

**LINFOCITOS T REGULADORES PARA PACIENTES  
CON ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR  
CRÓNICA QUE NO OBTIENEN REMISIÓN COMPLETA  
CON RUXOLITINIB**



**Virginia Escamilla Gómez**

**2022**



*A Juan Pedro, por tu infinita paciencia*



*La ciencia no puede resolver el último misterio de la naturaleza. Y eso se debe a que, en última instancia, nosotros mismos somos una parte del misterio que estamos tratando de resolver.*

***Max Planck***



## **Agradecimientos**

Debo agradecer el desarrollo de esta tesis a mi tutor y director el Profesor José Antonio Pérez Simón, por confiar en mi trabajo y haberme brindado la oportunidad de realizarlo en el seno de un gran equipo.

A Alfonso Rodríguez Gil, mi director de tesis, por su visión analítica y racional de todo, y por tener siempre respuesta a todas mis preguntas.

A mis técnicos Palmira, Chari y Toñi, compañeras de fatiga, por las muchas horas que hemos pasado juntas al pie del CliniMACs.

A Estefanía García Guerrero, por su empeñado optimismo.

A Paola, por su cariño y alegría.

A Clara García, por su actitud siempre dispuesta a colaborar.

A Teresa Caballero, por su gran capacidad metódica.

A Reyes, por su gran profesionalidad.

A Estefanía Menéndez, por estar siempre pendiente de todo.

A Cristina, Nancy, Laura y Eva, grandes compañeras del Laboratorio de Criobiología.

A Conchi, Antonio, Charo Ferrete, Charo López, Loli y Rocío, equipo de enfermería y auxiliares de aféresis.

A Melanie, Bejarano, Maite, María, Belén y Maribel, por haberme acogido en el Laboratorio y haberme hecho sentir una más del equipo.

A los donantes, por vuestro carácter altruista digno de elogiar.

Y en especial, a los pacientes, motivo de elaboración de esta tesis, por cuya vida estaré siempre dispuesta a velar.



## **Abreviaturas**

7-AAD: 7 aminoactinomicina D  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ALT: alanina aminotransferasa  
ASH: American Society of Hematology  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATG: timoglobulina  
BAFF: factor Activador de Linfocitos B  
Bax: proteína X asociada a Bcl-2  
BCL-2: B cell Lymphoma  
BCR: receptor de células B  
BIM: proteína 11 Bcl-2-like  
BOS: síndrome de bronquiolitis obliterante  
Breg: linfocitos B reguladores  
BT: bilirrubina total  
BTK: tirosina quinasa de Bruton  
CD: cluster of differentiation  
CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal  
CF: ciclofosfamida  
CFSE: Éster succinimidil de carboxifluoresceína  
CM: células centrales de memoria  
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad  
CMN: células mononucleadas  
CMV: citomegalovirus  
Col: colaboradores  
CPA: célula presentadora de antígenos  
CCR9: receptor de citoquinas CC tipo 9  
CsA: ciclosporina A  
CSDM: células supresoras derivadas de línea mieloide  
CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events  
CTLA-4: antígeno citotóxico de células T 4  
CU: cordón umbilical  
DAMPs: patrones moleculares asociados a daño  
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DE: donante emparentado  
DFCI: Dana Farber Cancer Institute  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DMT: dosis máxima tolerada  
DNE: donante no emparentado  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EE: enfermedad estable  
EICH: enfermedad de injerto contra huésped  
EICHa: enfermedad de injerto contra huésped aguda  
EICHc: enfermedad de injerto contra huésped crónica  
EICL: efecto de injerto contra leucemia  
ELISA: enzimoimmunoanálisis  
EM: células efectoras de memoria  
EMRA: células terminalmente diferenciadas  
Enf.: enfermedad  
EudraCT: European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials Database  
FACT-BMT: Functional Assessment of Cancer Therapy - Bone Marrow Transplantation  
FCS: FACS Flow buffer  
FDA: Food and Drug Administration  
FSC: forward scatter  
FoxP3: transcription factor forkhead box P3  
GETH: Grupo Español de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular  
GFP: *green fluorescent protein*  
GI: gastrointestinal.  
GMP: *good manufacturing practices*  
Gy: gray  
HEPES: N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid  
HLA: human leukocyte antigen  
HLAid: HLA idéntico  
IBiS: Laboratorio del Instituto de Biomedicina de Sevilla  
IBMTR: Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea  
IC: intervalo de confianza  
IgG: inmunoglobulina G

IL: interleucina  
IS: inmunosupresión  
iTregs: Treg inducidos  
ITK: tyrosine-protein kinase  
iv: intravenoso  
JAK: janus kinase  
kDa: Kilodalton  
Kg: kilogramo  
LOPD: Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal  
min: minuto  
mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico  
ml: mililitro  
MFI: intensidad de fluorescencia media  
MMF: micofenolato mofetil  
MO: médula ósea  
mTOR: mammalian Target of Rapamycin  
NFAT: factor de células T activadas  
NF-κB: factor nuclear Kappa B  
NIH: Instituto Nacional de la Salud  
NK: natural killer  
NKreg: linfocitos NK reguladores  
NKT: linfocitos natural killer T  
NR: no respuesta  
nTregs: Treg naturales  
PABA: ácido paraaminobenzoico  
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PD-1: molécula de muerte programada 1  
PDGFR $\alpha$ : platelet-derived growth factor receptor A  
PD-L1: ligando 1 de muerte programada  
PEG: polietilenglicol  
Progr: progresión  
PROM: patient reported outcome measures

RC: respuesta completa  
RD: Real Decreto  
Reclut.: reclutamiento  
RPMI: Medio del Roswell Park Memorial Institute  
RM: respuesta mixta  
ROCK2: Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2  
SBF: suero bovino fetal  
sc: subcutáneo  
SC: superficie corporal  
SEM: error estándar de la media  
SG: supervivencia global  
SP: sangre periférica  
STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription  
SYK: Spleen Associated Tyrosine Kinase  
RG: respuesta global  
RP: respuesta parcial  
RM: respuesta mixta  
Tcon: células T convencionales  
Tc1: linfocitos T citotóxicos 1  
TCR: receptor de célula T  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta  
Th0: linfocitos T efectores convencionales  
Th1: linfocitos T helper 1  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
TNFR2: receptor 2 del factor de necrosis tumoral  
TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos  
Tr1: células T reguladoras tipo-1  
TREC: T cell receptor excision circles  
Treg: linfocitos T reguladores  
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

# Índice

1	Introducción .....	1
1.1	Complicaciones del trasplante hematopoyético.....	1
1.1.1	Enfermedad injerto contra huésped .....	1
1.1.1.1	Concepto y tipos .....	1
1.1.1.2	Fisiopatología.....	1
1.1.1.3	Incidencia y factores de riesgo.....	3
1.1.1.4	Diagnóstico y evaluación de la EICH aguda y crónica.....	4
1.1.2	Tratamiento de la EICH.....	9
1.1.2.1	Líneas actuales de tratamiento .....	9
1.2	Linfocitos Treg .....	16
1.2.1	Métodos convencionales de obtención de linfocitos Treg.....	19
1.2.1.1	Principales fuentes de linfocitos Treg.....	19
1.2.1.2	Principales métodos de obtención de linfocitos Treg .....	20
1.2.2	Justificación para el empleo de los linfocitos Treg en la EICH .....	21
1.2.3	Ensayos pre-clínicos con linfocitos Treg .....	22
1.2.3.1	La depleción TREG tras TPH agrava la EICH y la mortalidad.....	22
1.2.3.2	La infusión de linfocitos Treg reduce la EICH y la mortalidad.....	23
1.2.3.3	La infusión de Treg en fresco preserva el EICL .....	24
1.2.4	Principales ensayos clínicos con linfocitos Treg .....	24
2	Hipótesis.....	31
3	Objetivos .....	35
4	Material y métodos.....	39
4.1	Muestras biológicas .....	39
4.1.1	Muestras celulares para cultivo .....	39
4.1.2	Muestras de origen animal.....	39
4.1.3	Muestras de origen humano.....	39

4.2	Equipos y consumibles .....	40
4.2.1	Citómetro .....	40
4.2.2	Software de análisis de citometría .....	40
4.2.3	Reactivos .....	40
4.2.3.1	Reactivos empleados en los cultivos celulares .....	40
4.2.3.2	Reactivos empleados en el ensayo de supresión.....	43
4.2.3.3	Reactivos empleados en el modelo murino .....	44
4.2.3.4	Reactivos empleados en el ensayo clínico .....	45
4.2.4	Cell sorter .....	48
4.2.5	Animalario .....	48
4.2.6	Equipos de imagen <i>in vivo</i> .....	48
4.2.7	AutoMACS Pro Separator (Miltenyi).....	48
4.2.8	CliniMACs Plus (Miltenyi Biotec).....	49
4.3	Procedimientos.....	49
4.3.1	Modelo preclínico.....	49
4.3.1.1	Modelo <i>in vitro</i> .....	49
4.3.1.2	Modelo murino .....	50
4.3.2	Estudio retrospectivo ruxolitinib .....	54
4.3.2.1	Población de estudio .....	54
4.3.2.2	Diseño del estudio.....	55
4.3.2.3	Administración del tratamiento .....	55
4.3.2.4	Bajada de inmunosupresión, duración del seguimiento y criterios de retirada del estudio.....	55
4.3.2.5	Evaluación de la respuesta al tratamiento .....	56
4.3.2.6	Toxicidades y eventos adversos.....	57
4.3.2.7	Reactivación de infecciones.....	57
4.3.3	Ensayo clínico Horizonte 2020 TREGeneration .....	57

4.3.3.1	Selección de pacientes y donantes .....	57
4.3.3.2	Diseño del estudio.....	60
4.3.3.3	Método de selección, formulación e infusión de linfocitos Treg.....	61
4.3.3.4	Bajada de inmunosupresión, duración del seguimiento y criterios de retirada del estudio.....	63
4.3.3.5	Evaluación de la respuesta y seguimiento .....	64
4.3.3.6	Toxicidades .....	70
4.3.3.7	Estudios biológicos .....	70
4.3.3.8	Citometría .....	71
4.3.3.9	<i>Cell sorting</i> .....	73
4.4	Métodos estadísticos .....	73
5	Resultados .....	77
5.1	PARTE I: Estudio retrospectivo con ruxolitinib.....	77
5.1.1	Eficacia del ruxolitinib en el tratamiento de la EICH aguda.....	78
5.1.2	Eficacia del ruxolitinib en el tratamiento de la EICH crónica.....	81
5.1.3	El ruxolitinib no aumenta la reactivación de infecciones virales respecto a la tasa de reactivación previa al inicio del tratamiento .....	84
5.1.4	Ruxolitinib presenta un perfil de toxicidad aceptable .....	85
5.1.5	Ruxolitinib no disminuye el EICL.....	86
5.2	PARTE II: Modelo preclínico.....	87
5.2.1	Modelo in vitro .....	87
5.2.1.1	Cultivos celulares.....	87
5.2.1.2	Ensayo de supresión.....	93
5.2.2	Modelo murino .....	96
5.2.2.1	La terapia combinada de ruxolitinib y Treg disminuye la gravedad de la EICH en modelo murino .....	96
5.2.2.2	La terapia combinada con ruxolitinib y Treg no afecta al efecto injerto contra leucemia.....	101

