modalidad, el sujeto es canino, felino, bovino, equino, laprina o porcino. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero. En otra modalidad, el sujeto es cualquier organismo susceptible a cáncer o tumores.

Composiciones terapéuticas y métodos de administración

10 En una modalidad, los métodos de la presente invención comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico como se describe en la presente, lo que incluye inhibidores de PD-1 o PD-L1, dihidrocloruro de histamina e IL-2 y un portador
15 aceptable farmacéuticamente.

"Composición farmacéutica" se refiere, en una modalidad, a una cantidad eficaz terapéuticamente del ingrediente activo, es decir, inhibidores de PD-1 o PD-L1, dihidrocloruro de histamina o IL-2, junto con un portador o
20 diluyente aceptable farmacéuticamente. Una "cantidad eficaz terapéuticamente" se refiere, en una modalidad, a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una condición dada y un régimen de administración.

25 Las composiciones farmacéuticas que contienen el agente terapéutico pueden administrarse, en una modalidad, a un sujeto mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como por vía parenteral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.
30 En una modalidad, el agente terapéutico se administra por vía subcutánea.

En otra modalidad, como se describe en los métodos y composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, comprimidos y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad de la presente invención, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta modalidad, las composiciones de la presente invención comprenden, en adición al compuesto activo y el portador o diluyente inertes, una cápsula de gelatina dura.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies corporales y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, el agente terapéutico se prepara

y aplica como una solución, suspensión o emulsión en un diluyente aceptable fisiológicamente con o sin un portador farmacéutico.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el agente terapéutico se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipofílicos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra modalidad, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que todo el agente terapéutico se libera inmediatamente después de la administración.

Cada uno de los aditivos, excipientes, formulaciones y métodos de administración anteriores representa una modalidad separada de la presente invención.

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones científicas citadas en la presente descripción se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las modalidades preferidas de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Combinación de anti-PD-1/anti-PDL1 e histamina – Métodos

Se cultivó la línea celular de timoma EL-4 (proporcionada por el Dr. Ingo Schmitz, Universidad Otto-von-Guericke, Magdeburg, Alemania) en medio DMEM (Sigma, Estocolmo, Suecia) suplementado con suero de ternera fetal al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM, como se describe en Martner, A. y otros, The Journal of Immunology, volumen 194, núm. 10, pp. 5014-5021. Ratones C57BL/6J (6-8 semanas de edad, adquiridos en Charles River Laboratories, Sulzfeld, Alemania) se inocularon por vía subcutánea con $1.75-2 \times 10^5$ células tumorales EL-4 y se trataron con solución salina (control) o 1.5 mg de dihidrocloruro de histamina (adquirido de Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suecia) diluido en solución salina, mediante inyecciones intraperitoneales tres veces por semana con el inicio un día antes de la inoculación de las células. Doscientos cuarenta µg de un anticuerpo contra el receptor 1 de muerte celular programada (PD1 anti-ratón, clon RMP1-14, denominado como α-PD1) y 240 µg de un anticuerpo contra el ligando 1 de muerte programada (anti-ratón PD-L1, clon 10F.9G2, denominado como α-PDL1) (ambos adquiridos de BioXcell, West Lebanon, NH, EE.UU., números de catálogo BE0146 y BE0101, respectivamente) se administraron mediante inyecciones intraperitoneales tres, seis y diez días después de la inoculación tumoral. Los tumores se midieron manualmente cada 2-3 días. El tamaño del tumor se calculó como la longitud x ancho. Los ratones se sacrificaron dos semanas después de la inoculación del tumor cuando los tumores control habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 1.5 cm².

Ejemplo 2

Combinación de anti-PD-1/anti-PDL1 e histamina – Resultados

De acuerdo con un estudio previo (Martner, A. y otros, The Journal of Immunology, volumen 194, núm. 10, pp. 5014-5021), el tratamiento de ratones que portan EL-4 con histamina redujo significativamente la

velocidad de crecimiento tumoral (Figuras 1-3). La administración de anticuerpos inhibidores de α -PD1- + α -PDL1 resultó en una reducción comparable del crecimiento tumoral. La combinación de histamina y anti-PD1/anti-PDL1 aumentó la reducción del crecimiento del tumor EL-4 en cada tratamiento (histamina u α -PD1/ α -PDL1) solo. En las Figuras 1-3, el tamaño del tumor se indica como % del control, donde el 100 % era el tamaño medio de los tumores del control al final de los experimentos (es decir, 2 semanas después de la inoculación del tumor).

Ejemplo 3

**LA DINÁMICA DE LOS SUBCONJUNTOS DE CÉLULAS T
CITOTÓXICAS DURANTE LA INMUNOTERAPIA PREDICE EL
RESULTADO EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Materiales y Métodos

Pacientes, diseño del estudio y objetivos

Este estudio multicéntrico de un solo brazo fase IV (Re:Mission, NCT01347996, registrado en www.clinicaltrials.gov) inscribió a 84 pacientes (edad 18-79 años) con AML en la primera CR. Como se expone esquemáticamente en la Figura 4, los pacientes recibieron diez ciclos consecutivos de 21 días de dihidrocloruro de histamina (HDC; Ceplene) en combinación con dosis bajas de IL-2 durante 18 meses o hasta la recaída o la muerte.

El tratamiento continuó durante un total de 18 meses o hasta que los pacientes recayeron, murieron, interrumpieron la terapia debido a eventos adversos, retiraron el consentimiento, o se perdieron para el seguimiento. Los ciclos 1 a 3 comprendieron 3 semanas de tratamiento y 3 semanas

sin tratamiento, y en los ciclos 4 a 10 los períodos sin tratamiento se extendieron a 6 semanas. En cada ciclo, los pacientes en el brazo de tratamiento recibieron HDC (Maxim Pharmaceuticals, San Diego, CA) a 0.5 mg por vía subcutánea dos veces al día e IL-2 recombinante humana (aldesleucina; 16 400 U/kg por vía subcutánea dos veces al día; Chiron Corporation, Emeryville, CA). Después de 18 meses de tratamiento (brazo HDC/IL-2), todos los pacientes fueron seguidos durante al menos seis meses adicionales después del final de la inmunoterapia.

La dosificación, la vía de administración, los criterios de exclusión, etcétera, fueron idénticos a aquellos descritos para un ensayo fase III previo [Blood. 2006; 108(1):88-96, incorporado en la presente descripción como referencia. Los puntos finales primarios en el estudio Re:Mission incluyeron la evaluación de los efectos farmacodinámicos cuantitativos y cualitativos de HDC/IL-2 mediante el monitoreo de los fenotipos de las células T y NK antes y después de los ciclos de tratamiento. El protocolo establecía que todos los datos colectados en apoyo de estos objetivos debían analizarse para las poblaciones como un todo y por subgrupos de acuerdo con la edad del paciente al momento de la inscripción (<60 y >60 años). Los aspectos informados en la presente descripción de la biología de las células T frente al resultado clínico (LFS y OS) se realizaron post hoc. Las características del paciente se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los Pacientes

	n (%)		LFS, n (%)	
	Todos los pacientes (n=84)	Edad >60 (n=47)	Todos los pacientes	Edad >60
Sexo				
Femenino	44 (52)	23 (49)	15/44 (34)	6/23 (26)
Masculino	40 (48)	24 (51)	20/40 (50)	10/24 (42)

Grupo de riesgo				
Riesgo favorable	34 (40)	17 (36)	18/34 (53)	8 /17 (47)
Intermedio I	25 (30)	10 (21)	9/25 (36)	2/10 (20)
Intermedio II	13 (15)	9 (19)	6/13 (46)	4/9 (44)
Riesgo alto	7 (8)	6 (13)	1/7 (14)	1/6 (17)
ND	5 (6)	5 (11)	1/5 (20)	1/5 (20)
Cariotipo				
Normal	44 (52)	23 (49)	19/44 (43)	9/23 (39)
Favorable	14 (17)	5 (11)	8/14 (57)	2/5 (40)
Desfavorable	7 (8)	6 (13)	2/7 (29)	2/6 (33)
Otro	15 (18)	10 (21)	5/15 (33)	3/10 (30)
ND	4 (5)	3 (6)	1/4 (25)	0/3 (0)
Estado de mutación				
NPM1	n=69	n=39		
	25 (36)	14 (36)	12/25 (48)	6/14 (43)
FLT3	n=72	n=37		
	6 (8)	3 (8)	0/6 (0)	0/3 (0)
CEBPA	n=42	n=23		
	3 (7)	1 (4)	1/3 (33)	0/1 (0)
Inducción				
cursos de				
1	63 (75)	33 (70)	31/63 (49)	14/33 (44)
>1	21 (25)	14 (30)	4/21 (19)	2/14 (14)
Cursos de consolidación				
n				
0-2	41 (49)	27 (57)	15/41 (37)	6/27 (22)
>2	43 (51)	20 (43)	20/43 (47)	10/20 (50)
Abreviaturas: LFS, supervivencia libre de leucemia, ND, no realizada				

Una explicación más detallada para la terapia de inducción y consolidación anterior puede encontrarse en otra parte.

5 **Muestreo de sangre periférica y citometría de flujo**

Se colectó sangre periférica antes y después del primer y tercer ciclos de tratamiento, es decir, ciclo 1, día 1 (C1D1) y ciclo 1, día 21 (C1D21), ciclo 3, día 1 (C3D1) y ciclo 3, día 21 (C3D21). Las PBMC se aislaron y se crioconservaron en sitios locales y se enviaron en hielo seco al laboratorio central (en el Sahlgrenska Cancer Center, Universidad de Gotemburgo, Suecia) para su análisis mediante citometría de flujo. Para estos análisis, las muestras de PBMC congeladas se descongelaron rápidamente en medio de Iscoves suplementado con FCS al 10 %. Posteriormente, las células se lavaron en medio de Iscoves y después en PBS. Las células se tiñeron primero con tinción amarilla fijable LIVE/DEAD (Life technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) mediante incubación durante 30 min a 4 °C en PBS, seguido de tinción para marcadores de superficie durante 30 min a 4 °C en PBS que contenía 0.5 % de BSA y 0.1 % de EDTA o en tampón de tinción brillante (BD Biosciences, Estocolmo, Suecia). Los anticuerpos monoclonales antihumanos siguientes se usaron para fenotipado: CD3-FITC (HIT3a), CD4-APC-H7 (RPA-T4), CD4-Horizon V450 (RPA-T4), CD8-APC (RPA-T8), CD8-PerCP-Cy5.5 (RPA-T8/SK1), CD8-Qdot705 (3B5), CD16-Horizon V450 (3G8), CD25-Violeta Brillante 421 (M-A251), CD45RA-APC (HI100), CD45RO-PE (UCHL1), CD56-PerCP-eFluor710 (CMSSB), CD56-PE-Cy7 (NCAM16.2), CD69-PE-Cy7 (FN50), HLA-DR-FITC (L243) (todos de BD Biosciences). CCR7-PE-Cy7 (G043H7) de Biolegend, San Diego, CA, EE.UU. CD3-Pacific Blue (S4.1), CD14-Qdot655 (TüK4) y estreptavidina-Qdot605 (todos de Life technologies). La tinción intracelular de IFN- γ -PE-Cy7 (B27; BD Biosciences) se realizó después de la tinción superficial y la fijación y permeabilización mediante el uso del kit de fijación/permeabilización de FoxP3 (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las muestras teñidas se analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa SORP de 4 láseres (405, 488, 532 y 640 nm; BD Biosciences). Los datos se analizaron mediante el uso del software FlowJo, versión 7.6.5 o posterior (TreeStar, Ashland, OR, EE.UU.) o el software FACSDiva, versión 6 o posterior (BD Biosciences). Se excluyeron las muestras con menos del 25 % de viabilidad.

Se obtuvieron muestras de sangre de 81 de entre 84 pacientes. Los conteos diferenciales de sangre completa se realizaron en sitios locales y se usaron para calcular los conteos absolutos de células T CD8+ en sangre. Todas las muestras disponibles se analizaron para determinar el contenido de células T y los marcadores de activación de la expresión (lo que incluye la producción de CD25 y CD69 e IFN- γ en respuesta a PMA). Si un análisis falló de acuerdo con los criterios predefinidos (fallo experimental, pocas células, escasa viabilidad celular), se descongeló una segunda muestra para reanalizarla. Si también el segundo intento falló en generar datos, estas muestras se excluyeron del análisis. En un segundo conjunto de experimentos, las muestras disponibles se analizaron para la distribución de subconjuntos de células T y la expresión de HLA-DR. Todas las muestras analizadas exitosamente, de acuerdo con los criterios predefinidos establecidos anteriormente, se incluyeron en este informe. En la Figura 5 se muestra un diagrama de flujo de pacientes que se incluyeron o excluyeron de los análisis.