5.3	PARTE III: Ensayo clínico con linfocitos Treg y ruxolitinib.....	103
5.3.1	Análisis de datos clínicos .....	103
5.3.1.1	Población de análisis incluida.....	103
5.3.1.2	La aféresis de linfocitos del donante fue segura .....	105
5.3.1.3	La selección celular de linfocitos Treg no expandidos fue posible ....	105
5.3.1.4	La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg permitió disminuir el tratamiento inmunosupresor .....	106
5.3.1.5	Respuesta de la EICHc a la terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg .....	107
5.3.1.6	La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg produjo una mejora en la sintomatología de la EICHc .....	112
5.3.1.7	La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg fue segura con un perfil de toxicidad aceptable.....	113
5.3.1.8	La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg no provocó ningún detrimento en la supervivencia ni el efecto injerto contra leucemia .....	115
5.3.2	Análisis de datos biológicos .....	115
5.3.2.1	La terapia combinada con infusión de linfocitos Treg y ruxolitinib favorece el ratio Treg:Tcon in vivo a lo largo del tiempo .....	115
5.3.2.2	No se observaron cambios significativos en las poblaciones de linfocitos Treg ni en otros subtipos de estas.....	120
5.3.2.3	La terapia combinada con infusión de linfocitos Treg y ruxolitinib no afecta a los recuentos de linfocitos T.....	123
5.3.2.4	No se observaron cambios significativos en las poblaciones de linfocitos B .....	126
6	Discusión.....	131
6.1	PARTE I: Estudio retrospectivo con ruxolitinib.....	131
6.2	PARTE II: Modelo preclínico.....	137
6.2.1	Modelo in vitro .....	137
6.2.1.1	Cultivos celulares.....	137

6.2.1.2	Ensayo de supresión.....	141
6.2.2	Modelo murino .....	142
6.3	PARTE III: Ensayo clínico con linfocitos Treg y ruxolitinib.....	145
7	Conclusiones .....	157
8	Bibliografía.....	161



# **INTRODUCCIÓN**



## **1 Introducción**

### **1.1 Complicaciones del trasplante hematopoyético**

#### **1.1.1 Enfermedad injerto contra huésped**

##### **1.1.1.1 Concepto y tipos**

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es una complicación frecuente tras el trasplante alogénico de progenitores hemapoyéticos (TPH), que se produce por el reconocimiento y efecto citotóxico de los linfocitos alorreactivos del donante sobre órganos y tejidos sanos del receptor. Tradicionalmente se reconocen dos formas de EICH en base a sus características clínicas y desarrollo temporal, la EICH aguda y crónica.

La EICH aguda se definió originalmente como aquella que ocurre en los 100 días posteriores al trasplante, si bien en la actualidad son las manifestaciones clínicas y no el desarrollo temporal lo que permiten identificar la forma aguda o crónica. Las manifestaciones son variadas, pero generalmente afectan la piel, el tubo digestivo y el hígado; las células del sistema inmunitario del donante involucradas son principalmente células T<sup>1</sup>. La EICH crónica suele acontecer tras los 100 primeros días posterior al trasplante, aunque se han descrito casos de aparición desde el primer mes postrasplante. Las manifestaciones de la EICH crónica pueden ocurrir a nivel multiorgánico, pudiendo afectar a la piel, los ojos, la mucosa oral, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones, las articulaciones, el pelo y las uñas, aparato genitourinario y el sistema linfohematopoyético. Las células del sistema inmunitario principalmente involucradas son las células T, B y sistema monocito macrófago<sup>2</sup>. También se describe la EICH aguda persistente, que comprende aquellas manifestaciones de EICH aguda que aparecen más allá del día 100 postrasplante; y el síndrome “overlap”, que se caracteriza por la aparición simultánea de manifestaciones de EICH aguda y crónica.

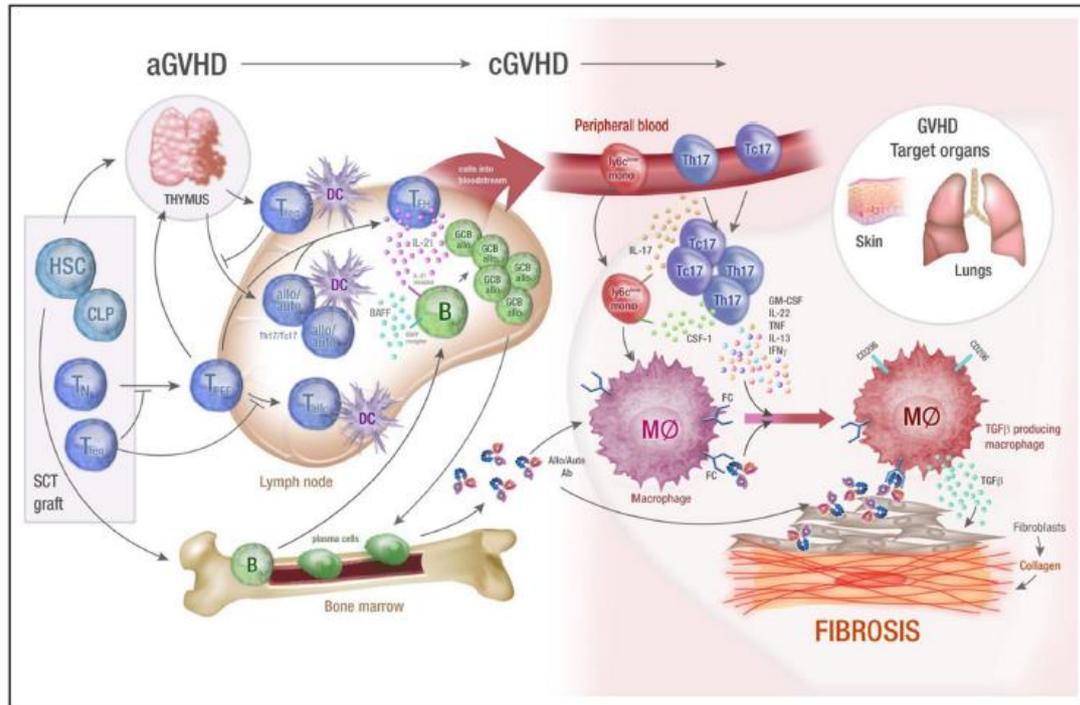
##### **1.1.1.2 Fisiopatología**

El evento inicial que condiciona el desarrollo de la EICH aguda es la activación de células T alorreactivas procedentes del donante; esta activación está condicionada por el daño tisular causado por los regímenes de acondicionamiento que se administran antes del trasplante y que da lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF (factor de necrosis tisular), IL-6 (interleucina 6) e IL-1 (interleucina 1). Estas citoquinas, junto con la liberación de patrones moleculares asociados a daño, o DAMPs por sus siglas en

inglés, y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), son procesados por las células presentadoras de antígeno del receptor. Como consecuencia, se produce la interacción entre estas células presentadoras de antígenos y linfocitos T alorreactivos procedentes del donante, produciéndose la activación de los mismos y su diferenciación hacia linfocitos T *helper* 1 (Th1)/ T citotóxicos 1 (Tc1) y Th17/Tc17, y dando lugar a la expansión de células T efectoras. El resultado es una fase final efectora caracterizada por la migración de dichas células hacia los órganos diana, produciendo daño citotóxico y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF $\alpha$ , que a su vez generan necrosis tisular. Además, las células T alorreactivas producen daño tímico que altera la reconstitución inmune a largo plazo. Todo este proceso de activación y destrucción está modulado en parte por células inmunomoduladoras como células T reguladoras (Treg), células T reguladoras tipo-1 (células Tr1), células NKT y células supresoras derivadas de línea mieloide (CSDM)<sup>1,3,4</sup>.

En la EICH crónica, las células B y T alorreactivas y autorreactivas presentes como consecuencia del daño tímico, que conduce a la pérdida de tolerancia central (alterando los procesos de selección positiva y negativa) juegan un papel fundamental (Figura 1.1)<sup>5,6</sup>. De forma esquemática, la fisiopatología de la EICHc se puede dividir en 3 etapas: 1) Fase de inflamación y daño tisular, en la cuál el daño producido en las células endoteliales facilita la migración de células T a los ganglios linfáticos y consecuentemente a los órganos diana; 2) Fase de activación de células T efectoras y linfocitos B en los centros germinales, que a su vez producen autoanticuerpos y factores de crecimiento (como CSF-1) que provocan la activación del sistema monocito-macrófago, dando lugar al predominio de un fenotipo profibrótico promovido por citoquinas como IL-17. A todo ello se une la pérdida de la tolerancia periférica, mediante la reducción del compartimento de células reguladoras, como células Treg, Breg, NKreg, células NKT invariantes y Tr1<sup>7</sup>, esenciales para la homeostasis periférica. La activación de células B frente a autoantígenos es otra consecuencia de la pérdida de la tolerancia central y/o periférica, de modo que los linfocitos B autorreactivos no son eliminados y presentan un fenotipo con una supervivencia y capacidad proliferativa en presencia del factor soluble BAFF; 3) Fase de fibrosis. En este punto la activación macrofágica juega un papel muy importante. La activación de los macrófagos se produce a través de la interacción de anticuerpos producidos por linfocitos B aberrantes sobre los receptores Fc gamma de su superficie así como a través del receptor de CSF. El resultado es la liberación de TGF- $\beta$ , el cual a su

vez produce la activación de los fibroblastos y el consecuente depósito de colágeno, fibrosis y disfunción orgánica irreversible.



**Figura 1.1.** Esquema general de los mediadores celulares y moleculares implicados en la fisiopatología de la EICH<sup>5</sup>. Tanto las células T *naïve* como sus precursoras contribuyen a la fisiopatología de la EICHc. Las células T alorreactivas producen daño tímico que altera la reconstitución inmune, lo cual lleva a la polarización de células Th17 y Tc17 que promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos. Las células dendríticas alteran su capacidad para mantener las células Treg en la periferia. Las células T *helper* foliculares favorecen la expansión de células B centrogerminales. La activación de los macrófagos se produce a través de la interacción de anticuerpos producidos por linfocitos B aberrantes sobre los receptores Fc gamma de su superficie, lo cual conlleva a la activación de los fibroblastos y depósito de colágeno.

### 1.1.1.3 Incidencia y factores de riesgo

La incidencia de la EICH viene determinada por diversos factores. Entre los factores de riesgo para la EICH aguda se encuentran la disparidad HLA, la mayor edad de los receptores, la presencia de aloinmunización previa y la profilaxis empleada para la

EICH<sup>8</sup>. Su incidencia se sitúa entre el 25-55% de los pacientes en los 100 primeros días postrasplante.

En la EICH crónica se reconocen algunos factores de riesgo como el uso de sangre periférica como fuente de trasplante, la mayor edad de los donantes, el uso de donantes no emparentados o con disparidad HLA, la irradiación corporal total o el empleo de donante mujer en receptor varón<sup>9</sup>. Su incidencia se estima entorno al 5-40% en los dos primeros años postrasplante.

#### **1.1.1.4 Diagnóstico y evaluación de la EICH aguda y crónica**

El diagnóstico de la EICHa se basa en la presencia de daño en piel, hígado y/o tubo digestivo, manifestado como exantema, hiperbilirrubinemia y diarrea. Además, existen formas atípicas que pueden dar lugar a manifestaciones en otros órganos<sup>10</sup>. La heterogeneidad clínica y el momento de aparición dificultan el diagnóstico diferencial con otros procesos intercurrentes, como toxicidad por fármacos, síndrome de obstrucción sinusoidal o procesos infecciosos, por lo que el estudio histopatológico, siempre que sea posible, es fundamental para apoyar el diagnóstico, establecer el número de órganos afectados, así como de diferenciarlo de otros procesos intercurrentes.

Las dianas hacia las que se dirigen los linfocitos en la EICHa incluyen las células epiteliales de la dermis, el epitelio intestinal y el epitelio de los conductos biliares. Las características histopatológicas son similares, basándose en la presencia de un infiltrado de linfocitos acompañado de necrosis. La clasificación histopatológica también varía de formas leves a severas (grados I a IV).

A continuación, se resumen las principales manifestaciones clínicas e histopatológicas de la EICH aguda (Tablas 1.1 y 1.2)<sup>11</sup>:

Localización	Descripción
Piel	Rash maculopapular eritematoso, asociado o no a prurito y/o dolor En casos severos, bullas que pueden progresar a descamación
Hígado	Colestasis con o sin ictericia Aumento de enzimas colestásicas con respecto a las transaminasas
Tracto gastrointestinal	Superior: anorexia, náuseas y vómitos Inferior: diarrea con o sin sangre fresca, acompañado de dolor abdominal, y en ocasiones, íleo paralítico

**Tabla 1.1.** Principales manifestaciones clínicas en la EICH aguda.

Localización	Descripción
Piel	Grado I: vacuolas en células basales epidermoides Grado II: presencia de queratinocitos necróticos Grado III: áreas confluentes de queratinocitos necróticos formando bullas Grado IV: desprendimiento de la epidermis
Hígado	El hallazgo más característico es la presencia de daño en los conductos biliares de pequeño tamaño, habitualmente en combinación con la presencia de colestasis. Necrosis periportal con presencia de infiltración linfocítica
Tracto gastrointestinal	Grado I: necrosis de células individuales Grado II: pérdida de criptas individuales Grado III: pérdida de $\geq 2$ criptas individuales adyacentes con ulceración Grado IV: denudación del epitelio

**Tabla 1.2.** Principales características histopatológicas de la EICH aguda.

La clasificación y estadiaje de la EICH aguda se detalla en la siguiente tabla (Tabla 1.3) según la escala MAGIC<sup>12</sup>:

<b>Score de afectación por órganos</b>				
	<b>Piel (Eritema activo)</b>	<b>Hígado (Bilirrubina)</b>	<b>Tracto GI superior</b>	<b>Tracto GI inferior (volumen diarrea/día)</b>
0	Ausencia de rash activo	<2 mg/dL	No o náuseas intermitentes, vómitos o anorexia	Adultos: <500 mL/día o <3 episodios/día Niños: <10 mL/kg/día o <4 episodios/día
1	Rash maculopapular <25% SC	2-3 mg/dL	Náuseas persistentes, vómitos o anorexia	Adultos: 500-999 mL/día o 3-4 episodios/día Niños: 10-19.9 mL/kg/día o 4-6 episodios/día
2	Rash maculopapular 25-50% SC	3.1-6 mg/dL		Adultos: 1000-1500 mL/día o 5-7 episodios/día Niños: 20-30 mL/kg/día o 7-10 episodios/día
3	Rash maculopapular >50% SC	6.1-15 mg/dL		Adultos: >1500 mL/día o >7 episodios/día Niños: >30 mL/kg/día o >10 episodios/día
4	Eritrodermia generalizada (>50% SC) más descamación y formaciones bullosas >5% SC	>15 mg/dL		Dolor abdominal severo con o sin íleo severo Heces sanguinolentas (independientemente del volumen de diarrea)
<b>Grado global (basado en el órgano más severamente afecto)</b>				
<b>Grado 0</b>	Ninguna afectación			
<b>Grado 1</b>	Piel grado 1-2; no afectación en hígado, tracto GI superior o inferior			
<b>Grado 2</b>	Piel grado 3 y/o hígado grado 1 y/o tracto GI superior grado 1 y/o tracto GI inferior grado 1			
<b>Grado 3</b>	Hígado grado 2-3 y/o tracto GI inferior grado 2-3, con piel grado 0-3 y/o tracto GI superior grado 0-1			
<b>Grado 4</b>	Piel grado 4, hígado o tracto GI inferior afecto, tracto GI superior grado 0-1			

**Tabla 1.3.** Clasificación y estadiaje de la EICH aguda<sup>1,12</sup>. SC = superficie corporal; BT = bilirrubina total; GI = Gastrointestinal.

El diagnóstico de la EICH crónica requiere de una evaluación integral, a menudo multidisciplinar, dada la heterogeneidad de sus manifestaciones clínicas. Se basa en la presencia de síntomas a nivel de 8 órganos. Al igual que ocurre en la EICH aguda, las manifestaciones clínicas son heterogéneas, pudiendo afectar a multitud de órganos entre los que se encuentran la piel, los ojos, la mucosa oral, el hígado, el tracto gastrointestinal, los pulmones, el área genital y la fascia y articulaciones (Tabla 1.4).

<b>Órgano</b>	<b>Descripción</b>
<b>Piel</b>	Eritema Rash maculopapular Prurito Esclerodermia Liquen plano Liquen escleroso Morfea Despigmentación Lesiones papuloescamosas Ictiosis, queratosis, hiperpigmentación
<b>Ojos</b>	Sequedad ocular, que puede llegar a queratitis sicca
<b>Oral</b>	Eritema Cambios liquenoides Ulceraciones Mucocelos
<b>Pulmón</b>	Bronquiolitis obliterante
<b>Fascia y articulaciones</b>	Restricción en la movilidad articular Miositis Debilidad muscular Dolor Edema

**Tabla 1.4.** Principales manifestaciones clínicas de la EICH crónica<sup>2,13</sup>.

La severidad de la EICH se evalúa mediante el uso de la escala NIH<sup>14</sup>. Se trata de una escala internacional validada que incluye información sobre el número de órganos afectados y la severidad en la que se halla afectado cada órgano, que se gradúa de 0 al 3, de menor a mayor afectación. La severidad global se evalúa en función del número de órganos afectados y su severidad, pudiendo catalogarse en leve, moderada y severa (Tabla 1.5.).

<b>Severidad global</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>
Número de órganos afectados	1-2	≥3	≥3
Severidad de los órganos afectados	Leve (se excluye la afectación pulmonar)	Leve-moderado (en pulmón sólo grado leve)	Severo (en pulmón grados moderado o severo)

**Tabla 1.5.** Clasificación y estadiaje de la EICH crónica<sup>2,13</sup>.

Además, existen cuestionarios validados que permiten puntuar la calidad de vida de estos pacientes, frecuentemente afectada. Entre las principales escalas validadas encontramos los cuestionarios de Lee y FACT-BMT<sup>15,16</sup>.

La escala de Lee fue diseñada para evaluar la sintomatología relacionada con la EICHc. El cuestionario pregunta a los pacientes sobre el grado de molestias experimentado en 7 zonas potencialmente afectadas por la EICH: ojos, piel y mucosa oral, respiración, digestión, músculos y articulaciones, energía y estrés emocional. La evidencia publicada soporta la validez, fiabilidad y sensibilidad de dicho cuestionario. El cuestionario FACT-BMT es otra escala diseñada para validar la sintomatología de EICH y se pregunta por el impacto de la sintomatología en 5 esferas relacionadas con el bienestar general, el impacto social/familiar, aspectos emocionales, bienestar funcional y preocupaciones adicionales. Ambos cuestionarios se encuentran ampliamente aceptados y validados como métodos de evaluación cualitativas del impacto de la EICH en la calidad de vida.

## 1.1.2 Tratamiento de la EICH

### 1.1.2.1 Líneas actuales de tratamiento

Dentro de la primera línea de tratamiento para la EICHa, en las formas leves se puede optar por tratamiento con corticoides tópicos, mientras que en la afectación en tubo digestivo se pueden emplear corticoides con acción local como la beclometasona. Para los grados más avanzados se requiere inmunosupresión sistémica, siendo el *gold standard* la administración de metilprednisolona iv, a dosis de 0,5 a 2 mg/kg/día durante 7-14 días, para posteriormente reducir la dosis progresivamente<sup>17</sup>. Aproximadamente el 40-50% de los pacientes responden al tratamiento de primera línea. Un ensayo clínico ha mostrado que la rapamicina es una alternativa de eficacia similar a los corticoides dentro de la primera línea de tratamiento<sup>18</sup>.

El fallo a la primera línea de tratamiento se define como la progresión de los síntomas a los 3-5 días del inicio del tratamiento o la falta de respuesta a los 7-14 días<sup>19</sup>. En este contexto, existe una multitud de agentes terapéuticos que se han probado en combinación con los corticoides, como los fármacos inhibidores de linfocitos T, la fotoaféresis extracorpórea y los anticuerpos monoclonales, entre otros. Entre los fármacos inhibidores de linfocitos T, el sirolimus, inhibidor de mTOR, ha mostrado una eficacia del 57-86%<sup>18</sup>; mientras que con el micofenolato mofetilo, inhibidor de la síntesis de purinas, tiene una eficacia en torno al 46-79%<sup>20</sup>. En cuanto a los anticuerpos monoclonales, el infliximab, anti-TNF $\alpha$ , permite alcanzar unas tasas de respuesta del 40-67%<sup>21,22</sup> si bien se asocia con una alta incidencia de infecciones. Etanercept es otro anticuerpo monoclonal cuyo patrón de respuestas e infecciones es similar a infliximab<sup>23</sup>. Otros anticuerpos monoclonales, como inolimumab, dirigen su diana a IL-2R $\alpha$ , y se describen respuesta del 42-63%. La supervivencia global se sitúa en torno al 19-26%. Al igual que otros anti-TNF $\alpha$  asocia un elevado riesgo de infecciones oportunistas<sup>24,25</sup>.

En cuanto a la EICHc, las formas leves pueden recibir tratamiento tópico, como corticoides o tacrolimus en caso de afectación cutánea, el clobetasol para la afectación oral o mediante el uso de lágrimas artificiales sustitutivas en el caso de afectación ocular. Para el tratamiento de formas leves en otros órganos como el tracto digestivo suele emplearse la beclometasona oral.

De forma general, los corticoides constituyen la primera línea de tratamiento<sup>17</sup> en la EICHc moderada a severa, habitualmente a dosis de 1 mg/kg/día durante 1-2 semanas, para posteriormente reducir la dosis progresivamente un 20-30% cada 2 semanas. Al interaccionar con el receptor de corticoides, presente en células del sistema inmune, modifican la expresión de genes proinflamatorios, como NF- $\kappa$ B y activación de genes proapoptóticos como BIM o Bax. El inconveniente de este tratamiento es que su uso a largo plazo produce toxicidad y promueve el desarrollo de infecciones debido a la inmunosupresión prolongada.