Producción de IFN- γ - después de estimulación con PMA/ionomicina o péptido

Las muestras descongeladas colectadas antes y después del primer y tercer ciclos de tratamiento de inmunoterapia con HDC/IL-2 se sembraron en medio de Iscoves complementado con FCS al 10 % en placas de 96 pocillos, 1×10^6 células por pocillo. Las células se dejaron reposar durante

toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron con medio tibio antes de la estimulación consistente en una incubación de 5 horas con PMA 0.2 µg/ml (Sigma-Aldrich Munich, Alemania) junto con ionomicina 2 µg/ml (Sigma-Aldrich) o 6 horas de incubación con un conjunto de péptidos AML (péptidos superpuestos que cubren las proteínas asociadas a la leucemia WT1, PRAME, survivina y hTERT; Miltenyi Biotec) o, como control, péptidos CEF (32 péptidos específicos para MHC clase I con secuencias derivadas de citomegalovirus humano (HCMV, por su siglas en inglés), virus de Epstein-Barr (EBV, por su siglas en inglés) y virus de la influenza; Miltenyi Biotec).

La concentración final de cada péptido fue de 0.6 nmol. Las moléculas coestimuladoras anti-CD28 (CD28.2; BD Biosciences) y anti-CD49d (9F10; BD Biosciences), 2 µg/ml de cada una, se añadieron a los pocillos con estimulación peptídica, así como también a las muestras de control negativo, que sirvió para determinar la señal de fondo. Para todos los estímulos, se añadió Golgiplug (BD Biosciences) durante las últimas 4 horas de estimulación de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se tiñeron con tinción amarilla fijable LIVE/DEAD y marcadores de superficie antes de fijarse, permeabilizarse y teñirse intracelularmente con IFN-γ tal como se describió anteriormente. Se consideró que los pacientes albergaban células T CD8+ específicas de AML o CEF si la frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN-γ excedía 0.05 % (después de la sustracción del fondo según lo determinado por la muestra de control negativo) en cualquiera de los puntos de tiempo (C1D1, C1D21, C3D1, C3D21). Para evitar el sesgo de selección, solo los pacientes sin eventos (recaídas) que ocurrieron antes del último punto de tiempo (C3D21; 105 días) se consideraron en estos análisis.

Estadística

De acuerdo con el plan de análisis estadístico, se usó la prueba t pareada para comparaciones únicas de fenotipos de células T CD8+. Para determinar el impacto de la dinámica de los subconjuntos CD8+ o marcadores en el resultado, las muestras se dicotomizaron por la mediana para puntos de tiempo únicos o por inducción/reducción durante el primer ciclo de tratamiento si no se indicó de cualquier otra manera. Los análisis de la función de las células T frente al resultado se basan en datos de la LFS, definidos como el tiempo en días desde el inicio de la inmunoterapia con HDC/IL-2 hasta la recaída o muerte por cualquier causa, y la OS, definida como el tiempo correspondiente hasta la muerte, disponible en la fecha de cierre del ensayo (13 de octubre de 2014), es decir, cuando todos los pacientes se habían seguido durante al menos 24 meses (18 meses de tratamiento y 6 meses de seguimiento adicional). La recaída se definió como al menos un 5 % de células blásticas en la médula ósea o presencia de leucemia extramedular. El impacto del fenotipo de células T sobre la LFS y la OS se analizó mediante la prueba de rangos logarítmicos.

El impacto de la edad, la clasificación del grupo de riesgo de acuerdo con las recomendaciones de European LeukemiaNet [Blood. 2010; 115(3):453-474], el número de cursos de inducción requeridos para alcanzar la CR (1 o >1) y el número de cursos de consolidación (0-2 o >2) en la LFS y la OS se evaluó mediante el uso del modelo de regresión univariada de Cox. Los factores de pronóstico con un valor de p por debajo de 0.1 (edad y número de ciclos de inducción) se incluyeron como posibles factores de confusión en un análisis de regresión multivariada de Cox (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de regresión de Cox univariada y multivariada del impacto de aspectos del fenotipo de células T CD8⁺ en la LFS y la OS.

Análisis de regresión de Cox	Univariado			Multivariado*		
	HR	de confianza Intervalo	valor de p	HR	de confianza Intervalo	valor de p
Todos los pacientes (n=44)						
Inducción de T _N frente a LFS	0.45	0.20-0.98	0.04	0.47	0.21-1.06	0.07
Inducción de T _N frente a OS	0.29	0.10-0.82	0.02	0.29	0.10-0.85	0.02
Inducción de T _{CM} frente a LFS	1.08	0.50-2.36	0.84	1.46	0.64-3.32	0.37
Inducción de T _{CM} frente a OS	1.43	0.52-3.93	0.49	2.65	0.91-7.76	0.08
Reducción de T _{EM} frente a LFS	0.26	0.12-0.60	0.001	0.26	0.11-0.60	0.002
Reducción de T _{EM} frente a OS	0.24	0.08-0.69	0.009	0.23	0.08-0.70	0.01
Inducción de T _{EFF} frente a LFS	0.50	0.23-1.09	0.08	0.46	0.20-1.03	0.06
Inducción de T _{EFF} frente a OS	0.35	0.12-0.99	0.048	0.27	0.09-0.80	0.02
Transición frente a LFS **	0.19	0.07-0.50	0.001	0.17	0.06-0.47	0.001
Transición frente a OS **	0.13	0.03-0.59	0.008	0.12	0.02-0.54	0.006
Pacientes >60 años (n=27)						
Inducción de T _N frente a LFS	0.25	0.88-0.68	0.007	0.20	0.07-0.61	0.005
Inducción de T _N frente a OS	0.17	0.04-0.67	0.01	0.13	0.03-0.59	0.008
Inducción de T _{CM} frente a LFS	1.39	0.50-3.85	0.53	1.41	0.50-3.97	0.52

Inducción de T _{CM} frente a OS	3.37	1.01-11.2	0.048	3.77	1.08-13.2	0.04
Reducción de T _{EM} frente a LFS	0.10	0.03-0.38	0.001	0.10	0.03-0.39	0.001
Reducción de T _{EM} frente a OS	0.14	0.03-0.57	0.006	0.13	0.03-0.57	0.006
Inducción de T _{EFF} frente a LFS	0.22	0.07-0.68	0.009	0.26	0.08-0.87	0.03
Inducción de T _{EFF} frente a OS	0.10	0.03-0.40	0.001	0.10	0.02-0.51	0.005
Transición frente a LFS **	<0.001	***		<0.001	***	
Transición frente a OS **	<0.001	***		<0.001	***	

Abreviaturas: LFS, supervivencia libre de leucemia, OS, supervivencia global
 *Ajustado por edad y número de ciclos de inducción
 ** Transición: reducción de T_{EM} con inducción simultánea de T_{EFF}.
 *** Muy pocos eventos para el análisis de regresión de Cox

Todos los valores de p indicados son bilaterales. Este estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. El ensayo se aprobó por los Comités de Ética de cada institución participante, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de la inscripción.

Ejemplo 4

La dinámica de los subconjuntos de células T citotóxicas durante la inmunoterapia predice el resultado en la leucemia mieloide aguda –Resultados

Los pacientes con ALM en primera CR recibieron 10 ciclos consecutivos de 3 semanas de HDC/IL-2 en la fase posterior a la consolidación, como se expone en la Figura 4. La sangre periférica colectada antes y después

del primer y tercer ciclos de inmunoterapia se analizó para el contenido y fenotipo de células T CD8+. Durante los ciclos de tratamiento, HDC/IL-2 no alteró los conteos absolutos de células T CD8+ en sangre (Figura 6A). Además, los conteos de células T CD8+ (por encima o por debajo de la mediana) antes o después de la terapia no afectaron el riesgo de recaída (datos no mostrados).

Cuando se comparó la distribución de T_N , T_{CM} , T_{EM} y T_{eff} CD8+ antes y después del primer ciclo de tratamiento, los pacientes sin recaída mostraron una reducción clara de la fracción de células T_{EM} junto con una inducción de células T_{eff} (Figura 6). Al inicio de la terapia, los pacientes con un porcentaje alto (por encima de la mediana) de células T_{EM} mostraron una probabilidad ligeramente mayor de LFS, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el riesgo de recaída para pacientes con un porcentaje alto o bajo (por la mediana) de células T_N , T_{CM} , o T_{eff} (Figura 7). Los pacientes que experimentaron una reducción de la frecuencia de células T_{EM} o una inducción de células T_{eff} durante el ciclo 1 mostraron una LFS y/o OS significativamente mejorada (Figura 8C-D con los resultados del análisis multivariado que se muestra en la Tabla 2). Además, la inducción de la frecuencia de linfocitos T vírgenes durante el primer ciclo de tratamiento predijo significativamente la LFS y la OS (Figura 8A, Tabla 2). La distribución de las células T_{CM} aparentemente no se alteró durante la inmunoterapia (Figura 8D) y no influyó en el riesgo de recaída (Figura 8B). La distribución de subconjuntos de células T no se alteró significativamente durante el ciclo de tratamiento 3 (datos no mostrados).

Se ha propuesto la estimulación de células T CD8+ con antígeno para dirigir la diferenciación de células $T_N \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{eff}$ [Current opinion in immunology. 2013; 25(5):556-563; Vaccine. 2015; 33(7):914-923]. Por lo tanto, especulamos que las células T_{eff} se indujeron a partir de

células T_{EM} durante el primer ciclo de tratamiento de HDC/IL-2. De hecho, se observó una correlación entre una inducción de T_{eff} y una reducción de T_{EM} durante el ciclo 1 (Figura 9). Dieciocho de los 44 pacientes analizables (41 %) mostraron una memoria para la transición a células T efectoras, definida como una reducción de las células T_{EM} CD8+ con un aumento concomitante en las células T_{eff} CD8+. Estos pacientes mostraron una mejoría en la LFS (HR 0.19, P <0.001) y la OS (HR 0.13, P=0.002; Figura 8E, Tabla 2).

Fenotipos de células T en pacientes de mayor edad

El protocolo de ensayo especificó análisis de resultado por subgrupos de acuerdo con la edad del paciente al momento de la inscripción (<60 y >60 años). El conteo de células T CD8+ o la distribución de células T_N/T_{CM}/T_{EM}/T_{eff} CD8+ al inicio de la inmunoterapia no difirió significativamente entre los grupos de edad (Figura 10A-D). Durante el primer ciclo, el tratamiento con HDC/IL-2 indujo un aumento significativo de la frecuencia de células T_{eff} solo en pacientes de mayor edad (Figura 10D). El impacto de la distribución alterada de las células T_N y T_{eff}, la reducción de la frecuencia de células T_{EM} y la transición aparente de las células T_{EM} hacia T_{eff} en el resultado fue pronunciada en pacientes de mayor edad. Por lo tanto, todos estos aspectos de la diferenciación de células T CD8+ inducida por inmunoterapia predijeron la LFS y/o la OS en este grupo de edad (Figura 8F-J) y permanecieron significativamente predictivos después de la corrección para los factores de pronósticos (Tabla 2). La dinámica de los subconjuntos de células T CD8+ durante el ciclo 1 no pronosticó significativamente la LFS o la OS en pacientes de menor edad (Figura 10E-N).

Marcadores adicionales de activación de células T

Además de la distribución de fenotipos de células T, analizamos el impacto de la inmunoterapia en marcadores de activación de células T citotóxicas. Los niveles de expresión de CD69 y CD25, que son marcadores empleados frecuentemente de células T activadas, no se afectaron por el tratamiento con HDC/IL-2 (Figura 11A-B) y los niveles de expresión de estos marcadores no influyeron en el resultado clínico (datos no mostrados). Por el contrario, la expresión de HLA-DR se redujo durante el primer ciclo de terapia (Figura 11C). La HLA-DR se expresó principalmente por las poblaciones de memoria, y la reducción fue significativa para las células T_{CM} y T_{EM} pero no para las células T_N o T_{eff} (datos no mostrados). Una expresión baja de HLA-DR en células T CD8+ al final del primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2 predijo débilmente un resultado clínico favorable (el análisis de regresión univariada de Cox para la OS fue P=0.04, mientras que el análisis de regresión multivariando de Cox para la OS fue P=0.12; Figura 12A).