Aproximadamente un 50-60% de estos pacientes precisarán una segunda línea de tratamiento. Las indicaciones para iniciar una segunda línea incluyen el empeoramiento de la EICHc en un órgano previamente afectado, el desarrollo de nuevos signos o síntomas en otro órgano, la falta de respuesta después de un mes de tratamiento de primera línea o la toxicidad relacionada con el tratamiento. En este contexto, numerosos ensayos clínicos han intentado evaluar el uso de diversos fármacos. El ibrutinib ha sido aprobado por la FDA como segunda línea de tratamiento para la EICHc, en base a un ensayo de fase I/II con 42 pacientes en el que se consiguió una tasa de respuesta del 67%. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición irreversible de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), reduciendo la activación linfocitaria B y T, y consecuentemente inhibiendo la producción de BAFF, IL-6, IL-4, y TNF- $\alpha$ . Como toxicidad de este tratamiento se ha descrito un incremento en la incidencia de infecciones fúngicas<sup>26</sup>. Hay que señalar que, aunque el fármaco fue aprobado, no obtuvo resultado significativo en su *endpoint* primario ( $p = 0,09$ ).

Más allá de la segunda línea, el belumosudil, inhibidor de la vía ROCK-2, también ha sido recientemente aprobado por la FDA como tratamiento de EICHc en adultos y pacientes pediátricos  $\geq 12$  años tras fallo a dos líneas de tratamiento<sup>27</sup>. Su aprobación se basa en el estudio ROCKstar (KD025-213), ensayo randomizado y multicéntrico en pacientes con EICHc tras 2-5 líneas de tratamiento obteniendo respuestas globales del 73% (68% respuestas parciales, 5% respuestas completas).

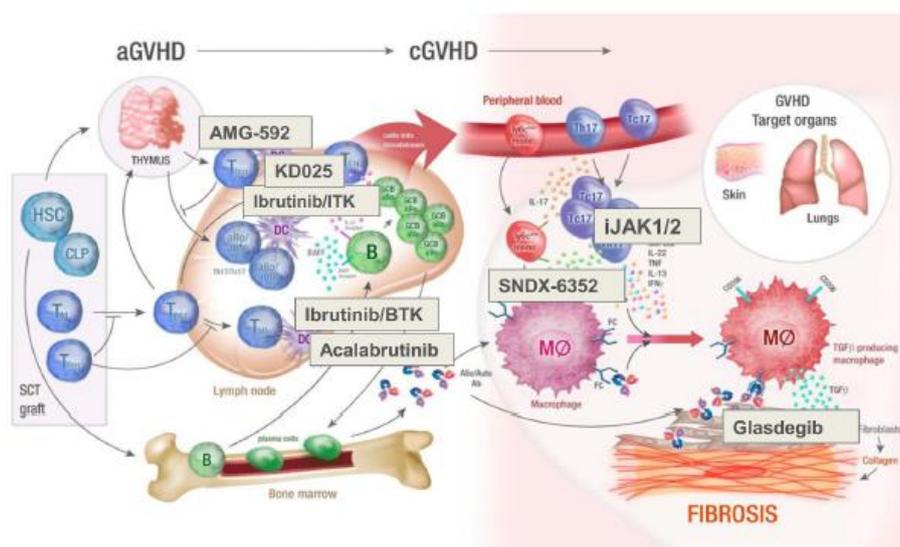
Otras líneas de tratamiento incluyen el uso de diversos agentes como la fotoaféresis extracorpórea, bortezomib, rituximab, imatinib o inhibidores de calcineurina. Aunque se

utilizan en la práctica clínica, ninguno de ellos ha obtenido aprobación por la FDA o la EMA.

En la tabla 1.6 se resumen algunas de las líneas de tratamiento actualmente disponibles o evaluadas en ensayos clínicos para el tratamiento de la EICHc más allá de la primera línea de tratamiento (Tabla 1.6 y figura 1.2).

Agente	Mecanismo
IL-2 +/- ECP, IL-2, Tregs	Células Treg
Ruxolitinib, baricitinib, itacitinib	Inhibidores JAK 1/2
Acalabrutinib, ibrutinib (BTK/ITK), ofatumumab, obinotuzumab (CD20)	Células B/Señalización BCR
Anticuerpos CSF-1R (SENDX)	Monocito/Macrófago
Abatacept (CTLA-4Ig)	Bloqueo de señales co-estimulatorias
Ixazomib	Inhibidores del proteasoma
KD025	Inhibidores ROCK2
Glasdegib, vismodegib, LDE225	Inhibidores de la vía hedgehog
Células mesenquimales, células dendríticas, Tregs expandidas	Terapia celular

**Tabla 1.6.** Nuevas terapias dirigidas y su mecanismo de acción<sup>28</sup>.



**Figura 1.2.** Nuevas terapias dirigidas actualmente testándose en diferentes ensayos clínicos. Adaptado de Flowers<sup>28</sup>.

#### 1.1.2.1.1 Inhibidores de la vía JAK-STAT

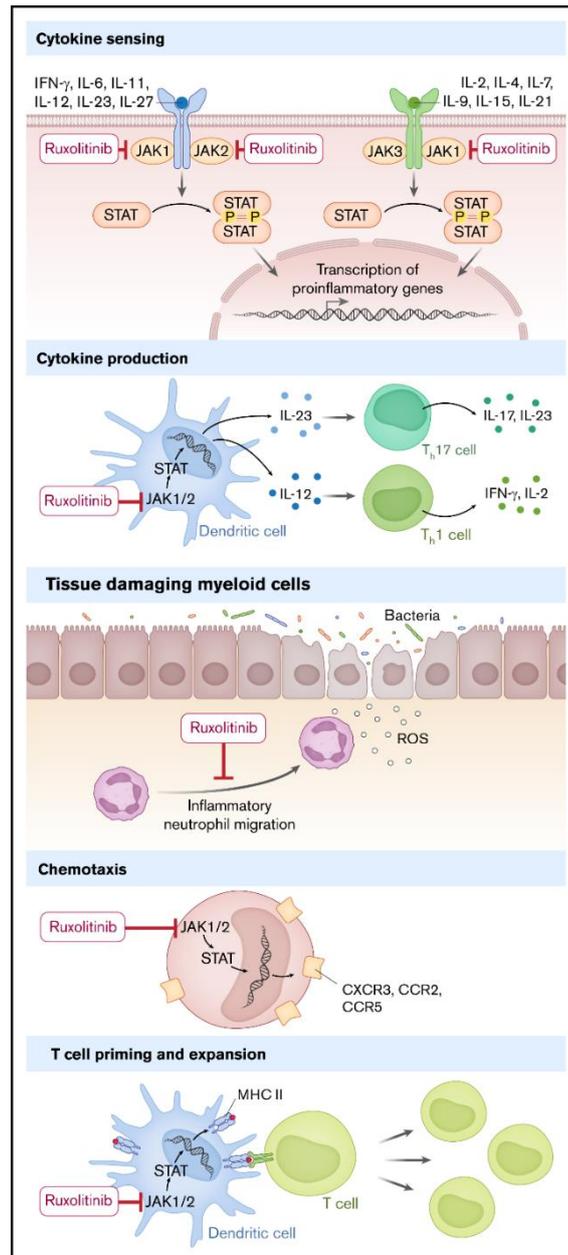
En el momento de plantear el presente trabajo de tesis doctoral, se está evaluando el uso de inhibidores de la vía JAK-STAT, como el ruxolitinib, tanto en la EICH aguda como crónica.

Los inhibidores de las quinasas JAK pueden impedir la activación de los linfocitos T convencionales (Tcon) a través de la supresión de la fosforilación de factores como STAT1, 3, 4, 5 y 6, imprescindibles para la activación y supervivencia celular. Dichos inhibidores están aprobados en el tratamiento de la mielofibrosis<sup>29</sup> y para la policitemia vera con respuesta inadecuada o intolerancia a la hidroxiurea<sup>30</sup>.

#### 1.1.2.1.2 Justificación para el empleo de ruxolitinib

Diversos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la inhibición de la vía JAK se asocia a la reducción en la severidad la de EICH aguda y crónica, y un aumento en la supervivencia global, sin interferir en el efecto injerto contra leucemia (EICL)<sup>31</sup>.

La inhibición de la vía JAK1/2 interfiere a distintos niveles la activación inmune. Así, el ruxolitinib interfiere en las vías de señalización y producción de citoquinas, el reclutamiento de células hacia los tejidos dañados, la quimiotaxis, y la proliferación de células T efectoras<sup>32</sup> (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Efecto del ruxolitinib en la EICH aguda<sup>33</sup>.

### 1.1.2.1.3 Estudios preclínicos

Spoerl y colaboradores reportan en un modelo murino un descenso en la severidad de la EICHa y mejoría de la supervivencia en el grupo de ratones tratados con ruxolitinib. En un análisis más detallado, argumentan que la inhibición de la vía JAK resulta en una reducción en la proliferación de linfocitos T efectoras, la supresión en la producción de citoquinas proinflamatorias, y el aumento en el número circulante de células Treg

favoreciendo la tolerancia inmunológica<sup>34</sup>. Siguiendo el mismo argumento, otros autores demuestran también que el uso de inhibidores de la vía JAK1/2 reduce la EICH y preserva el EICL<sup>35,36</sup>.

### 1.1.2.1.4 Estudios retrospectivos

En base a los resultados de los modelos preclínicos, Spoerl y col., realizaron un estudio clínico con 6 pacientes con EICHa refractaria a corticoides y administraron tratamiento con ruxolitinib. Todos los pacientes respondieron, constituyendo la primera prueba de concepto a escala clínica<sup>34</sup>.

Posteriormente, otros estudios clínicos retrospectivos han analizado un mayor número de pacientes también en el contexto de la EICH aguda o crónica<sup>37-39</sup>, con resultados favorables.

Entre los estudios retrospectivos con mayor número de pacientes analizados, el grupo alemán liderado por Robert Zeiser publica un estudio en el que 95 pacientes con EICH moderada-severa, refractarios a esteroides con una mediana de 3 líneas de tratamiento, fueron tratados con ruxolitinib<sup>40</sup>. Las tasas de respuestas globales (RG) fueron de 81% y 85% para EICH aguda y crónica respectivamente con tasas de hasta un 46% de remisiones completas (RC) en EICHa. Las tasas de supervivencia global (SG) a 6 meses fueron de 79% y 97% respectivamente, y a un año del 62,4 % y 92,7 %; tasas muy superiores a las objetivadas con cualquier otra estrategia terapéutica en este grupo de pacientes. El perfil de seguridad fue igualmente satisfactorio, siendo los efectos secundarios más frecuentes las citopenias y reactivación de CMV. Tampoco hubo un detrimento en el EICL, dado que las tasas de recaída de enfermedad hematológica fueron del 9,3% y 2,4% en pacientes con EICH aguda y crónica, respectivamente.

Estos datos sugieren que ruxolitinib proporciona un beneficio clínico evidente y respuestas duraderas en pacientes con EICH refractaria a corticoides.

### 1.1.2.1.5 Estudios prospectivos: REACH 1, 2 y 3

Los estudios REACH son una serie de tres ensayos clínicos en los que se evalúa el uso de ruxolitinib en pacientes de EICH refractarios a corticoides<sup>41</sup>.