La presencia de células T específicas para leucemia anuncia una CR mantenida

A continuación, determinamos la capacidad de las células T CD8+ para producir IFN- γ ex vivo antes y después de la inmunoterapia. La capacidad de las células T CD8+ de los pacientes para producir IFN- γ después de la estimulación con PMA/ionomicina fue similar antes y después del primer ciclo de tratamiento (Figura 11D) y no tuvo impacto en el resultado clínico (no se muestra). Para determinar si los pacientes albergaban células T CD8+ que eran reactivas específicamente con antígenos leucémicos, las PBMC se estimularon mediante grupos de péptidos que representaban antígenos asociados a la leucemia conocidos (WT1, survivina, PRAME y hTERT) seguido de la cuantificación de células T CD8+ productoras de IFN- γ . Las células T CD8+ de donantes sanos de PBMC no produjeron niveles de IFN- γ por encima del fondo en respuesta

a los péptidos derivados de la leucemia (datos no mostrados). Tres de los 20 pacientes analizados mostraron células T CD8+ específicas de antígeno contra cualquiera de estos antígenos al inicio de la inmunoterapia (C1D1). Dos de estos pacientes experimentaron recaídas tardías (a >600 días). Siete pacientes adquirieron células T reactivas a la leucemia durante la inmunoterapia (a C1D21, n=2, C3D1, n=4 o C3D21, n=1), todos los cuales permanecieron en CR ininterrumpida. Según el análisis de Kaplan-Meier, la presencia de células T CD8+ específicas predijo la LFS ($P=0.01$), mientras que la presencia de células T CD8+ específicas del antígeno que responden a péptidos de control virales (CMV, EBV e influenza; CEF) no ($P=0.5$; Figura 12B-C).

Los resultados de este estudio indican, por primera vez, que una distribución alterada de fenotipos de células T citotóxicas en sangre durante la inmunoterapia es relevante para el pronóstico de pacientes con AML no trasplantados en CR. Un hallazgo importante fue que estos aspectos de la inmunidad de las células T determinaron el riesgo de recaída y la supervivencia de pacientes de mayor edad, que tienen un alto riesgo de recaída y muerte. La evaluación de la transición de células T de memoria para las T efectoras puede ser útil ampliamente en la inmunoterapia contra el cáncer basada en células T. Se desconoce el motivo de la falta de correlación significativa entre la dinámica de los subconjuntos de células T CD8+ y el resultado en pacientes de menor edad, pero podría relacionarse con una menor incidencia de recaída en este grupo de edad junto con menos muestras disponibles para el análisis.

El mecanismo preciso que explica nuestro hallazgo de un cambio de células T_{EM} a células T_{eff} en sangre de pacientes con AML durante el primer ciclo de inmunoterapia con HDC/IL-2 aún no se ha determinado. Sin embargo, se ha informado que la IL-2 promueve el desarrollo de

células T CD8⁺ hacia poblaciones de células de memoria y efectoras, y, por lo tanto, es concebible que el componente IL-2 del régimen HDC/IL-2 sea crucial para la transición de células T de memoria a efectoras observada. Además, la transición de células T de memoria a efectoras es compatible con la visión de que las células T_{EM} se diferencian en células T_{eff} después de la exposición al antígeno. Aunque son posibles explicaciones alternativas, incluida la extravasación de subconjuntos de células T durante la inmunoterapia, planteamos la hipótesis de que la inmunoterapia con HDC/IL-2 facilita el desarrollo de células T efectoras, lo que puede explicar la predicción fuerte del resultado clínico en pacientes que experimentan una transición T_{EM} a T_{eff}. Es de destacar que otros han demostrado que las células T específicas de AML portan un fenotipo de célula T_{eff}. En un apoyo adicional para el desarrollo de inmunidad funcional de células T durante la inmunoterapia, se observaron niveles detectables de células T CD8⁺ que reaccionaron con péptidos leucémicos en 7/20 pacientes durante el curso de la terapia. La presencia de células T CD8⁺ específicas para la leucemia, pero no de células T CD8⁺ reactivas con antígenos virales comunes, predijo significativamente la LFS. Estos resultados concuerdan con observaciones previas sobre el papel de los antígenos inmunoreactivos asociados a la leucemia en la AML y brindan apoyo al papel de las células T citotóxicas para la vigilancia del clon leucémico.

La HLA-DR se considera un marcador de activación de células T, pero la expresión aumentada de HLA-DR en células T CD8⁺ se ha relacionado, además, con la supresión y el agotamiento de células T en el cáncer, infecciones virales crónicas y envejecimiento. La reducción de la expresión de HLA-DR en las células T_{CM} y T_{EM} durante la inmunoterapia y la tendencia hacia un resultado clínico favorable entre pacientes con expresión reducida sugieren que la población de memoria de células T

CD8⁺ puede cambiarse hacia una función efectora mejorada durante la inmunoterapia.

LA HDC/IL-2 se ha desarrollado para la inmunoterapia de la AML para expandir y activar poblaciones de células T y células asesinas naturales (NK) (componente IL-2) y proteger simultáneamente estas células efectoras antileucémicas contra la inactivación por especies reactivas de oxígeno derivadas de células mieloides (componente HDC). Resultados anteriores del ensayo Re:Mission muestran que el tratamiento con HDC/IL-2 desencadena la expresión de receptores de citotoxicidad natural (NCR, por sus siglas en inglés), que son receptores activadores de importancia para el reconocimiento de células aberrantes por las células NK, junto con el aumento de los conteos de células NK en sangre. Los resultados del ensayo Re:Mission sugirieron que los incrementos de expresión de NCR y conteos de células NK en el ciclo solo predijeron débilmente la LFS y la OS, mientras que los resultados presentados en la presente descripción implican que la distribución alterada de los subconjuntos de células T CD8⁺ durante el primer ciclo de tratamiento fue crítica para el pronóstico. Observamos que los pacientes con una transición de células T_{EM} a T_{eff} durante el primer ciclo de tratamiento junto con la expresión alta de NKp46 en células NK CD16⁺ citotóxicas después de la inmunoterapia estaban sorprendentemente protegidos de la recaída, mientras que los pacientes solo con transición de células T_{EM} a T_{eff} o expresión alta de NKp46 solamente se protegieron parcialmente (Figura 13). Estos datos apoyan la hipótesis de que las funciones efectoras de las células T y NK evolucionan simultáneamente durante la inmunoterapia y que ambos subconjuntos de células pueden contribuir a la protección contra recaídas.

Ejemplo 5

La expresión por células NK de receptores de citotoxicidad natural puede determinar el riesgo de recaída en pacientes con AML de mayor edad sometidos a inmunoterapia para el mantenimiento de la remisión

En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 70 % de los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) tenían >60 años. Si bien una proporción alta de pacientes de mayor edad alcanzan la remisión completa (CR) después de la quimioterapia, la recaída de la leucemia es común en la fase posterior a la quimioterapia y explica significativamente por qué las tasas de supervivencia a 5 años de los pacientes de mayor edad están en el intervalo de 10-15 %. La inmunoterapia con dihidrocloruro de histamina y dosis bajas de interleucina-2 (HDC/IL-2) tiene como objetivo reforzar las funciones antileucémicas de las células asesinas naturales (NK) para reducir o erradicar la leucemia residual. En un ensayo de fase III, se demostró que el tratamiento con HDC/IL-2 evita la recaída en pacientes con AML en CR.

Se informa que varios aspectos de la función de las células NK son relevantes para el pronóstico de la AML, pero no se ha llevado a cabo un análisis sistemático de aspectos de la biología de las células NK en pacientes de mayor edad. Las células NK humanas comprenden dos fenotipos principales: las células NK citotóxicas CD16⁺/56⁺ (denominadas células NK CD16⁺) constituyen el 90-95 % de las células NK en sangre en sujetos sanos, mientras que las células citotóxicas débilmente CD16⁻/56^{brillante} (células NK CD56^{brillante}) son consideradas como precursores de las células NK CD16⁺. La citotoxicidad de las células NK se regula por receptores de las células NK activadores e inhibidores y sus ligandos afines en las células objetivo malignas. Los principales receptores activadores comprenden los receptores de citotoxicidad natural (NCR;

NKp46, NKp30 y NKp44) y NKG2D. Hemos publicado previamente un informe provisional de aspectos de la biología de células NK en pacientes con AML que participaron en un ensayo fase IV mediante el uso de HDC/IL-2 para el mantenimiento de la remisión. Aquí, informamos los resultados finales de este ensayo, con un enfoque en el subgrupo de pacientes con AML de mayor edad (>60 años).

Los pacientes con AML en la primera CR recibieron diez ciclos de tres semanas con HDC/IL-2 durante 18 meses como se describió en otra parte. Se extrajeron muestras de sangre antes y después del primer ciclo para el análisis de los conteos absolutos de células NK y la expresión de NCR en las células NK. Un informe preliminar anterior mostró que el tratamiento con HDC/IL-2 aumentó los conteos de células NK en la sangre junto con una expresión aumentada en células NK de NKp30 y NKp46 durante los ciclos de tratamiento. Primero comparamos el grado de inducción de células NK y NCR en pacientes de menor edad (<60 años) y de mayor edad (> 60 años), respectivamente. Los conteos de células NK y la expresión de NCR al inicio del tratamiento no difirieron entre estos grupos de edad, con la excepción de que la relación de células CD56^{brillante} a CD16⁺ fue menor en pacientes de mayor edad (P=0.045, prueba de Mann-Whitney), lo que concuerda con hallazgos previos en sujetos sanos. Los pacientes de menor edad y de mayor edad no difirieron en cuanto a la acumulación de células NK CD16⁺ y CD56^{brillante} en la sangre durante los ciclos de tratamiento (Figura 14A, 14D) o la inducción de la expresión en células NK de los receptores NKp30 y NKp46 (Figura 14B-14C, 14E-14F).

Pretendíamos determinar el impacto de marcadores relacionados con células NK sobre el resultado mediante la dicotomización de los pacientes jóvenes y de mayor edad por conteos altos o bajos (por la mediana) de células NK o mediante la intensidad de la expresión de NCR en células

NK, seguido del análisis de la supervivencia libre de leucemia (LFS) y la supervivencia general (OS). Los conteos de células NK no predijeron significativamente el resultado en pacientes de menor edad o de mayor edad, y la expresión de NCR en células NK no predijo el resultado en
5 pacientes de menor edad ($P > 0.5$ para la LFS, no se muestra). Los pacientes de mayor edad con una expresión superior a la mediana de NKp30 en las células NK CD16⁺ al inicio de la terapia (ciclo 1 día 1; C1D1) mostraron una LFS y OS mejorada, con una tendencia similar para NKp46 (Figuras 15A y 15C). Una expresión alta de NKp46 en células NK CD16⁺
10 después del primer ciclo de tratamiento (ciclo 1 día 21; C1D21) se asoció positivamente con la LFS y la OS con una tendencia similar para NKp30 (Figuras 15B y 15D). No se observaron asociaciones significativas entre el resultado y el nivel de inducción de conteos de células NK o la inducción de NCR durante el primer ciclo de tratamiento (es decir, niveles C1D21
15 menos C1D1, no mostrados). En análisis multivariados corregidos por edad, clasificación de grupos de riesgo, número de cursos de inducción requeridos para alcanzar CR y número de cursos de consolidación, la expresión de NKp30 en C1D1 y la expresión de NKp46 en C1D21 predijeron independientemente la LFS y/o la OS en pacientes de mayor
20 edad (Tabla 3). Un paciente en CR murió de sepsis, mientras que todas las demás muertes fueron precedidas por una recaída, lo que ilustra el impacto de la recaída para la supervivencia en la fase posterior a la consolidación también en el grupo de pacientes ancianos con AML.

25 Se desconoce el motivo de la falta de correlación entre la expresión de NCR y el resultado en pacientes de menor edad, pero puede relacionarse con el menor número de pacientes de menor edad en el estudio, junto con una menor incidencia de recaída y muerte en este grupo de edad (datos no mostrados). La función de las células NK se basa en las interacciones
30 entre los NCR y sus ligandos en las células objetivo con la consiguiente activación de la citotoxicidad de las células NK. Mientras que los ligandos

de NCR se expresan frecuentemente por células de AML malignas, las células NK de pacientes con AML recién diagnosticados pueden expresar densidades inferiores de NCR, lo que repercute en la eficacia antileucémica de las células NK y en la supervivencia y la probabilidad de alcanzar CR después de la quimioterapia. Nuestros resultados extienden estos hallazgos previos lo que señala un papel para los NCR en la prevención de recaídas en la fase posterior a la quimioterapia de la AML. Se requieren estudios adicionales para confirmar estos resultados y para establecer si la expresión de NCR de las células NK anuncia una recaída también en pacientes no tratados o en pacientes sometidos a otras inmunoterapias.