El estudio REACH1 (NCT02953678) es un ensayo clínico de fase II para evaluar el uso de ruxolitinib en el contexto de la EICHa grados II-IV refractaria a corticoides<sup>42</sup>. Este ensayo incluyó un total de 49 pacientes, a los que se les administró ruxolitinib a una dosis inicial de 5 mg/12 h, pudiendo incrementar la dosis hasta 10 mg/12 h a los 3 días de tratamiento si no se observaba toxicidad. La respuesta global a día 28 fue del 57.1%. El hecho de determinar el día 28 de tratamiento como punto estándar para valorar respuesta global (respuesta parcial + remisión completa) en la EICHa se basa en un estudio previo de supervivencia realizado por John E. Levine y col.<sup>43</sup> que estableció dicho punto temporal como punto crucial para categorizar de forma fiable a qué tiempo desde el inicio del tratamiento para EICHa la respuesta predice la supervivencia de los pacientes, siendo capaz de identificar aquellos pacientes con alto riesgo de mortalidad o aquellos que podrían beneficiarse de otras alternativas de tratamiento.

El estudio REACH2 (NCT02913261) se trata de un ensayo clínico de fase III randomizado en proporción 1:1 que utiliza ruxolitinib frente a la mejor terapia disponible para el tratamiento de la EICH aguda refractaria a esteroides<sup>33</sup>. La respuesta global a día +28 fue del 62.3% vs. 39.4% en el grupo control; *odds ratio* 2.64, IC 95% 1.65-4.22,  $p < 0.001$ . También la duración de la respuesta a día +56 fue superior en el brazo de ruxolitinib 39.6% vs. 21.9% en el brazo control, *odds ratio* 2.38, IC 95% 1.43-3.94,  $p < 0.001$ , permitiendo el descenso del ruxolitinib en los pacientes respondedores.

El estudio REACH3 (NCT03112603) es un ensayo clínico fase III en proporción 1:1 que evalúa el uso de ruxolitinib frente a la mejor terapia disponible en pacientes que presenten EICHc refractaria a corticoides<sup>44-46</sup>. La respuesta global medida en la semana 24 fue del 49,7% en el grupo de ruxolitinib vs. 25,6% en el grupo control, consiguiendo unas tasas de RC del 6,7% y 3% respectivamente.

Dada la importancia de los resultados de los estudios mencionados, éstos se discutirán en mayor profundidad en la discusión de la presente tesis doctoral.

## 1.2 Linfocitos Treg

Los linfocitos Treg son una subpoblación de linfocitos T caracterizados por la expresión de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Suponen alrededor del 5-10% de la población circulante de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y su función es controlar la respuesta inmune innata y adaptativa, previniendo así las enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>47</sup>.

### Fenotipo de las células Treg:

Las células Treg se caracterizan por expresar marcadores específicos tales como CD4, CD25, el factor de transcripción FoxP3; expresan bajos niveles de CD127 y dependen de la interleucina-2 (IL-2) para su proliferación y supervivencia.

El CD4 es una glucoproteína monomérica de superficie que se expresa en la superficie de algunas células T y células dendríticas. Su función es participar en la sinapsis inmunitaria permitiendo la adhesión de células T a otras células diana y participan en la transmisión de señales intracelulares durante su activación. El marcador CD25 se corresponde con la cadena alfa del receptor de IL-2. No es un marcador exclusivo de los Treg, ya que también se expresa en linfocitos Tcon activados. En el caso de las Treg, refleja una dependencia de IL-2, necesaria para su estimulación y supervivencia, ya que las Treg no producen IL-2 por sí mismas, y dependen de la producida por otros tipos celulares<sup>48</sup>. En ausencia de IL-2 exógena, son células capaces de suprimir la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mediante una reacción dependiente de IL-10 y de TGF- $\beta$ , y dicha actividad supresora también se extiende a otros tipos celulares como células NK, macrófagos y células presentadoras de antígenos (CPAs)<sup>49</sup>. FoxP3 (transcription factor forkhead box P3) es un factor de transcripción esencial en el desarrollo y función de los linfocitos Treg<sup>50</sup>. Su expresión es típica de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y se correlaciona con la actividad supresora de estas células.

Las células Treg además expresan otros marcadores como CTLA-4, cuya función es inhibir la función de los linfocitos T; la IL-10, inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias por los linfocitos T y macrófagos; y el TGF- $\beta$ , que es una citoquina pleiotrópica con distintos efectos en función del tipo celular sobre el que actúe, pero que en el caso que nos ocupa ejerce un papel inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T y B mientras que favorece la expansión de Treg<sup>51</sup>.

Subtipos:

Podemos distinguir dos tipos de células Treg en función de su origen, las Treg naturales o de origen tímico, y las inducidas o periféricas.

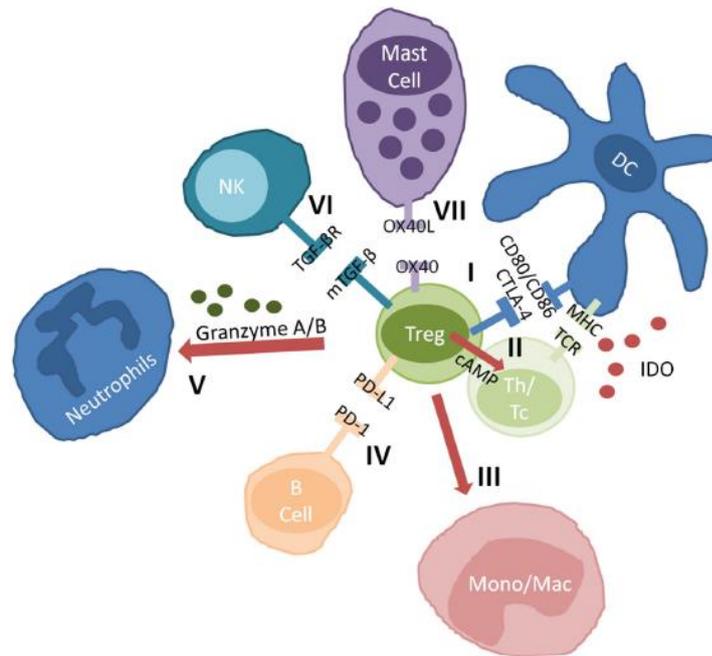
Las Treg naturales se originan en el timo mediante un proceso de selección positiva y negativa. Existen distintos modelos para explicar esta selección, como se revisa en el trabajo publicado por Hsieh CS y col<sup>52</sup>. Según el denominado modelo instructivo, aquellas células T que mantienen una avidéz intermedia son las que reciben las señales necesarias para su supervivencia, constituyendo el repertorio de células Treg. Aquellos linfocitos T con una avidéz alta son eliminados. Aquellos que mantienen una avidéz baja se caracterizan por ser FoxP3<sup>-</sup> y se diferenciarán en células T efectoras convencionales (Th0). Por otro lado, según el modelo estocástico, los linfocitos reciben señales previas a la selección que determinan su diferenciación hacia Tcon o Treg. En este caso, aquellos linfocitos con TCR con una alta afinidad solo sobrevivirán si previamente han sido diferenciados hacia Treg.

Las células Treg inducibles o periféricas son aquellas células T inmaduras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> inducidas en la sangre periférica bajo determinadas condiciones de estimulación antigénica. Dichas células expresan CD25 durante la respuesta antigénica pero de una manera variable, no proliferan en respuesta a citoquinas y no producen IL-10. Se cree que podrían jugar un papel importante en la regulación de la respuesta autoinmune, sin embargo, su fenotipo es mucho menos estable que el de las células Treg naturales<sup>53</sup>.

Ambos tipos celulares, regulan negativamente la función de las células T activadas en distintos escenarios inmunológicos.

Mecanismo de acción:

Las células Treg actúan a distintos niveles en la periferia, aunque sus capacidades supresoras se ejecutan principalmente a través del contacto célula-célula con diferentes subtipos celulares (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Mecanismo de acción de las células Treg. **(I)**. Supresión de la expresión antigénica vía CTLA-4. **(II)**. Inhibición de la activación de Th y células T efectoras mediante interacción célula-célula. **(III)**. Inducción de la apoptosis. **(IV)**. Inhibición de la proliferación de linfocitos B vía PD-1. **(V)**. Inducción de la apoptosis en neutrófilos. **(VI)**. Inhibición de la proliferación de células NK. **(VII)**. Inhibición de la degranulación de los mastocitos<sup>54</sup>.

La unión a células presentadoras de antígenos se lleva a cabo mediante moléculas como CD80 (B7 1), CD86 (B7 2) y CTLA-4, CD28, respectivamente. Dicha unión desencadena la expresión de FoxP3, el cual compite con el factor de células T activadas (NFAT) en la región promotora de genes tales como IL-2, IL-4 y TNF $\alpha$ . El resultado es la inhibición de la cascada señalizadora de la activación y proliferación de los linfocitos Th. Otro mecanismo de acción es a través del secuestro de IL-2. Por tanto, las células Treg competirían con las células Tcon por esta citoquina. La falta de IL-2 detiene la proliferación de otros subtipos celulares e induce la apoptosis mediante la producción de perforinas y granzima B, generadas principalmente por linfocitos CD4+FoxP3+ en el ambiente tumoral<sup>49,54,55</sup>. La inhibición de células B autorreactivas implica la interacción entre PD-1, expresado por células B, y PD-L1 ligando, presente en las células Tregs. De esta forma, suprime la producción de autoanticuerpos e inhiben la proliferación de los linfocitos B induciendo su apoptosis. Las células Tregs también inhiben los

monocitos/macrófagos parcialmente a través de IL-10, IL-4 e IL-13. Además, las células Tregs pueden producir apoptosis de neutrófilos y otras células mediante la secreción de perforinas y granzimas. En cuanto a las células NK, las células Tregs inhiben la producción de interferón y la producción y citotoxicidad de células NK. Finalmente, las Tregs pueden inhibir la degranulación de los mastocitos, mediado a través de la molécula de superficie OX40, en la superficie de las células Tregs, y su ligando OX40L, en la superficie de los mastocitos.

Por último, se ha descrito que las células Treg producen adenosina extracelular, la cual tiene una relevancia funcional para la inmunorregulación celular, dado que se ha observado en modelos murinos que aquellos ratones con formas CD39-null (marcadores asociados a la producción de adenosina) presentan propiedades inmunosupresoras deficientes y no logran reducir el efecto injerto contra huésped<sup>56</sup>.

### Funciones:

La función de las células Treg es esencial para mantener la tolerancia inmunológica y juegan un papel fundamental en la fisiopatología de diversas enfermedades, no sólo en el contexto de la EICH, sino también en patologías como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, diabetes tipo II, enfermedad inflamatoria intestinal, alergia o insuficiencia renal, entre otras<sup>57</sup>. Por tanto, asegurar un adecuado número y capacidad funcional de las mismas es fundamental para prevenir o tratar el rechazo del injerto y otras enfermedades relacionadas.

## **1.2.1 Métodos convencionales de obtención de linfocitos Treg**

### **1.2.1.1 Principales fuentes de linfocitos Treg**

Las principales fuentes de obtención de células Treg son la sangre periférica y la sangre de cordón umbilical.

El uso de sangre periférica tiene la ventaja de ser de más fácil acceso. Los Treg representan un 5-10% de los linfocitos T CD4+ circulantes en sangre periférica, por lo

que para su uso es necesario recurrir a técnicas específicas de purificación como la selección o la expansión.