Tabla 3: Análisis univariados y multivariados del impacto de la expresión de NKp30 o NKp46 en LFS y la OS.

Variable	Análisis univariado			Análisis multivariado		
	Relación de Riesgo	Intervalo de confianza	valor de p	Relación de Riesgo	Intervalo de confianza	valor de p
NKp30, C1D1, LFS	0.24	0.099-0.61	0.002	0.14	0.043-0.43	0.001
NKp30, C1D1, OS	0.28	0.088-0.91	0.034	0.17	0.037-0.78	0.022
NKp46, C1D21, LFS	0.25	0.10-0.59	0.001	0.28	0.093-0.82	0.020
NKp46, C1D21, OS	0.21	0.067-0.66	0.007	0.22	0.047-1.05	0.058

Usamos análisis de regresión de Cox univariados y multivariados para determinar el impacto de los niveles de expresión por debajo o por encima de la mediana de NKp30 del ciclo 1 día 1 (C1D1) o de NKp46 ciclo 1 día 21 (C1D21) en la LFS y la OS en pacientes >60 años. En los análisis multivariados, las relaciones de riesgo se corrigieron según la edad, la

clasificación del grupo de riesgo, el número de cursos de inducción necesarios para alcanzar la CR y el número de cursos de consolidación

Materiales y métodos

Pacientes

5

Este estudio multicéntrico de un solo brazo fase IV (Re:Mission, NCT01347996, registrado en www.clinicaltrials.gov) inscribió a 84 pacientes (18-79 años) con AML en primera CR que recibió diez ciclos de
10 HDC/IL-2 de 21 días durante 18 meses o hasta la recaída o la muerte. Los puntos finales primarios incluyeron la evaluación de los efectos farmacodinámicos cuantitativos y cualitativos de HDC/IL-2 mediante el monitoreo de fenotipos de células NK y su funcionalidad antes y después del primer ciclo de tratamiento. El protocolo estableció que los datos
15 recogidos en apoyo de estos objetivos deben analizarse para las poblaciones definidas como un todo y por subgrupos de acuerdo con la edad del paciente al momento de la inscripción (<60 y >60 años). Los análisis de los conteos de células NK y la expresión de NCR frente al resultado se realizaron post hoc. Las características en la inscripción de
20 los pacientes de mayor edad (>60 años, mediana de 67,2, intervalo 60-79) se incluyen en la Tabla 4. Detalles de las características de los pacientes, terapia de inducción y consolidación, criterios de exclusión, tratamiento y dosificación se encuentran en un informe preliminar anterior (Ejemplo 4).

25

Muestreo de sangre periférica y citometría de flujo

Se colectó sangre periférica antes y después del ciclo de tratamiento 1, es decir. el día 1 y el día 21 del ciclo 1 (C1D1 y C1D21), y las PBMC se
30 aislaron y crioconservaron en sitios locales y se enviaron en hielo seco al laboratorio central (en el Sahlgrenska Cancer Center, Universidad de

Gotemburgo, Suecia) para el análisis de citometría de flujo. Las muestras de PBMC se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo y un marcador de viabilidad y se analizaron mediante el uso de un BD-LRFortessa SORP de 4-láseres (BD Biosciences, San Diego, CA), como se explica en detalle en otra parte (Ejemplo 4).

Se dispuso de muestras de 32 de entre 37 pacientes de menor edad y de 45 de entre 47 pacientes de mayor edad. Todas las muestras disponibles fueron analizadas. Si un análisis falló de acuerdo con los criterios predefinidos (fallo experimental, pocas células, escasa viabilidad celular), se descongeló una segunda muestra para reanalizarla. En 18 casos para muestras de C1D1 y en 12 casos para muestras de C1D21, también el segundo intento falló en generar datos, y estas muestras se excluyeron del análisis. Los conteos diferenciales de sangre completa se realizaron en sitios locales y se usaron para calcular los conteos absolutos de células NK en sangre. Faltaron los conteos diferenciales de cuatro pacientes de menor edad y cinco pacientes de mayor edad.

Tabla 4: Características del paciente (edad >60)

<i>n</i> (%)		LFS (%)
Sexo		
Femenino	23 (49)	6/23 (26)
Masculino	24 (51)	10/24 (42)
Grupo de riesgo		
Riesgo favorable	17 (36)	8/17 (47)
Intermedio I	10 (21)	2/10 (20)
Intermedio II	9 (19)	4/9 (44)
Riesgo alto	6 (13)	1/6 (17)
ND	5 (11)	1/5 (20)
Cariotipo		
Normal	23 (49)	9/23 (39)
Favorable	5 (11)	2/5 (40)

Desfavorable	6 (13)	2/6 (33)
Otro	10 (21)	3/10 (30)
ND	3 (6)	0/3 (0)
Estado de mutación		
NPM1 (n=39)	14 (36)	6/14 (43)
FLT3 (n=37)	3 (8)	0/3 (0)
CEBPA (n=23)	1 (4)	0/1 (0)
Cursos de inducción (n=46)		
1	32 (70)	14/32 (44)
>1	14 (30)	2/14 (14)
Cursos de consolidación (n=46)		
0-2	26 (57)	6/26 (23)
> 2	20 (43)	10/20 (50)

Estadística

De acuerdo con el plan estadístico, se usó el test t de Student pareado para comparaciones únicas de fenotipos de células NK. Los análisis de marcadores de células NK frente a resultado se basan en datos para la LFS (definidos como el tiempo en días desde el inicio de la inmunoterapia con HDC/IL-2 hasta la recaída o muerte por cualquier causa) y la OS disponibles en la fecha de cierre del ensayo (13 de octubre de 2014), es decir, cuando todos los pacientes habían sido seguidos durante al menos 24 meses (18 meses de tratamiento y 6 meses de seguimiento adicional). La recaída se definió como al menos un 5 % de células blásticas en la médula ósea o por la aparición de leucemia extramedular. La LFS se definió como el tiempo desde el primer día de tratamiento con HDC/IL-2 hasta la recaída o muerte por cualquier causa. OS se definió como el tiempo correspondiente a la muerte independientemente de la causa. La LFS y la OS se analizaron mediante el uso de la prueba de rangos logarítmicos. Los parámetros que predijeron significativamente la LFS y/o la OS se analizaron posteriormente mediante análisis de regresión de Cox univariado y multivariado. En los análisis multivariados, las relaciones de riesgos se corrigieron según la edad, la clasificación del grupo de riesgo,

el número de cursos de inducción necesarios para alcanzar la CR (1 o >1) y el número de cursos de consolidación (0-2 o >2; Tabla 1). Todos los valores de p indicados son bilaterales. Los pacientes fueron clasificados por riesgo de acuerdo con las recomendaciones de European LeukemiaNet. El ensayo se aprobó por los Comités de Ética de cada institución participante, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de la inscripción.

Ejemplo 6

Dinámica de las poblaciones de células mieloides durante la inmunoterapia preventiva de la recaída en la leucemia mieloide aguda

En pacientes con leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), las células mieloides inmaduras se acumulan rápidamente en la sangre y la médula ósea. A pesar de que la mayoría de los pacientes con AML alcanzan la desaparición de las células leucémicas (remisión completa, CR) después de la quimioterapia, la mayoría de los pacientes adultos experimentan una recaída de la leucemia con perspectivas pobres para la supervivencia a largo plazo. La inmunoterapia con dihidrocloruro de histamina (HDC) junto con la citocina activadora de células T y NK IL-2 (HDC/IL-2) se usa actualmente en la UE y en Israel para la prevención de recaídas en la fase posterior a la consolidación. La aprobación de este régimen se basó en los resultados del ensayo fase III que muestran un riesgo de recaída significativamente reducido en pacientes que reciben HDC/IL-2 y los metaanálisis que comparan la prevención de recaídas alcanzada con IL-2 sola o HDC/IL-2 respaldan la eficacia clínica del componente HDC.

NOX2 es la NADPH oxidasa que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) de las células mieloides. El HDC se dirige a los receptores H_2 de

histamina (RH₂) en células mieloides maduras para suprimir la formación de ROS dependiente de NOX2. Se ha descubierto que la inhibición de las ROS derivadas de NOX2 protege las células efectoras antileucémicas adyacentes de la inactivación inducida por ROS, lo que se ha propuesto como un mecanismo de relevancia para las propiedades preventivas de recaídas de HDC en la AML. Además, estudios previos implican el HDC como un agente promotor de la diferenciación para las células mieloides. Yang y otros, por lo tanto, informaron que los ratones con deficiencia de histamina debido a la alteración genética de una enzima que forma histamina muestran una diferenciación celular mioide alterada junto con una mayor susceptibilidad al cáncer inducido químicamente. Además, se demostró que el HDC aumenta la expresión de CD86 y HLA-DR en células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) derivadas de monocitos y potencia la expresión de CD11b en células mieloides de una manera dependiente de NOX2.

Estos hallazgos previos nos incitaron a evaluar la dinámica de poblaciones de células mieloides en sangre durante la inmunoterapia con HDC/IL-2. Informamos que los subconjuntos de células mieloides y su expresión de marcadores de maduración se modulan durante la inmunoterapia basada en HDC, y que la dinámica de las células mieloides en la sangre puede asociarse con el resultado clínico en la AML.

Pacientes, materiales y métodos

Pacientes, diseño del estudio y objetivos. Ochenta y cuatro pacientes adultos con AML (18-79 años) en la primera CR se inscribieron en el ensayo Re:Mission (NCT01347996, registrado en www.clinicaltrials.gov). Las características detalladas de los pacientes se contabilizan en

publicaciones anteriores. El ensayo Re:Mission fue un estudio fase IV multicéntrico de un solo brazo donde todos los pacientes recibieron diez ciclos consecutivos de 21 días de HDC y dosis baja de IL-2 durante 18 meses o hasta la recaída o la muerte. El régimen fue idéntico al empleado en un ensayo fase III anterior. Los pacientes se inscribieron en una mediana de 46 días después de completarse la consolidación y se les hizo un seguimiento durante al menos 24 meses después del inicio de la inmunoterapia. Tres pacientes retiraron el consentimiento y no se incluyeron en ningún análisis. Otros catorce pacientes se discontinuaron prematuramente del estudio y se censaron en la última fecha de seguimiento capturada. La recaída se definió como al menos 5 % de células blásticas en la médula ósea o presencia de leucemia extramedular. Los puntos finales de ensayo primarios incluyeron los efectos cuantitativos y cualitativos de HDC/IL-2 en poblaciones de células T y NK en sangre periférica durante los ciclos de tratamiento. Los presentes análisis de los efectos en las poblaciones mieloides y su impacto en el resultado clínico (supervivencia libre de leucemia, LFS y supervivencia global, OS) se realizaron post hoc. El estudio se realizó de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki y se aprobó por los Comités de Ética de cada institución participante. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de la inscripción.

Aislamiento de PBMC, tinción y citometría de flujo. Se colectó sangre periférica antes y después del primer y tercer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2. Las PBMC se aislaron y crioconservaron en sitios locales y se enviaron en hielo seco al Laboratorio TIMM de la Universidad de Gotemburgo para su análisis mediante dos paneles mieloides, uno para determinar la expresión de marcadores de activación por 118 células mieloides y el otro para determinar el nivel de expresión de H₂R en monocitos. Después de la descongelación, las muestras crioconservadas

destinadas al panel de activación se preincubaron en un bloque FC humano (BD Biosciences, Estocolmo, Suecia). Las muestras destinadas al panel H₂R se tiñeron con un colorante amarillo fijable LIVE/DEAD (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con un cóctel de anticuerpos marcadores de superficie en tampón de tinción Brilliant (BD Biosciences) (panel de activación) o en PBS que contenía BSA al 0.5 % y EDTA al 0.1 % (panel H₂R). Se usaron los anticuerpos monoclonales antihumanos siguientes: CD3-PerCPCy5.5 (HIT3A), CD19-PerCPCy5.5 (SJ25C1), CD16-Violeta Brillante 605 (3G8), HLA-DR-APCH7 (G46-6), CD14-PECy7 (MφP9), CD141-APC (1A4), HLA-ABC-FITC (G46-2,6), CD40-PE (5C3), CD86-Violeta Brillante 711 (FUN1), CD11b-Azul Pacífico (ICRF44), CD33-PECy7 (P67.6) (todos de BD Biosciences), CD56-PerCP efluor 710 (CMSSB) (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.), CD1c-Violeta Brillante 421 (L161) (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.), receptor H₂ antihistamínico (IgG de conejo policlonal) (MBL International, Woburn, MA, EE.UU.), APC-anticonejo de cabra y CD14-Qdot655 o CD14-Azul Pacífico (ambos clones Tük4) (Life Technologies).

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa SORP de 4 láseres (405, 488, 532 y 640 nm, BD Biosciences). El análisis de los datos se realizó mediante el uso del software FlowJo, versión 7.6.5 o posterior (TreeStar, Ashland, OR). Se obtuvieron muestras de sangre de 81 de entre 84 pacientes. El análisis de fenotipo de las células mieloides se realizó en PBMC mediante el uso de los paneles mieloides mencionados anteriormente. Cuarenta y nueve pacientes se analizaron mediante el uso del panel H₂R y 59 muestras se analizaron mediante el uso del panel de marcadores de activación. Estos pacientes se seleccionaron en base a la disponibilidad de PBMC viables o congeladas. Los conteos diferenciales fueron realizados por los centros participantes en sangre completa y estaban disponibles para los 81 pacientes que

dieron su consentimiento para continuar en el estudio. Los conteos diferenciales se usaron 143 d para determinar los conteos absolutos de poblaciones mieloides (eosinófilos, neutrófilos y monocitos) en sangre.

5 **Análisis estadístico.** Las comparaciones de conteos de células sanguíneas y la expresión de marcadores de maduración en células mieloides antes y después de la inmunoterapia se realizaron mediante el uso de Prism 6 mediante la prueba t de Student pareada, como se especificó en el plan de estudio estadístico. Todas las significaciones
10 reportadas mediante el uso de la prueba t de Student pareada se mantuvieron significativas también mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. El impacto de estos parámetros inmunes en la LFS y la OS en la fecha de cierre del ensayo (13 de octubre de 2014) se determinó mediante el uso de la prueba de rangos logarítmicos. Los
15 parámetros que predijeron significativamente la LFS o la OS con la prueba de rangos logarítmicos se analizaron adicionalmente mediante análisis de regresión de Cox multivariados y univariados mediante el uso del software de estadística SPSS 24. En análisis multivariados, los parámetros continuos tales como la intensidad de fluorescencia se convirtieron en
20 valores nominales basados en la expresión por encima o por debajo de la mediana. El análisis de Cox univariado se usó para determinar el impacto de la edad, grupo de riesgo (clasificado según las recomendaciones de European LeukemiaNet (14)), el número de cursos de inducción requeridos para alcanzar la CR (1 o >1) y el número de cursos de
25 consolidación (0-2 o >2) en la LFS y la OS. Los factores de pronósticos con un valor de P por debajo de 0.1 para la LFS (edad y número de ciclos de inducción) se incluyeron como posibles factores de confusión en el análisis multivariado de Cox.

30

Resultados

La inmunoterapia con HDC/IL-2 aumenta los conteos de eosinófilos en sangre

Ochenta y cuatro pacientes adultos con AML en la primera CR participaron en el ensayo Re:Mission. Los pacientes recibieron 10 ciclos consecutivos de 3 semanas de inmunoterapia con HDC/IL-2 en la fase posterior a la consolidación. Se recolectó sangre periférica antes y después de los ciclos de tratamiento 1 y 3 y se analizó el contenido de poblaciones de leucocitos mediante conteos diferenciales. Además, las PBMC aisladas de la sangre se analizaron mediante citometría de flujo para el contenido de monocitos y poblaciones de DC y su expresión de marcadores de activación.

Durante los ciclos de tratamiento, hubo un marcado aumento en el número total de glóbulos blancos que se normalizó entre los ciclos (Figura 16A). La inducción de glóbulos blancos se contribuyó principalmente por eosinófilos cuyos números aumentaron típicamente diez veces durante los ciclos de tratamiento (Figura 16B). Aunque los conteos de eosinófilos se contrajeron entre los ciclos de tratamiento, los conteos de eosinófilos al comienzo del ciclo 3 permanecieron casi dos veces más altos que antes del inicio del ciclo 1 (Figura 16B). Ni los conteos de eosinófilos antes de los ciclos de tratamiento, después de los ciclos de tratamiento, ni la inducción de eosinófilos durante los ciclos de tratamiento tuvieron un impacto significativo en el resultado clínico en términos de la LFS o la OS (datos no mostrados).

El tratamiento con HDC/IL-2 reduce los conteos de monocitos en sangre.

Por el contrario del incremento de los conteos de eosinófilos durante la terapia con HDC/IL-2, el número de monocitos y neutrófilos se redujo durante el primer ciclo de tratamiento (Figura 16C-D). No hubo una reducción adicional de los conteos de monocitos o neutrófilos durante el

ciclo 3. Los conteos de monocitos permanecieron reducidos en el ciclo 3 en comparación con los niveles al inicio de la inmunoterapia (Figura 16D). Los conteos de neutrófilos en sangre antes o después de la inmunoterapia 193 no tuvieron impacto en el resultado clínico (datos no mostrados). Sin embargo, cuando los pacientes se dicotomizaron por la mediana en alta o baja/sin reducción en los conteos de monocitos durante el primer ciclo de tratamiento, una fuerte reducción de monocitos predijo significativamente la LFS (Figura 16E) con una tendencia similar para la OS (Figura 16F). El impacto de la reducción de monocitos en la LFS se mantuvo significativo en el análisis de regresión univariado pero no en el multivariado (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de regresión de Cox univariado y multivariado del impacto de la reducción de los conteos de monocitos, la expresión en monocitos de H₂R y la expresión en monocitos de HLA-ABC en la LFS y la OS.

Variable	Análisis univariado			Análisis multivariado ¹		
	Relación de Riesgo	Intervalo de confianza	valor de p	Relación de Riesgo	Intervalo de confianza	valor de p
Reducción de monocitos durante C1 frente a LFS	2.19	1.13-4.25	0.02	1.77	0.88-3.56	0.110
Expresión de H ₂ R CD14 ⁺⁺ C1D21 frente a LFS	2.98	1.36-6.50	0.006	2.82	1.27-6.28	0.011
Expresión de H ₂ R CD16 ⁺ C1D21 frente a LFS	3.11	1.43-6.76	0.004	3.13	1.43-6.87	0.004
Expresión de H ₂ R CD14 ⁺⁺ C1D21 frente a OS	3.71	1.18-11.70	0.025	3.40	1.07-10.82	0.038
Expresión de H ₂ R CD16 ⁺ C1D21 frente a OS	5.7	1.61-19.93	0.007	6.17	1.73-22.09	0.005
Expresión de HLA-ABC CD14 ⁺⁺ C1D1 frente a LFS	0.36	0.18-0.72	0.004	0.34	0.17-0.71	0.004

Expresión de HLA-ABC CD14 ⁺⁺ C1D1 frente a LFS ²	0.20	0.06-0.66	0.008	0.32	0.09-1.20	0.092
Expresión de HLA-ABC CD14 ⁺⁺ C1D21 frente a LFS ³	0.27	0.107-0.70	0.007	0.320	0.12-0.84	0.021

¹Los análisis multivariados se corrigieron por edad y número de ciclos de inducción.

²En el análisis se incluyeron pacientes con una frecuencia por debajo de la mediana de C1D1 T_{EM} CD8⁺.

³Los pacientes que no muestran transición de células T_{EM} CD8⁺ a T_{eff} durante el ciclo 1 se incluyeron en el análisis.

La expresión en monocitos de H₂R predice el riesgo de recaída y la supervivencia en pacientes sometidos a inmunoterapia basada en HDC. Las dos principales poblaciones de monocitos en sangre, las células CD14⁺⁺CD16⁻ (CD14⁺⁺) y CD14⁺CD16⁺ (CD16⁺) disminuyeron en un grado similar durante el tratamiento con HDC/IL-2 (datos no mostrados). Estudios anteriores muestran que la HDC se liga a receptores de histamina tipo 2 (H₂R) para inhibir la formación de ROS derivada de NOX2 *in vitro*, además de promover la diferenciación de las células mieloides. La expresión de H₂R en monocitos CD14⁺⁺ y CD16⁺ se evaluó durante la inmunoterapia y se correlacionó con el resultado clínico. Como se muestra en la figura 17A-B, la expresión de H₂R se potenció significativamente en monocitos CD14⁺⁺ durante y entre ciclos de tratamiento, y en monocitos CD16⁺ durante el primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2. Una expresión alta de H₂R en monocitos CD14⁺⁺ o CD16⁺ después del primer ciclo de tratamiento pronosticó fuertemente la LFS y la OS (Figura 17C-F). Se observaron tendencias similares hacia un impacto beneficioso de la expresión alta de H₂R en monocitos al inicio de la inmunoterapia (datos no mostrados). El impacto de la expresión de H₂R en monocitos en la LFS y la OS permaneció significativa en el análisis multivariado (Tabla 5).

El tratamiento con HDC/IL-2 aumenta la expresión de marcadores de activación en monocitos y DC.

Para aclarar aún más los efectos del tratamiento con HDC/IL-2 en células de origen mieloide, se determinó la expresión de los marcadores de activación HLA-DR, CD40 y CD86 antes y después de los ciclos de tratamiento 1 y 3. Los resultados mostraron una mayor expresión de estos marcadores de activación tanto en monocitos CD14⁺⁺ como CD16⁺ durante los ciclos de tratamiento (Figura 18A-B). Para los monocitos CD14⁺⁺, se observó un aumento significativo en la expresión de HLA-DR durante el ciclo 3 y en la expresión de CD40 durante ambos ciclos de tratamiento (Figura 18A). Para los monocitos CD16⁺, todos los marcadores de activación analizados aumentaron significativamente durante al menos uno de los ciclos de tratamiento con HDC/IL-2 (Figura 18B).

Las dos principales poblaciones de DC en sangre portan fenotipos de DC CD1c⁺ y CD141⁺, respectivamente. De forma similar a los monocitos, el número de DC se redujo durante la inmunoterapia con HDC/IL-2 (datos no mostrados). Con respecto a la expresión de los marcadores de activación relacionados con las DC, hubo discrepancias entre las poblaciones de DC CD1c⁺ y CD141⁺. La expresión de CD40 aumentó durante el tratamiento con HDC/IL-2 solo en DC CD1c⁺ mientras que la expresión de HLA-DR y CD86 se indujo solo en DC CD141⁺ (Figura 18C-D). La expresión de HLA-DR y CD86 estuvo, por el contrario, ligeramente disminuida en las DC CD1c⁺ durante el tratamiento con HDC/IL-2 (Figura 18C). No se observó una correlación significativa entre el resultado clínico y la expresión de HLA-DR, CD40 o CD86 en monocitos o DC (datos no mostrados).

La expresión baja de HLA-ABC en células mieloides anuncia un resultado clínico favorable en pacientes con distribución alterada de células T citotóxicas en sangre. El tratamiento con HDC/IL-2

consistentemente causó una expresión mejorada de HLA-ABC durante los ciclos de tratamiento en todas las poblaciones de monocitos y DC analizadas (Figura 19A-D). Una expresión alta de HLA-ABC en monocitos CD14⁺⁺ al inicio de la inmunoterapia anunció un pobre pronóstico (Figura 19E-F), que permaneció significativo en el análisis multivariado (Tabla 1). Una tendencia similar hacia una LFS corta para pacientes con expresión alta de HLA-ABC en monocitos CD14⁺⁺ se observó después del primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2 ($P=0.15$, $n=62$, prueba de rangos logarítmicos). La expresión de HLA-ABC en monocitos CD16⁺, DC CD1c⁺ y DC CD141⁺ se correlacionó altamente con la expresión de HLA-ABC de monocitos CD14⁺⁺ (datos no mostrados). Una expresión alta de HLA-ABC previa al tratamiento en estas poblaciones mieloides predijo también un resultado clínico pobre (datos no mostrados).