La sangre de cordón umbilical también se ha utilizado para obtener y seleccionar células Treg, debido a que el porcentaje de estas células en cordón es superior al que se observa en sangre periférica. Probablemente esto se debe, al menos en parte, a que en sangre periférica la exposición antigénica incrementa la presencia de células T CD4+ efectoras activadas con niveles de expresión variables de CD25<sup>58</sup>. Sin embargo, el número de células Treg totales en sangre de cordón es también limitado. Por tanto, el uso de esta fuente habitualmente requiere la expansión de células Treg.

#### **1.2.1.2 Principales métodos de obtención de linfocitos Treg**

Las células Treg comprenden sólo un 5-10% de los linfocitos T CD4+ circulantes en sangre periférica. Por ello se han ideado distintos métodos de selección de linfocitos Treg<sup>54,58</sup>.

El procedimiento más utilizado es la selección inmunomagnética. A partir de células mononucleadas obtenidas de sangre periférica o cordón umbilical, se realiza una depleción de linfocitos CD8+ y CD19+, y posteriormente un enriquecimiento de células CD25+, consiguiendo de esta manera una pureza del 50-80% de células CD4+CD25+FoxP3+. Presenta la ventaja de no requerir un laboratorio en condiciones GMP. Entre los inconvenientes, la dificultad de obtener en ocasiones suficiente número de células Treg.

La expansión *in vivo* mediante la estimulación con bajas dosis de IL-2 o con rapamicina es otro método de obtención de linfocitos Treg. El uso de IL-2 subcutáneo a bajas dosis ha sido testado en estudios clínicos de fase I, demostrando aumentar el pool circulante de células Treg<sup>59</sup>. La rapamicina, por otra parte, aumenta la expresión de FoxP3 dependiente de TGF- $\beta$  y limita la activación y expansión de células T efectoras. En primates la administración de rapamicina ha demostrado aumentar la vida media y la estabilidad de las células Treg<sup>60</sup>.

La expansión *ex vivo* consiste en la extracción de linfocitos Treg y su cultivo en condiciones específicas de proliferación mediante estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2, antes de transferirse al receptor. En otros estudios la expansión se realiza mediante células presentadoras de antígenos con anticuerpos CD3 o mediante el uso de agonistas TNFR2<sup>61,62</sup>. Entre las ventajas de la expansión *ex vivo* se encuentra el poder controlar la capacidad funcional y fenotípica de los linfocitos Treg expandidos, pero el inconveniente de que puede tardar hasta 2 semanas en la manufactura del producto, no siempre se obtiene la dosis requerida y requiere fabricación en condiciones GMP. Otro inconveniente es la reducción en la pureza del producto obtenido como consecuencia de la expansión de otros subtipos celulares contenidos en el inóculo. Una solución propuesta ha sido el uso de rapamicina, dado que inhibe la proliferación de linfocitos Tcon y aumenta la de las células Treg<sup>63,64</sup>.

Por último, se ha propuesto la generación de linfocitos Treg *in vitro* a partir de linfocitos CD4+ convencionales mediante el uso de factores como TGF- $\beta$  e IL-2<sup>65</sup>, bortezomib<sup>66</sup> o azacitidina<sup>67</sup>.

Los resultados de los próximos ensayos nos permitirán conocer con mayor profundidad las ventajas e inconvenientes de estas técnicas.

### **1.2.2 Justificación para el empleo de los linfocitos Treg en la EICH**

Diversos estudios ponen de manifiesto déficits cuantitativos o cualitativos de los Treg en pacientes con EICH que favorecen la proliferación, expansión y supervivencia de las células T efectoras. Esta reconstitución inmune no balanceada contribuye al desarrollo de la EICH<sup>68</sup>. Aunque los factores que contribuyen a la reducción en los recuentos de células Treg no están completamente elucidados, entre las posibilidades se encuentra una producción tímica reducida, una reducción en la capacidad proliferativa de las Treg *naïve*, un fracaso en la supervivencia debido a un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis y una diferenciación preferente de las células T en células T efectoras en presencia de IL-6 y TGF- $\beta$  en el contexto inflamatorio<sup>5,68-71</sup>. Además, la IL-6 actúa como supresor de células Treg.

En cuanto a la producción tímica reducida, el daño producido por las células T alorreactivas tanto en la zona medular como la corteza tímica da lugar a la pérdida de la tolerancia central (se alteran los procesos de selección positiva y negativa) y a un número reducido de células Tregs. Existen publicaciones como la de Rezvani<sup>72</sup> y col. donde los autores describen cómo la presencia de mayores recuentos de células Treg en el inóculo se asocia a una disminución en el riesgo de presentar EICH, y a la inversa. Aquí la terapia adoptiva con células T reguladoras podría tener un papel para el mantenimiento de la homeostasis del pool de células Treg circulantes mediante infusión de las mismas.

Otros estudios describen una reducción en la capacidad proliferativa de las Tregs *naïve* y una mayor susceptibilidad a la apoptosis. Se basa en el hallazgo de niveles reducidos de Ki67 (marcador de proliferación) en las células Tregs *naïve* en el postrasplante alogénico en estudios que han evaluado la reconstitución inmune en un periodo de seguimiento de hasta dos años<sup>68,71</sup>. De forma similar se estudió la susceptibilidad a la apoptosis, hallándose un aumento en la expresión de marcadores como CD95 (marcador de apoptosis de vía extrínseca) y BCL-2 (marcador de apoptosis de vía intrínseca). De nuevo, la terapia adoptiva con células Tregs podría tener un papel clave, dado que los linfocitos Tregs seleccionados procederían del donante, y por tanto, de una población inmunoefectora normal.

Por otro lado, la presencia de IL-6 y TFG-  $\beta$  en el contexto inflamatorio, promueve la diferenciación en células T efectoras, contribuyendo al desequilibrio homeostático que favorece el desarrollo de la EICH. En este contexto, la terapia adoptiva con células Treg también podría ayudar al mantenimiento de la homeostasis inmune.

### **1.2.3 Ensayos pre-clínicos con linfocitos Treg**

#### **1.2.3.1 La depleción TREG tras TPH agrava la EICH y la mortalidad**

Algunos estudios preclínicos han demostrado el papel de las células Treg en la biología de la EICH<sup>69,73,74</sup>.

Cohen y col. demuestran que las células Treg presentes en el trasplante regulan la aparición de EICH. En su modelo murino, realizan dos grupos de tratamiento de los cuáles

uno es sometido a trasplante alogénico con  $10 \times 10^6$  de células T totales y otro con  $10 \times 10^6$  de células deplecionadas de células Treg, comprobando cómo la eliminación de estas células del inóculo se traduce en la aparición mucho más temprana de manifestaciones de EICH y una supervivencia global disminuida con respecto al grupo control. Estos mismos resultados han sido observados en otros estudios, como el de Taylor y col., utilizando el mismo concepto. En su modelo, la depleción de células Treg dio como resultado un aumento en la mortalidad por EICH indicando que dichas células juegan un papel fundamental en el desarrollo de la EICH<sup>74,75</sup>. Además, mostraron que la activación y expansión de Treg disminuyó la aparición y severidad de EICH en su modelo murino.

### **1.2.3.2 La infusión de linfocitos Treg reduce la EICH y la mortalidad**

En el mismo trabajo, Cohen y colaboradores inoculan  $10 \times 10^6$  células T totales junto con  $5 \times 10^6$  células Treg, y observan que la adición de células Treg en el momento de la infusión retrasa e incluso previene la aparición de EICH en el grupo de tratamiento con respecto al grupo control<sup>74</sup>. En otros estudios, como el de Hannon y col., utilizan también un modelo murino con dosis menores de linfocitos Treg obtenidos de 6 voluntarios humanos en un modelo xenogénico. De forma análoga, realizan 6 experimentos independientes con 6 grupos de ratones a los que infundieron en fresco  $2 \times 10^6$  células mononucleadas,  $2 \times 10^6$  células mononucleadas más  $10^6$  linfocitos Treg, y otro grupo con  $10^6$  linfocitos Treg. Cada grupo presentó dosis y ratios diferentes tanto de células mononucleadas como de células Treg. La infusión de la doble combinación de nuevo demostró retrasar la aparición de EICH y mejorar la supervivencia en 5 de los 6 grupos de ratones<sup>76</sup>.

La infusión de linfocitos Treg expandidos también ha sido evaluada en modelos preclínicos. Taylor y col. describen que las células Treg tienen una capacidad modesta para regular la activación de células CD4+ alorreactivas *in vivo* debido a su baja frecuencia en sangre periférica. Por ello emplean la infusión de linfocitos Treg expandidos *in vitro*. El experimento consistió en trasplantar 3 grupos de ratones con  $2 \times 10^6$  células T *naïve*, que posteriormente fueron aleatorizados en tres grupos: uno control, otro al que se le añadieron  $2 \times 10^6$  células T CD4+CD25-, y un tercer grupo al cual se le añadieron  $2 \times 10^6$  células T CD4+CD25+. La supervivencia fue claramente mejor en el grupo de ratones tratados con infusión adicional de Treg. Como contraargumento, señalan que presentaron problemas en el método de expansión de dichas células, y señalan que

los distintos métodos de expansión empleados podrían resultar en distintas subpoblaciones celulares con diferente potencial supresor/efector al deseado<sup>73</sup>.

### **1.2.3.3 La infusión de Treg en fresco preserva el EICL**

Algunos autores como Edinger y col. han reportado que pese al potencial supresor de las células Treg, éstas son capaces de preservar el EICL mediado por las células Tcon. Argumentan que las células Treg inhiben la proliferación, pero no la activación de las Tcon. En su modelo murino, el crecimiento tumoral se evitó mediante la adición de células Treg a células Tcon, infiriendo así que las células Treg no afecta a la capacidad de las células Tcon de realizar el EICL<sup>77</sup>.

### **1.2.4 Principales ensayos clínicos con linfocitos Treg**

Los alentadores resultados de los estudios preclínicos han motivado la realización de varios ensayos clínicos con células Treg en pacientes con EICH. Sin embargo, dada la multitud de técnicas empleadas y diferentes fuentes de obtención, el enfoque práctico en el ámbito clínico ha generado varias preguntas: ¿Cuál es la mejor fuente de células para la terapia adoptiva, la sangre periférica o la de cordón umbilical? ¿Cuál es el mejor método de obtención de células Treg, la selección inmunomagnética o la expansión *in vitro*? ¿Cómo se deben expandir las células Treg *in vitro*? ¿Deben las células Treg ser policlonales o enriquecerse con antígenos específicos? ¿Cuál es la dosis óptima? ¿Deben administrarse fármacos adicionales para mejorar la eficacia del tratamiento con células Treg?

Existen publicaciones como la de Rezvani<sup>72</sup> y col. que han demostrado el rol de las Treg en la EICH. En este estudio los autores describen cómo la presencia de mayores recuentos de células Treg en el inóculo se asocia a una disminución en el riesgo de presentar EICH, y a la inversa. Para ello, analizaron la expresión de FoxP3 en células T CD4+ de 32 donantes de células progenitoras infundidos a sus respectivos receptores HLA idénticos, y examinaron la frecuencia de EICH y su relación con la cantidad de células Treg en el inóculo, encontrando una disminución en el riesgo de EICH en aquellos que presentaban mayores cantidades. Además, se realizó un seguimiento a 21 de estos receptores encontrando asociación entre la presencia de una menor cantidad de células Treg en el día +30 y la aparición de EICH.