Especulamos que la expresión de HLA-ABC en células malignas mieloides residuales puede ser similar a la expresión de HLA-ABC en monocitos y DC. Una expresión alta de HLA-ABC en células malignas facilitaría de este modo la interacción con células T citotóxicas para reconocer y destruir células malignas, pero además impediría la activación de la citotoxicidad de células NK por interacción con receptores similares a inmunoglobulina de las células asesinas (KIR). En un informe anterior del ensayo Re: Mission, observamos que los pacientes con una frecuencia alta de células de memoria efectoras CD8⁺ (T_{EM}; CD45RO⁺CCR7⁻) en sangre al inicio de la inmunoterapia o pacientes que experimentan una transición de células CD8⁺ T_{EM} a las células efectoras T CD8⁺ (T_{Eff}; CD45RA⁺CCR7⁻) durante el primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2 mostraron una mejoría en la LFS y la OS. Estos factores pueden indicar una inmunidad de células T funcionales de relevancia para el riesgo de recaída reducido. Entre los pacientes con una frecuencia por encima de la mediana de células T_{EM} CD8⁺ al inicio de la terapia, la expresión de HLA-ABC en monocitos C1D1 CD14⁺⁺ no tuvo impacto

sobre el riesgo de recaída (Figura 20A). Por el contrario, el impacto favorable de la expresión monocítica baja de HLA-ABC fue pronunciado en pacientes que albergaban pocas células TEM CD8⁺ al inicio de la inmunoterapia (Figura 20B-C, Tabla 1). De manera similar, los pacientes en los que se observó la transición T_{EM} a T_{Eff} no mostraron beneficio aparente de una expresión baja de HLA-ABC en monocitos (Figura 20D), mientras que los pacientes negativos a la transición se beneficiaron significativamente de tener una expresión monocítica baja de HLA-ABC en C1D21 (Figura 20E-F, Tabla 5).

Discusión

Se asume que las recaídas leucémicas en la fase posterior a la quimioterapia de la ALM resultan de la expansión de células malignas residuales, y el objetivo de la inmunoterapia posterior a la consolidación es erradicar estas células remanentes. Aunque las células T citotóxicas y las células NK se consideran las poblaciones efectoras principales para la vigilancia de las células leucémicas, el funcionamiento apropiado de las células inmunitarias mieloides es crítico para la actividad de estos linfocitos. En la inmunoterapia combinada con HDC/IL-2, la función propuesta del componente IL-2 es activar los linfocitos citotóxicos, mientras que el componente HDC se dirige a la inmunosupresión inducida por mieloides mediante la inhibición de la producción de ROS inmunosupresores y mediante la promoción de la maduración de las células mieloides.

La eosinofilia pronunciada observada durante los ciclos de tratamiento con HDC/IL-2 está de acuerdo con los ensayos de AML previos en los que se demostró que la monoterapia con IL-2 desencadenaba la eosinofilia, probablemente como resultado de la producción inducida por IL-2 de IL-5 y GM-CSF. Por lo tanto, es probable que la inducción de

eosinófilos observada durante el tratamiento con HDC/IL-2 se atribuya al componente IL-2. Notablemente, la dosis de IL-2 usada en nuestro estudio fue menor que en la mayoría de los estudios previos, y una contribución del componente HDC al nivel de eosinofilia no puede excluirse formalmente. No observamos correlación entre los conteos de eosinófilos y el resultado clínico en términos de riesgo de recaída o supervivencia.

Además de la eosinofilia, se ha informado que la administración de IL-2 causa neutropenia en pacientes con AML. En nuestro estudio, mediante el uso de dosis bajas de IL-2 combinadas con HDC, se observó una reducción leve y transitoria de los neutrófilos en la sangre durante el primer ciclo de tratamiento. Se observó una reducción similar y más pronunciada de los conteos de monocitos durante el primer ciclo de HDC/IL-2. Los conteos de monocitos, pero no los conteos de neutrófilos, se mantuvieron en un nivel inferior al inicio del ciclo de tratamiento 3. Los análisis de fenotipos revelaron que los conteos sanguíneos de ambos monocitos CD14⁺⁺ y CD16⁺ se redujeron durante la terapia con HDC/IL-2. Si bien la información con respecto a los efectos de la HDC o la IL-2 sobre los conteos de monocitos de los ensayos de AML anteriores es escasa, los resultados de los ensayos clínicos en pacientes con carcinoma de células renales metastásico (RCC, por sus siglas en inglés) indicaron que IL-2 aumenta en lugar de reducir los conteos de monocitos en la sangre. Curiosamente, en un ensayo de RCC por Donskov y otros, la adición de HDC al régimen de IL-2 evitó la monocitosis. En respaldo adicional de la HDC como un inhibidor de las células mieloides inmaduras, la deficiencia genética de la síntesis de histamina en ratones se asocia con una acumulación pronunciada de células mieloides inmaduras. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el componente HDC contribuyó a la reducción observada en los conteos de monocitos en nuestro ensayo de AML con HDC/IL-2. Curiosamente, similar a los neutrófilos y

monocitos, también los números de DC CD1c⁺ y CD141⁺ se redujeron durante la inmunoterapia en nuestro ensayo. Esto fue inesperado ya que la administración de HDC se mostró previamente que mejoraba las cantidades de DC en ratones portadores de tumores. Sin embargo, en uno de los ensayos de RCC mencionados anteriormente, se encontró que el tratamiento con IL-2 reduce los conteos de DC en sangre. Por lo tanto, especulamos que, por el contrario, con la reducción de monocitos, la reducción en las cantidades de DC puede atribuirse a la IL-2. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los pacientes con AML en CR se han sometido recientemente a quimioterapia intensiva, y las fluctuaciones observadas en los conteos de leucocitos pueden, al menos en parte, reflejar los eventos que se producen durante la recuperación de la función de la médula ósea.

En varias formas de cáncer, los monocitos y neutrófilos activados indebidamente se relacionan con la inmunosupresión y su presencia en la sangre y otros tejidos a menudo anuncia un pronóstico pobre para la supervivencia. En el CCR, los bajos conteos de monocitos y/o neutrófilos antes y después del tratamiento con IL-2 o una reducción en los conteos de monocitos durante el tratamiento con IL-2 han demostrado predecir un resultado clínico favorable. En el presente estudio, una reducción fuerte de los conteos de monocitos durante el primer ciclo de tratamiento con HDC/IL-2 se asoció con la LFS, lo que por lo tanto apoya la idea de que la presencia de monocitos en la sangre puede reducir la eficacia de la inmunoterapia.

Los efectos propuestos del HDC sobre las células mieloides incluyen la inhibición de la formación de ROS dependiente de NOX2 y la promoción de la maduración de las células mieloides. Estos efectos son mediados estrictamente por la unión de H₂R expresados en células mieloides. En el ensayo Re:Mission se observó que la expresión de H₂R se potenciaba

fuertemente en monocitos CD14⁺⁺ así como también en monocitos CD16⁺ durante la terapia con HDC/IL-2, en particular durante el primer ciclo de tratamiento. Una expresión alta de H₂R en monocitos en C1D21 anunció mejoras en la LFS y la OS, que permanecieron significativas en el análisis multivariado, se tuvo en cuenta posibles factores de confusión. Además, observamos una tendencia hacia la supervivencia favorable de pacientes con una densidad alta de H₂R al inicio de la inmunoterapia. Una densidad alta de expresión de H₂R es probable que mejore la capacidad de respuesta de las células mieloides al tratamiento con HDC, y podría considerarse como un biomarcador de la eficiencia de la inmunoterapia con HDC/IL-2. Se necesitan más estudios para determinar la importancia de la expresión de H₂R en células mieloides para el curso clínico de la AML, lo que incluye el impacto potencial de la expresión de H₂R en pacientes que no reciben inmunoterapia.

Además de H₂R, la expresión de varios otros marcadores de maduración aumentó significativamente en monocitos y poblaciones de DC durante los ciclos de tratamiento, lo que indica que la inmunoterapia desencadena la maduración mieloides de células humanas no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Inesperadamente, sin embargo, una expresión alta en células mieloides de HLA-DR, CD40 o CD86 no tuvo impacto en la LFS, mientras que una expresión alta de HLA-ABC se asoció con un mayor riesgo de recaída. La expresión en monocitos de HLA-DR, CD86 y CD40 se correlacionó fuertemente con la expresión monocítica de HLA-ABC antes y después del primer ciclo de inmunoterapia (datos no mostrados). Se encontraron correlaciones similares para la expresión de DC de HLA-DR y HLA-ABC antes y después del tratamiento con HDC/IL-2 (datos no mostrados). Por lo tanto, especulamos que la falta de impacto positivo de la expresión de HLA-DR, CD40 o CD86 puede relacionarse con la correlación de estos marcadores de maduración con el marcador de pronóstico negativo HLA-ABC.

Varias líneas de evidencia implican que las células NK y las funciones de las células T son importantes para un resultado clínico favorable de la AML. Durante la inmunoterapia con HDC/IL-2, se informó previamente que los parámetros relacionados con células NK, lo que incluye los
5 conteos de células NK y la expresión de receptores de citotoxicidad natural (NCR) en células NK, predicen significativamente una recaída y muerte en la fase posterior a la consolidación. Además, los parámetros relacionados con las células T citotóxicas funcionales (CD8⁺), lo que incluye cantidades altas de células T_{EM} CD8⁺ al inicio de la terapia, la
10 transición de las células T CD8⁺ de las células T_{EM} a T_{eff} y la presencia de células T CD8⁺ que son reactivas con los antígenos derivados de AML, pronostican un resultado clínico favorable. Nuestros resultados previos sugieren, además, que las células NK y las células T CD8⁺ pueden constituir brazos efectores independientes en la prevención de la recaída
15 de la AML.

En el presente estudio, una expresión alta de HLA-ABC en células mieloides se asoció con un mal pronóstico y, por lo tanto, puede ser un biomarcador concebible. La fuerte correlación entre la expresión de HLA-
20 ABC en monocitos y todas las demás poblaciones de células mieloides analizadas sugiere que la expresión de HLA-ABC en monocitos puede reflejar la expresión de HLA también en blastos leucémicos residuales. La HLA-ABC expresada en blastos leucémicos puede inhibir la citotoxicidad de células NK a través de la unión de KIR expresados por las células NK.
25 Curiosamente, el impacto favorable de la expresión baja de HLA-ABC en la LFS aparentemente se restringió a pacientes que mostraban distribución desfavorable de células T CD8⁺, es decir, una baja frecuencia de células T_{EM} CD8⁺ y falta de transición T_{EM} a T_{eff}. Los pacientes con una distribución de células T desfavorable pueden basarse en la vigilancia
30 de células leucémicas mediada por NK, lo que proporciona por lo tanto una posible explicación del impacto clínico favorable de la expresión baja

de HLA-ABC en este grupo de pacientes. Debe enfatizarse en la naturaleza preliminar de estas conclusiones, y se necesitan más estudios sobre la posible interacción entre la expresión de HLA-ABC en células mieloides y la función antileucémica de las células NK y las células T en la AML.

Concluimos que los fenotipos y la dinámica de las poblaciones de células mieloides pueden ser relevantes para el riesgo de recaída en la ALM, y que las estrategias para abordar aspectos de la función de la célula mieloides pueden mejorar la eficiencia de las inmunoterapias que pretenden evitar la recaída.

Ejemplo 7

Inmunosupresión dependiente de NOX2 en la leucemia mielomonocítica crónica

La leucemia mielomonocítica crónica (CMML, por sus siglas en inglés) es una neoplasia mieloproliferativa y mielodisplásica con pocas opciones de tratamiento y pronóstico sombrío. El papel de las células asesinas naturales (NK) y otros linfocitos antileucémicos en la CMML es en gran parte desconocido. Nuestro objetivo fue proporcionar información sobre los mecanismos de la evasión inmune en la CMML, con especial atención a las especies reactivas de oxígeno (ROS) inmunosupresoras formadas por la NADPH oxidasa de la célula mieloides (NOX2). Se encontró que la población dominante de células CMML humanas primarias expresa NOX2 unido a la membrana y libera ROS que a su vez desencadenan una muerte celular dependiente de PARP 1 extensa en células NK cocultivadas, células de memoria T efectora CD8+ y células efectoras T CD8+. Los inhibidores de la formación de ROS y depuradores de ROS extracelulares evitaron la muerte de linfocitos inducida por células de CMML y facilitaron la

degranulación de células NK hacia células de CMML primarias recubiertas con anticuerpos. En pacientes con CMML, la elevación de los conteos de células inmaduras (CD34) en sangre se asoció con una expresión reducida de varios receptores activadores de células NK.

- 5 Proponemos que las células de CMML pueden usar ROS extracelulares como un mecanismo de escape inmunitario objetivo.

Los pacientes con CMML presentan conteos elevados de monocitos en sangre ($>1 \times 10^9/L$) junto con la presencia de células blásticas en sangre y médula ósea. La CMML típicamente progresa lentamente con signos de
10 mieloproliferación y mielodisplasia. La mediana de supervivencia después del diagnóstico es <2 años con pocos sobrevivientes a largo plazo, lo que se explica en parte por un alto riesgo de transición a la leucemia mieloide aguda (ALM). La gran mayoría de los pacientes con CMML tienen >60
15 años y no son elegibles para el trasplante alogénico de médula ósea, que aún es el único tratamiento curativo potencialmente.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen por varios tipos de células mieloides como una estrategia de defensa contra
20 microorganismos. Sin embargo, las ROS formadas por la NADPH oxidasa/NOX2 (NOX2) de los monocitos y los granulocitos también se han atribuido un papel en la regulación inmunitaria. Por lo tanto, la capacidad intacta de las células mieloides para producir ROS por la vía NOX2 se informa importante para disminuir la actividad de las células T
25 autorreactivas. En el cáncer, la liberación extracelular de ROS derivada de NOX2 se asocia con una disfunción significativa de linfocitos antineoplásicos, en particular células asesinas naturales (NK) y subconjuntos de células T. Se usa un inhibidor de la formación de ROS mediada por NOX2, dihidrocloruro de histamina (HDC), en combinación
30 con la interleucina 2 (IL-2) activadora de las células NK y las células T para evitar recaídas en la fase posterior a la quimioterapia de la AML. Los

análisis post hoc de los resultados de los ensayos fase III implicaron que la eficacia clínica de HDC/IL-2 es pronunciada entre pacientes con AML de diferenciación monocítica donde los pacientes albergan células leucémicas que coexpresan un NOX2 funcional y receptores de histamina tipo 2 (H₂R).

Para este estudio, (1) determinamos la expresión de NOX2 y H₂R en células de CMML humanas primarias, (2) evaluamos las propiedades inmunosupresoras potenciales de las células de CMML y (3) determinamos fenotipos de células NK circulantes y subconjuntos de células T CD8⁺ de pacientes con CMML. Nuestros resultados sugieren que las ROS derivadas de NOX2 pueden constituir un mecanismo objetivo de la inmunosupresión relacionada con la leucemia en la CMM.

Pacientes y donantes de sangre sanos. Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con CMML observados en hospitales de la Región Vstra Gotaland y Región Skane, Suecia, después del consentimiento informado por escrito. Los pacientes cumplieron los criterios para CMML de acuerdo con la clasificación de la OMS de 2008. De doce pacientes, 10 (83 %) tenían CMML-1 (definida como <5 % de blastos, lo que incluye promonocitos, en sangre o <10 % en médula ósea), mientras que 2 (17 %) tenían CMML-2. Diez pacientes eran varones y 2 eran mujeres (edad 52-88 años, mediana 70). Los conteos absolutos de monocitos circulantes en pacientes con CMML estaban disponibles de 9 pacientes y variaban entre 4.5x10⁹/L a 29.6x10⁹/L con una mediana de 10.0x10⁹/L. Los Leukopacks (capas leucocíticas) de donantes de sangre sanos se obtuvieron de los Centros de Sangre en el Hospital Universitario Sahlgrenska y el Hospital Kungälv, Suecia. Para la inmunofenotipificación de las células NK del paciente, se usaron muestras control de individuos de la misma edad (edad 50-82 años, mediana 65.5).

Aislamiento de células. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de los pacientes y los donantes sanos se aislaron tal como se describe. En resumen, las muestras de sangre o los leucocitos de la capa leucocítica se sometieron a centrifugación en
5 gradiente de densidad después de la sedimentación con dextrano. Se obtuvieron células NK, células CD8⁺ y monocitos de donantes sanos mediante aislamiento inmunomagnético mediante el uso del kit de aislamiento de células MACS NK, el kit de aislamiento CD8⁺ y el kit II de aislamiento de monocitos MACS II (Miltenyi Biotec, Estocolmo,
10 Suecia), respectivamente. Los blastos leucémicos primarios y los monocitos se aislaron de PBMC de pacientes mediante FACS. Los blastos se definieron como CD14⁻ CD34⁺ y los monocitos como CD14⁺CD33⁺.

15 *Producción de ROS.* La producción extracelular de ROS de células de CMML primario se midió por quimioluminiscencia potenciada con isoluminol tal como se describe. En resumen, se añadieron 2x10⁵ células a placas de 96 pocillos en presencia de isoluminol (10 µg/ml) y peroxidasa de rábano picante (HRP, 4 U/ml) y estimuladas por el
20 inductor de NOX2 N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF; 0.1 µM). La emisión de luz se registró mediante el uso de un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

Muerte de células de linfocitos. Los subgrupos de linfocitos aislados se
25 cocultivaron durante toda la noche con monocitos leucémicos primarios de pacientes con CMML con o sin inhibidores de NOX2 u otros compuestos antioxidantes a 37 °C en CO₂ al 5 %. La muerte celular de linfocitos se evaluó mediante citometría de flujo después de la tinción con un colorante de células muertas fijable LIVE/DEAD® (Life
30 Technologies). En los ensayos de expresión del receptor, las células NK purificadas se cocultivaron durante toda la noche con monocitos en

presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1 PJ34 (0.5 μ M). Los anticuerpos siguientes se usaron para la evaluación de la expresión del receptor: NKp46-PE (clon: 9E2) y DNAM-1-PE-Cy7 (clon: DX11) de Miltenyi Biotec. NKp80-APC (clon: 4A4.D10) y CD16-BV605 (clon: 3G8) de BD Pharmingen.

Se tiñeron y clasificaron subconjuntos de células T CD8⁺ en un citómetro de flujo FACSARIA II de 3-láseres (BD Biosciences). Los anticuerpos siguientes se usaron para distinguir las poblaciones de células T: CD3-Pacific Blue (clon: S4.1) de Life technologies. CD8-APC-H7 (clon: SK1), CD45RA-APC (clon: HI100), CD45RO-PE (clon: UCHL1) y CCR7-PE-Cy7 (clon: G043H7) todos de BD Pharmingen. Los subconjuntos de células T CD8⁺ se definieron de la siguiente manera: células T vírgenes (T_N) como CD45RA⁺ CCR7⁺, células de memoria central T (T_{CM}) como CD45RO⁺ CCR7⁺, células de memoria T efectoras (T_{EM}) como CD45RO⁺ CCR7⁻ y células T efectoras (T_{Eff}) como CD45RA⁺ CCR7⁻.

Ensayos de degranulación de células NK y ADCC. La degranulación de células NK y la citotoxicidad contra monocitos malignos derivados de pacientes se evaluaron en experimentos mediante el uso de lintuzumab (Abbvie, Estocolmo, Suecia), un anticuerpo anti-CD33 humanizado. Las células NK de donantes sanos se coincubaron con monocitos, marcados con tinción violeta CellTrace (Life Technologies), en presencia de anticuerpo anti-CD107a-PE-Cy7 (BD Pharmingen) y compuestos antioxidantes durante cuatro horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Posteriormente, las células se tiñeron con tinción de células muertas fijable LIVE/DEAD® (Life Technologies) y se evaluó la lisis de monocitos y la degranulación de células NK por citometría de flujo. Para experimentos de cultivo, ensayos de citotoxicidad y microscopía confocal, se usó medio esencial mínimo Dulbecco modificado de Iscoves (IDMEM) suplementado con 10 % de suero AB+ humano.

Microscopía confocal. Los monocitos leucémicos primarios de pacientes con CMML se tiñeron con anti-flavocitocromo b558 (gp91^{phox}) (clon 7D5, FITC) de Novus Biologicals y posteriormente se incubaron en un portaobjetos confocal durante 45 min en una relación 1:2 con células NK sanas en presencia de lintuzumab (1 µg/ml). Después, las células se lavaron extensamente en PBS y se montaron con reactivo antidesvanecimiento ProLong Gold con DAPI (Invitrogen). Las fotomicrografías se obtuvieron mediante el uso de un microscopio confocal Zeiss LSM700 y se analizaron mediante el uso del software ZEN Blue de Zeiss.

Compuestos. Se usaron los siguientes compuestos: dihidrocloruro de histamina (HDC; 100 µM; Sigma-Aldrich), ranitidina antagonista del receptor H₂R (Glaxo, Molndal, Suecia), AH202399AA (un control químico de la ranitidina, Glaxo), catalasa (200 U/ml; Sigma-Aldrich), interleucina-2 (IL-2; 500 U/ml; Chiron), el inhibidor de NOX2 cloruro de difenileno yodonio (DPI; 3 µM; Sigma-Aldrich), y el inhibidor de PARP-1 PJ34 (0.5 µM; Sigma-Aldrich).

Inmunofenotipaje por citometría de flujo. La expresión de células NK de receptores activadores antes y después del cultivo celular se midió mediante citometría de flujo en 10 pacientes con CMML y 10 controles sanos de igual edad. En estos experimentos, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos durante 3 días a una concentración de 1x10⁶ células por pocillo en 200 µl con presencia de IL-2 (500 u/ml). Las células se tiñeron los días 1 y 3 y se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo BD LSRFortessa SORP de 4 láseres. Las células NK se definieron como células CD3⁻/CD56⁺. Los análisis comprendieron los receptores de relevancia siguientes para la activación o maduración de células NK: NKp30-PE (clon: AF29-4D12), NKp80-APC (clon: 4A4.D10) y DNAM-1-PE-Cy7 (clon: DX11), todo de Miltenyi Biotec. NKp46-PE

(clon: 9E2), NKG2D-PE-Cy7 (clon: 1D11), LFA-1b-APC (clon: 6.7), CD57-FITC (clon: HNK-1) eran de BD Pharmingen. 2B4-FITC eran de R&D systems y NKG2C-Pacific Blue (clon: MM0488-9R17) de Novus Biologicals.

5

Se analizaron monocitos y blastos de pacientes con CMML mediante el uso de un panel que consistía en anti-CD33 (clon P67.6, PE-Cy7), anti-CD34 (clon 8G12, PE), anti-CD56 (clon NCAM16, PE-Cy7, APC), anti-CD14 (clon MφP9, APC-Cy7), anti-CD15 (clon HI98, APC), todo de BD Pharmingen. Anti-flavocitocromo b558 (gp91^{phox}) (clon 7D5, FITC). El receptor H₂ antihistamina (IgG policlonal de conejo) era de MBL International (Woburn, MA) y el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra (PE-Cy5.5) era de Invitrogen.

10

15

Análisis estadístico y consideraciones éticas. El ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Bonferroni se usó para comparaciones múltiples y la prueba *t* pareada para comparaciones únicas. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. En las figuras, los asteriscos se usan de la siguiente manera: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Todos los valores de *P* indicados son bilaterales. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Ética de Gotemburgo y todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

20

Resultados

25

Las células de CMML monocíticas expresan receptores de NOX2 e histamina H₂ funcionales. Las ROS inmunosupresoras son producidas por granulocitos malignos en la leucemia mieloide crónica y por células monocíticas malignas en la ALM, pero aún se desconoce la capacidad potencial de formación de ROS de las células de CMML primaria. En experimentos iniciales, analizamos la producción de ROS a partir de

30

células de CMML humanas junto con su expresión de NOX2, como se refleja por la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la subunidad específica de NOX2 unida a la membrana celular gp91^{phox}. La población de monocitos CD14+ en sangre periférica de pacientes con CMML
5 expresó niveles similares de gp91^{phox} al igual que los monocitos CD14+ de donantes sanos (Figura 21A y B). La fracción de monocitos CD14+ positivos para gp91^{phox} fue superior al 99 % para todos los pacientes con CMML (datos no mostrados).

10 Se ha demostrado que la señalización a través de receptores H₂ (H₂R) transduce la inhibición de la formación de ROS inducida por histamina. Las células de CMML monocíticas primarias expresaban invariablemente niveles altos de H₂R, lo que sugiere que la actividad de NOX2 puede ser el objetivo del HDC (Figura 21A y B). Mientras la mayoría de las células
15 de CMML fueron CD33CD14+, se detectó una población menor de blastos CD34+ en sangre en la mayoría de los pacientes. Por el contrario de las células de CMML monocíticas más maduras, las células blásticas CD34 expresaron niveles bajos de gp91^{phox} y niveles moderados de H₂R (Figura 21A y B). Para determinar si la expresión de gp91^{phox} reflejaba un
20 NOX2 funcional, las células CD14+ de paciente se clasificaron mediante FACS seguido del análisis de la producción de ROS después de la estimulación con fMLF, un tripéptido formilado de origen bacteriano que desencadena la formación de ROS en células mieloides humanas. Se encontró que las células de CMML monocíticas clasificadas producen
25 niveles altos de ROS y la adición de HDC suprimió significativamente la producción de ROS (Figura 21C y D). El efecto inhibitor de ROS de HDC fue, a su vez, antagonizado por la ranitidina, un antagonista de H₂R específico, pero no por un control químico de ranitidina, AH202399AA, en el que un grupo tioéter se ha reemplazado por un éter lo que reduce de
30 esta manera su afinidad a H₂R >50 veces (Figura 21C). Estos resultados

implican que el HDC suprime la producción de ROS mediada por NOX2 en células de CMML al dirigirse a H2R.