El grupo de Lacerda y col. del Hospital de Santa María de Lisboa, plantea la hipótesis de que la infusión de células Treg de donante en fresco podría aumentar el pool de células Treg circulantes. Utilizan un método de selección *ex vivo* en fresco de linfocitos Treg procedente de sangre periférica de donantes sanos, para obtener la fracción enriquecida de dichas células mediante un doble procedimiento; primero una depleción de células CD8+ y CD19+, seguido de un enriquecimiento de células CD25+. Se establecieron tres niveles de dosis: A)  $0,5 \times 10^6/\text{kg}$ , B)  $1 \times 10^6/\text{kg}$  y C)  $2 \times 10^6/\text{kg}$ . Todas las dosis fueron seguras. Los resultados preliminares de su ensayo están aún pendientes de publicar.

Un ensayo de fase I/II<sup>78</sup> estudió la infusión peritrasplante de linfocitos Treg y Tcon en 12 pacientes con enfermedades hematológicas malignas sometidos a trasplante de donante HLA idéntico con selección de CD34+. La purificación se llevó a cabo primero mediante selección inmunomagnética de células CD25+, seguido de sorting de células CD4+CD127<sup>low</sup>CD25+. La pureza de células Tregs CD4+Foxp3+ fue superior al 90%. Se establecieron dos cohortes: los primeros 5 pacientes recibieron Tregs criopreservados en un régimen de trasplante que no incluyó inmunosupresión posterior, mientras que los restantes 7 pacientes recibieron Tregs en fresco añadiendo bajas dosis de tacrolimus o sirolimus postrasplante. La modificación del protocolo se realizó en base a la aparición de EICH en la primera cohorte, sugiriendo en sus resultados que las células Tregs criopreservadas no funcionarían de forma tan favorable como las células Tregs en fresco.

Otro grupo liderado por Di Ianni<sup>79</sup> estudió el efecto de la infusión de células Treg en el contexto del trasplante haploidéntico como profilaxis de EICH en 28 pacientes. Cuatro días después de la infusión de los Treg, se realizó la infusión de células CD34+ seleccionadas acompañada de células Tcon del donante. El estudio utilizó el método de enriquecimiento de células Treg de donante en dos pasos a través del uso de microesferas inmunomagnéticas con el dispositivo CliniMACS (Miltenyi Biotec) similar a la propuesta en nuestro estudio: co-depleción de células CD8+ y CD19+ seguido de selección positiva de células CD25+. El producto celular enriquecido con Treg mostró capacidad supresora *in vitro* en una relación producto enriquecido:Tcon de 1:2. No se observó toxicidad con la infusión de hasta  $4 \times 10^6$  células enriquecidas en Treg/kg, a pesar de la infusión posterior de hasta  $2 \times 10^6$  células Tcon/kg. La relación Tcon:Treg fue 1:2 en la mayoría de los pacientes (y 1:4 en el primer grupo de cuatro pacientes). No se administró inmunosupresión postrasplante, si bien el acondicionamiento incluyó ATG. Sólo dos

pacientes desarrollaron EICH aguda y ningún paciente desarrolló EICH crónica. Además, la recuperación inmunitaria de los pacientes fue rápida, con un rápido aumento en las supoblaciones de células T y su repertorio. Las células T específicas para patógenos se recuperaron de forma temprana con menos episodios de reactivación de citomegalovirus que un grupo control que no recibió la infusión de Treg más Tcon. Finalmente, con una mediana de seguimiento de 12 meses hubo sólo una recaída postrasplante, indicando que las células Treg preservan el EICL.

Un estudio posterior del mismo grupo italiano al de Di Ianni y col.<sup>80</sup>, centrado en el EICL examinó la recaída postrasplante en 43 pacientes con leucemia aguda de alto riesgo en el contexto del trasplante haploidéntico, planteando un esquema similar. El 15% de ellos desarrollaron EICH aguda de grado  $\geq 2$ . Con una mediana de seguimiento de 46 meses, la incidencia de recaídas fue muy baja (0,05 %) y significativamente mejor que los controles históricos. Por tanto, las células Treg pueden suprimir la EICH sin perder el EICL.

La infusión de Treg también ha sido estudiada en el contexto del trasplante de cordón umbilical. Un ensayo con 23 receptores de trasplante sometidos a doble trasplante de cordón umbilical de la Universidad de Minesota<sup>81</sup>, evaluó la seguridad de infundir Treg de cordón umbilical expandidos *ex vivo* con anti-CD3 y anti-CD28, e IL-2. Los pacientes recibieron una dosis de  $0,1-30 \times 10^5$  células Treg/kg después del trasplante. No se observaron toxicidades post-infusión. En comparación con 108 controles históricos tratados de forma idéntica sin infusión de Treg de cordón, hubo una menor incidencia de EICH aguda de grado II-IV (43% frente a 61%,  $p=0,05$ ) sin efectos nocivos sobre la infección, la recaída o la mortalidad temprana. Sin embargo, los Tregs infundidos solo pudieron detectarse *in vivo* durante 14 días. Posteriormente este mismo grupo desarrolló un nuevo método de expansión basado en la estimulación *ex vivo* de células Treg con células K562 modificadas para expresar CD64 y CD86<sup>82</sup>. El objetivo fue conseguir un mayor número de células expandidas y analizar la viabilidad del procedimiento de manufactura, seguridad y eficacia. Se realizaron 11 infusiones con dosis celulares de  $3-100 \times 10^6$  /kg postrasplante. De ellos, 5 productos no alcanzaron la dosis objetivo ( $100 \times 10^6$ /kg) y 2 productos no alcanzaron la dosis mínima requerida ( $3 \times 10^6$ /kg). La incidencia de EICH aguda a los 100 días del trasplante fue del 9% vs. el 45 % en el grupo control ( $p 0,05$ ). La incidencia de EICH crónica a 1 año postrasplante fue de 0% en el

grupo tratado con Tregs vs. 14 % en el grupo control (*p value* no disponible). De forma similar al estudio previo, las células Tregs infundidas no pudieron detectarse más allá de 14 días a pesar de la infusión de dosis mayores.

Aparte de las intervenciones centradas específicamente en el aumento directo de células Treg mediante selección o expansión *ex vivo*, otras aproximaciones han buscado la activación y proliferación indirecta de dichas células, sin llegar a la selección o expansión de células Tregs, como el uso de IL-2 o la ciclofosfamida postrasplante.

La IL-2 es una citoquina esencial en la activación de las células T, particularmente de las células CD8+. Sin embargo, a bajas dosis, activa preferentemente a las células Treg debido a su abundante expresión de CD25, receptor de alta afinidad a IL-2<sup>58</sup>. En un estudio de fase I para la EICHc refractaria a esteroides realizado en el Dana Farber Cancer Institute (DFCI), la terapia diaria con bajas dosis de IL-2 subcutánea ( $1 \times 10^6$  UI/m<sup>2</sup>) durante 8 semanas fue segura y tolerable. Se incluyeron 23 pacientes, observando respuesta clínica (respuesta parcial, RP) en la mitad de los pacientes evaluables, y un aumento significativo del número de células Treg *in vivo* en todos. Sin embargo, incluso con la terapia de IL-2 a dosis bajas, la mitad de los participantes con EICHc no obtuvieron beneficio clínico<sup>59</sup>.

Otras aproximaciones *in vivo* incluyen la depleción de células T mediante el uso de ciclofosfamida postrasplante. Esta terapia ha demostrado eliminar las células T CD8+ sin alterar el número de células Treg, con el efecto profiláctico postrasplante añadido de las mismas. Se postula que el mecanismo por el que las células Treg son resistentes a la ciclofosfamida es debido a su alto contenido en aldehído deshidrogenasa<sup>83,84</sup>.

Por tanto, la mayoría de las publicaciones hacen referencia a productos obtenidos de cordón umbilical, y en el contexto del trasplante haploidéntico. Además, en la mayoría de dichos estudios la infusión de Treg se ha empleado como profilaxis y son pocos los estudios que lo emplean como tratamiento de la EICH.

En el momento en el que iniciamos nuestro estudio además existía una carencia de estudios prospectivos centrados en el tratamiento de EICH crónica con Treg obtenidos *ex vivo* mediante selección inmunomagnética a partir de sangre periférica. Por todo ello,

nuestra propuesta será estudiar específicamente este método de selección en pacientes con EICH crónico refractario.

# HIPÓTESIS



## 2 Hipótesis

Los inhibidores JAK, como el ruxolitinib, son importantes reguladores de la transducción intracelular de algunas vías implicadas en el desarrollo de la EICH y juegan un papel en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica dada su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos Tcon, sin impedir la activación y proliferación de linfocitos Treg. Con estos antecedentes, analizamos el uso de ruxolitinib en el tratamiento de la EICH dentro del Grupo Español de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular (GETH) con el objetivo de sumar evidencia a la escasa información disponible en el momento del estudio, terminando de posicionar esta nueva estrategia terapéutica entre las distintas opciones disponibles para el tratamiento de la EICHc.

Además, en el contexto de la EICHc también existe una disminución en el número y función de los linfocitos Treg circulantes. Nuestra hipótesis es que la combinación del ruxolitinib con una infusión única de linfocitos Treg podría ejercer un potencial efecto sinérgico, en un intento por mejorar la calidad de las respuestas obtenidas. Si esta hipótesis es correcta, la combinación de ruxolitinib y los linfocitos Treg podría actuar de manera sinérgica inhibiendo la activación linfocitaria y preservando/aumentando linfocitos Treg circulantes, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y el desarrollo de la EICHc.



# **OBJETIVOS**



### 3 Objetivos

1. Evaluar la eficacia y seguridad de ruxolitinib como tratamiento de la EICH en un estudio retrospectivo.
  - a. Analizar las características clínicas y/o biológicas que pudieran predecir respuestas al tratamiento.
  
2. Evaluar la sinergia entre ruxolitinib y linfocitos Treg en un modelo *in vitro*.
  - a. Evaluar el efecto del ruxolitinib sobre la cantidad y fenotipo de los linfocitos Treg en cultivos *in vitro*.
  - b. Evaluar el efecto sobre la capacidad reguladora en ensayos de supresión *in vitro*.
  
3. Evaluar la capacidad terapéutica de la combinación de ruxolitinib y linfocitos Treg en comparación con cada uno de los dos tratamientos por separado en un modelo murino de enfermedad injerto contra huésped.
  