La inhibición de NOX2 promueve la degranulación de células NK y ADCC hacia células de CMML primarias recubiertas de anticuerpo. Se demostró previamente que las células mieloides sanas y malignas comprometen las funciones antitumorales de las células NK mediante la producción de ROS [16]. Adquirimos micrografías confocales de células de CMML CD14+ primarias y células NK que interactúan en experimentos de cocultivo. Al analizar la interacción entre las células de CMML CD14+ y las células NK observamos una sinapsis diferente entre las células y una polarización del NOX2 unido a la membrana hacia la célula NK (Figura 22A). El hallazgo de que las células de CMML monocíticas expresaban NOX2 en la proximidad de la sinapsis inmunológica junto con su capacidad para producir niveles altos de ROS nos incitó a estudiar si la producción de ROS puede constituir un mecanismo por el cual las células de CMML escapan de la muerte mediada por mecanismos inmunitarios. Con este fin, probamos la capacidad de las células NK estimuladas con IL-2 para degranularse en respuesta a células de CMML CD14+ primarias en presencia o ausencia de lintuzumab (anti-CD33) como el anticuerpo de enlace para mejorar las interacciones entre las células NK y las CMML. Las células NK solas mostraron poca degranulación contra las células de CMML primarias. La adición de lintuzumab aumentó significativamente las respuestas de células NK ($p < 0.01$, $n=9$) y la adición del inhibidor de NOX2 HDC mejoró aún más la respuesta de degranulación contra las células leucémicas primarias ($p < 0.01$, $n=9$; figura 22B).

Las células de CMML CD14+ inducen la muerte celular dependiente de PARP 1 en linfocitos. En experimentos de cocultivo durante toda la noche, las células de CMML CD14+ primarias desencadenaron una

muerte celular significativa en células NK sanas ($p < 0.001$, $n=6$, figura 22C) y células T CD8+ ($p < 0.001$, $n=4$, figura 23 A). La apoptosis de linfocitos inducida por CMML se evitó por los inhibidores de NOX2 HDC y DPI y por catalasa, que depura las ROS extracelulares mediante la degradación de H_2O_2 . Además, los linfocitos se rescataron de la muerte celular inducida por células de CMML por PJ34, un inhibidor de PARP-1, lo que sugiere que las ROS formadas por células de CMML inducen la muerte celular dependiente de PARP 1, conocida también como parthanatos, en células NK y células T CD8+ (Figura 22C y 23A).

Las células de CMML son supresivas preferentemente frente a subconjuntos de células T maduras. Hemos demostrado previamente que la presencia de células de memoria T efectoras CD8+ (T_{EM}) se asocia con un pronóstico favorable de pacientes con ALM que reciben inmunoterapia con HDC/IL-2 para la prevención de recaídas en la fase posterior a la consolidación. Para determinar si las células de CMML inhiben específicamente ciertos subconjuntos de células T, se clasificaron por FACS los subconjuntos de células T CD8+ (T_N , T_{CM} , T_{EM} y T_{eff}) y se cultivaron estas subpoblaciones durante toda la noche con células de CMML monocíticas primarias. La distribución de subconjuntos de células T CD8+ en sangre fue similar en pacientes con CMML y en sujetos control sanos de la misma edad (datos no mostrados). Se observó que las células de CMML inducían predominantemente la muerte celular en subconjuntos de células T CD8+ más maduros, es decir, células T_{EM} y T_{eff} , mientras que las células T_N eran en gran medida resistentes a la apoptosis inducida por células de CMML (Figura 23B). La diferencia en la apoptosis del subgrupo de células T se explicó predominantemente por la diferencia en la sensibilidad a ROS ya que el inhibidor de NOX2 DPI rescató eficientemente todos los subconjuntos de células T de la apoptosis inducida por células de CMML.

Deficiencia de expresión del receptor en células NK de pacientes con CMML. Las funciones de las células NK se regulan por los receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK. Estudios previos muestran que una expresión reducida de los receptores activadores de células NK en tumores malignos mieloides, lo que incluye AML y MDS, anuncia un pronóstico desfavorable para la supervivencia. Además, la progresión de MDS se ha asociado previamente a la modulación negativa de la activación de receptores de células NK.

Al analizar pacientes con respecto al porcentaje de células blásticas CD14⁻CD34⁺ periféricas, encontramos que el grupo de pacientes con una mayor proporción de blastos CD34⁺ circulantes (>2 % de PBMC) mostró intensidades significativamente más bajas de los receptores NKp30, NKp80 y 2B4 activadores de células NK, en comparación con controles sanos de igual edad (Figura 24A). Además, la frecuencia de células NK circulantes que expresan NKp30, NKp46, NKp80, DNAM1 y 2B4 en sangre fue menor en pacientes con CMML que en controles sanos (Figura 24B). Además, cultivamos PBMC de pacientes o donantes sanos en presencia o ausencia de IL-2 durante 72 horas y determinamos la expresión de receptores de células NK. Se observó que la estimulación de IL-2 potenciaba significativamente la expresión de NKp30, NKp46 y DNAM1 en células NK derivadas de pacientes (datos no mostrados).

Los estudios anteriores muestran que los monocitos que producen ROS modulan negativamente la expresión de receptores activadores de células NK *in vitro*. Sin embargo, aún se desconoce si la modulación negativa observada de los receptores activadores refleja eventos secundarios relacionados con el inicio de la apoptosis de las células NK en lugar de una reducción directa inducida por ROS de la expresión del receptor por las células NK. Por lo tanto, expusimos células NK a células

monocíticas productoras de ROS de donantes sanos en presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34, que mantiene la viabilidad de las células NK a pesar de la exposición a ROS. Como se muestra en la figura 25A, las células NK expuestas a ROS derivadas de monocitos en presencia de PJ34 regularon negativamente significativamente NKp46 y CD16 con una
5 tendencia similar para NKp80 y DNAM-1. No se observó una regulación negativa de la expresión del receptor de células NK cuando las células NK se expusieron a PJ34 en ausencia de células productoras de ROS (datos no mostrados).

Discusión

Las células NK y las células mieloides se acoplan en una comunicación bidireccional para iniciar respuestas inmunitarias, y se ha propuesto que las células NK moldean, regulan y terminan las respuestas inmunitarias
15 al matar subconjuntos de células mieloides. Las células NK ejercen, además, citotoxicidad contra varias células mieloides malignas. Se ha propuesto que una deficiencia de la función de las células NK afecta el curso de la enfermedad en las leucemias mieloides. Por ejemplo, conteos bajos de células NK en la sangre se asocian a recaídas de la leucemia
20 después de la interrupción del inhibidor de la tirosina quinasa en pacientes con leucemia mieloide crónica y función de células NK pobre y la expresión deficiente de NCR activadores anuncia un pronóstico sombrío en pacientes con AML.

Mientras que los detalles con respecto a los mecanismos que subyacen sobre la deficiencia de células NK en tumores malignos mieloides aún no se han definido, la formación dependiente de NOX2 de ROS extracelulares de células mieloides se ha propuesto como una vía
30 contribuyente de la inmunosupresión. Un hallazgo principal en este estudio fue que los pacientes con CMML albergan células leucémicas

monocíticas que expresan NOX2 funcional y que la liberación de ROS derivadas de NOX2 de células leucémicas desencadena la disfunción y la muerte celular en linfocitos con supuesta función antileucémica, lo que incluye células NK y células T CD8+. Además, demostramos que las estrategias para atacar las ROS derivadas de NOX2, producidas por células de CMML, mantienen la viabilidad de las células NK y subconjuntos de linfocitos CD8+ y mantienen las funciones antileucémicas de las células NK. Estas estrategias incluyeron la degradación de ROS extracelulares (catalasa) y la inhibición específica de NOX2 (DPI) junto con HDC que se une a H₂R para inhibir la función de NOX2.

Relativamente pocos estudios han abordado la inmunobiología de la CMML o el papel de los linfocitos antileucémicos para el curso de la enfermedad. En una cohorte de 41 pacientes con MDS (6 con CMML), Carlsten y colaboradores observaron que las células NK derivadas de muestras de médula ósea mostraron una citotoxicidad reducida en comparación con los controles sanos de la misma edad. Estos autores demostraron, además, una disminución en la expresión en la superficie de los receptores activadores (DNAM-1 y NKG2D) en las células NK derivadas de pacientes, lo que se correlacionó con los conteos elevados de blastos en la médula ósea. Si bien estos estudios previos no permitieron el análisis separado del compartimiento de células NK en la CMML, los resultados son compatibles con nuestro hallazgo de una expresión reducida de varios receptores activadores por las células NK de pacientes con CMML, en particular en pacientes con conteos más altos de blastos CD14⁺CD34⁺ en sangre. De acuerdo con estudios previos, observamos que las ROS producidas por células monocíticas inducen regulación negativa de los receptores de células NK activadores. Experimentos mediante el uso del inhibidor de PARP-1 PJ34 implican que las ROS desencadenan la regulación negativa de los receptores de

células NK también en ausencia de muerte celular, lo que apoya que las ROS, en lugar de eventos celulares asociados con la apoptosis temprana, reducen la expresión de receptores de células NK activadores. Nuestros resultados implican, además, que la deficiencia del receptor de células NK es al menos reversible parcialmente por la activación de citocinas (datos no mostrados), la expresión de NKp46, NKp30 y DNAM-1 en células NK de pacientes con CMML se restauró por IL-2 a niveles de MFI comparables a aquellos de donantes sanos de la misma edad.

El papel de las células T citotóxicas en la CMML no se ha caracterizado en detalle. El trasplante alogénico de células madre (allo-SCT, por sus siglas en inglés) es el único tratamiento curativo potencialmente en la CMML, lo que implica que la inmunidad de las células T probablemente desempeña un papel en la eliminación de las células malignas. Esta noción se respalda además por la eficacia clínica de la infusión de linfocitos del donante (DLI, por sus siglas en inglés) mediante el uso de células T CD3+ en pacientes con CMML con recaída después del allo-SCT. En el presente estudio, observamos que las células de CMML primarias desencadenaron una apoptosis dependiente de ROS significativa en el compartimiento de células T CD8+, en particular en las células no vírgenes que se asume median en el aclaramiento de las células leucémicas. Estos hallazgos son compatibles con un informe anterior que muestra que los T_{EM} CD8+ son sensibles altamente a la muerte celular inducida por bajos niveles de ROS exógenas. Deben definirse mejor los mecanismos que explican la sensibilidad diferencial de los subconjuntos de células T a las ROS derivadas de células de CMML. Además, se requieren estudios adicionales para aclarar si la inmunosupresión inducida por células de CMML hacia las células T impacta en el curso de la enfermedad, y si la formación de ROS por las células leucémicas puede contribuir al beneficio, según se informa, limitado del allo-SCT en la CMML.

Se ha demostrado que el inhibidor de NOX2 HDC previene la recaída de AML cuando se usa junto con una dosis baja de IL-2 después de completarse la quimioterapia. *Los análisis post-hoc* del resultado del ensayo fase III sugieren que la eficacia clínica de HDC/IL-2 es pronunciada en pacientes con AML clases 4 y 5 de acuerdo con la clasificación franco-estadounidense-británica (FAB, por sus siglas en inglés). Estos subtipos de AML contienen poblaciones leucémicas con diferenciación monocítica que portan NOX2 funcional con capacidad conservada para producir y liberar ROS junto con H₂R. Estos hallazgos han formado la base de la hipótesis de que la producción de ROS por las células de AML monocíticas puede servir como un mecanismo de escape inmunitario inducido por leucemia. Los resultados del presente estudio implican que mecanismos inmunosupresores similares pueden estar disponibles en la CMML.

En resumen, nuestros resultados sugieren que las células de CMML humanas primarias producen ROS inmunosupresoras que pueden afectar a la depuración de las células leucémicas dependiente de las células NK y las células T. Proponemos que las estrategias dirigidas a las ROS extracelulares pueden ser valiosas para mejorar la inmunidad celular antileucémica en la CMML.

Aunque determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para un experto en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones adjuntas se destinan a cubrir todas las modificaciones y cambios que caigan dentro del verdadero espíritu de la invención.