4. Evaluar la sinergia entre ruxolitinib y linfocitos Treg dentro del ensayo clínico Horizonte 2020 TREGeneration.
  - a. Evaluar la seguridad, toxicidad y dosis máxima tolerada (DMT) de Tregs en pacientes con enfermedad injerto contra huésped crónica (EICHc) refractaria a corticoides que no han obtenido remisión completa con ruxolitinib.
  - b. Evaluar el impacto en la supervivencia y el efecto injerto contra leucemia.
  - c. Evaluar la factibilidad de la infusión de linfocitos Tregs seleccionados.
  - d. Evaluar la respuesta de la EICH al tratamiento combinado con ruxolitinib y linfocitos Tregs.
  - e. Evaluar la tasa de infecciones graves de los pacientes tratados con linfocitos Tregs en combinación con ruxolitinib.
  - f. Evaluar el impacto en la respuesta inmune del tratamiento combinado con ruxolitinib y linfocitos Tregs.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4 Material y métodos**

### **4.1 Muestras biológicas**

#### **4.1.1 Muestras celulares para cultivo**

Los estudios *in vitro* se realizaron mediante concentrados leuco-plaquetarios (*Buffy-Coat*), procedentes de hemodonaciones de donantes sanos humanos. Dichas muestras se obtuvieron previa firma del correspondiente consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y el procesamiento de las mismas siguieron las normas establecidas por el Comité de Ética de la Investigación de los Hospital Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla.

Tras la obtención, el procesamiento se realizó bajo condiciones asépticas en el Laboratorio del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

#### **4.1.2 Muestras de origen animal**

Los experimentos de origen animal se realizaron de acuerdo al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla.

Para los experimentos del modelo murino se utilizaron las cepas de ratón BALB/c (H2<sup>d</sup>) y C57Bl/6 (H2<sup>b</sup>), obtenidas del Charles River Laboratories (Morrisville, NC); y la cepa GFP C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J (H-2b), producida en el Animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

#### **4.1.3 Muestras de origen humano**

El ensayo clínico se llevó a cabo en pacientes reales afectos de enfermedad injerto contra huésped crónica en respuesta parcial al tratamiento con ruxolitinib. Tras realizar la infusión de células Treg, se obtuvieron muestras de seguimiento mediante punción endovenosa. Dicho procedimiento se realizó previa firma del correspondiente consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y el procesamiento de las mismas siguieron las normas establecidas por el Comité de Ética de la Investigación

de los Hospital Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla para los fines definidos en el protocolo clínico.

En el caso de los donantes, recibieron información detallada en sus respectivos centros de procedencia y se les informó del carácter investigacional del estudio. En todos los casos firmaron los respectivos consentimientos informados y de muestras sanguíneas vigentes en sus países de origen.

## **4.2 Equipos y consumibles**

### **4.2.1 Citómetro**

Para los experimentos preclínicos y el ensayo clínico, se utilizó el citómetro BD FACSCanto II, del fabricante BD Biosciences. Dispone de un láser azul Coherent® Sapphire™ de estado sólido refrigerado por aire (488 nm y 20 mW de potencia), que permite detectar cuatro colores. Un láser rojo JDS Uniphase™ HeNe (633 nm y 17 mW), para dos colores. Y un láser violeta (405 nm y 30 mW). El número total de detectores es de 8 (6 detectores de fluorescencias y dos de parámetros morfológicos) y presenta velocidades de adquisición de hasta 10.000 eventos/segundo.

### **4.2.2 Software de análisis de citometría**

Para los experimentos con cultivos celulares, ensayo de supresión y modelo murino se empleó el software FlowJo v.X, para análisis de los datos obtenidos con *BD FACSCanto II*.

El software empleado para adquirir muestras humanas del ensayo clínico y su análisis fue FACSDiva™. Dicho software se ejecutó en sistema operativo Microsoft™ Windows™ 10 de 64 bits.

### **4.2.3 Reactivos**

#### **4.2.3.1 Reactivos empleados en los cultivos celulares**

Gibco™ RPMI-1640 (1187510, Gibco): Medio-1640 del Roswell Park Memorial Institute. Medio de cultivo adecuado para múltiples líneas celulares de mamíferos. En su

formulación contiene el agente reductor glutatión, biotina, vitamina B12 y PABA. No contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento por lo que requiere ser suplementado, habitualmente con suero bovino fetal al 10% (FBS) o suero AB humano al 10%. Contiene un sistema tampón de bicarbonato de sodio (2,0 g/L), precisando un entorno de CO<sub>2</sub> del 5 al 10% para mantener el pH fisiológico.

Gibco™ Suero Bovino Fetal (10270-106, Gibco): Se suministra con un certificado de análisis que detalla los resultados de control de calidad. Empleado para suplementar medios celulares o criopreservación celular.

Gibco™ Penicilina-Estreptomicina (15140-122, Gibco): Utilizado para la prevención de la contaminación bacteriana de los cultivos celulares. Presenta acción combinada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Gibco™ GlutaMAX™ (35050-038, Gibco): suplemento utilizado para el medio de cultivo, alternativa a la L-glutamina. Su acción consiste en minimizar la acumulación de amoníaco tóxico y mejorar la viabilidad y el crecimiento celular; además puede permanecer estable en un amplio intervalo de temperaturas.

Anti CD3 humano de ratón (555336, BD Pharmingen™): Reacciona con la cadena  $\epsilon$  humana, una subunidad de 20 kDa del complejo receptor de antígeno de células CD3/T. El CD3 juega un papel en la transducción de señales durante el reconocimiento de antígenos.

Anti CD28 humano de ratón (555725, BD Pharmingen™): El anticuerpo monoclonal CD28.2 se une específicamente a CD28, una glicoproteína transmembrana homodimérica de 44 kDa presente en la mayoría de las células T maduras, timocitos y células plasmáticas. El CD28 es un receptor coestimulador que juega un papel importante en interacciones de células T-células B.

Ruxolitinib (INCB018424): El ruxolitinib fue cedido por Novartis y almacenado en una solución de DMSO a 10 mg/ml y conservado a -20°C.

DMSO (D5879-1L, Aldrich): Dimetilsulfóxido >99,5% de pureza. Disolvente aprótico y altamente polar, empleado para la criopreservación celular y de reactivos.

Anticuerpos de citometría: Los anticuerpos de citometría empleados en este apartado se listan en la tabla 4.1.

<b>Anticuerpos humanos</b>	Laboratorio	Referencia
<b>Superficie</b>		
CD4-PerCP Cy5.5	BD	332772
CD8 PE-Cy7	BD	557746
CD8-APC-H7	BD	560179
CD25-FITC	BD	345796
CD25-PE	BD	341011
CD25-CF-BLUE	Immunostep	25CFB-100T
CD127-PE	BD	557938
CD39-BV510	Biolegend	328219
CTLA4-PE-Cy7	Biolegend	349914
CCR5-APC-H7	Biolegend	359110
CCR9-BV421	Biolegend	358913
CXCR3-PE-Cy7	Biolegend	353719
PD1-BV421	Biolegend	329920
<b>Intracelular</b>		
FOXP3-APC	Invitrogen	17-4776-42
FOXP3-PE	Invitrogen	12-4776-42
IL-10-PE	BD	554706
p-STAT3-Alexa Fluor® 647	BD	557815
p-STAT5-Alexa Fluor® 647	BD	612599
HELIOS-FITC	Biolegend	137214

**Tabla 4.1.** Listado de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría en los cultivos celulares.

#### 4.2.3.2 Reactivos empleados en el ensayo de supresión

Anti CD3 humano de ratón (555336, BD Pharmingen™): Reacciona con la cadena  $\epsilon$  humana, una subunidad de 20 kDa del complejo receptor de antígeno de células CD3/T.

Anti CD28 humano de ratón (555725, BD Pharmingen™): El anticuerpo monoclonal CD28.2 se une específicamente a CD28, una glicoproteína transmembrana homodimérica de 44 kDa presente en la mayoría de las células T maduras, timocitos y células plasmáticas.

Anticuerpos de citometría: Los anticuerpos de citometría empleados en este apartado se listan en la tabla 4.2.

<b>Anticuerpos humanos</b>	Laboratorio	Referencia
<b>Superficie</b>		
CD4-PerCP Cy5.5	BD	332772
CD8 PE-Cy7	BD	557746
CD8-APC-H7	BD	560179
CD25-FITC	BD	345796
CD25-PE	BD	341011
CD25-CF-BLUE	Immunostep	25CFB-100T
CD127-PE	BD	557938
CD39-BV510	Biolegend	328219
CTLA4-PE-Cy7	Biolegend	349914
CCR5-APC-H7	Biolegend	359110
CCR9-BV421	Biolegend	358913
CXCR3-PE-Cy7	Biolegend	353719
PD1-BV421	Biolegend	329920
<b>Intracelular</b>		
FOXP3-APC	Invitrogen	17-4776-42
FoxP3-PE	Invitrogen	12-4776-42
IL-10-PE	BD	554706
p-STAT3-Alexa Fluor® 647	BD	557815
p-STAT5-Alexa Fluor® 647	BD	612599
HELIOS-FITC	Biolegend	137214

**Tabla 4.2.** Listado de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría en el ensayo de supresión.

CFSE (C34554, Invitrogen): Éster succinimidil de carboxifluoresceína, se utilizó para la tinción de células y medición de la proliferación celular. Esta molécula atraviesa con facilidad las membranas celulares, formando en el interior celular complejos covalentes con grupos amino de las proteínas u otras moléculas. Una vez establecidos estos complejos, la fluorescencia en la célula se mantiene a lo largo del tiempo permitiendo determinar de forma cuantitativa la proliferación celular, de forma que tras cada división celular, la fluorescencia emitida por las células hijas es aproximadamente la mitad de la que poseía la célula original.

#### 4.2.3.3 Reactivos empleados en el modelo murino

Anticuerpos de citometría: Los anticuerpos de citometría empleados en el modelo murino se listan en la tabla 4.3.

Anticuerpos murinos	Laboratorio	Referencia
<b>Superficie</b>		
CD4-APC	BD	553051
CD4-BV421	BD	562891
CD8-PE	Immunostep	MO8APE(V100)
CD19-BV425	Biolegend	115549
CD25-PE-Cy7	BD	552880
CD25-PE	Biolegend	102008
CD45-BV510	BD	533106
CD3-PerCP-Cy5.5	BD	553067
<b>Intracelular</b>		
FoxP3-APC	Invitrogen	17-5773-82

**Tabla 4.3.** Listado de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría en el modelo murino.

Colagenasa Tipo IV 0,25 mg/ml (Gibco 17104-019): Escinde el vínculo entre un aminoácido neutro (X) y la glicina en la secuencia Pro-X-Glic-Pro, que se encuentra con alta frecuencia en el colágeno.

Dispasa 1.5 mg/ml (GIBCO 17105-041): La dispasa II tiene una leve acción proteolítica que resulta útil para el aislamiento y el pase rutinario de células primarias. Se disocia bien con temperatura y pH fisiológicos y en general preserva la integridad de la membrana celular.

DNasa I 5µg/ml (Roche, 10104159001): La DNasa I es una endonucleasa específica de doble hebra que degrada el ADN. La adición de DNasa produce la degradación del ADN extracelular, evitando así la pérdida de células por formación de aglomeraciones celulares no deseadas.

HEPES 0.05 (M15630-080, Gibco): Utilizado para ajustar el pH y los niveles de fosfato.

Luciferina 0.1 M (556888, Biosciences): es una fórmula sintética sustrato que puede ser catalizado por luciferasa. Se empleó en el modelo murino.

PEG (Polietilenglicol) (202398-250G, Aldrich): el polietilenglicol es un polímero sintético empleado para la administración oral del ruxolitinib.

Ruxolitinib: La solución oral de ruxolitinib se preparó a concentración 6 mg/ml en PEG 3000: dextrosa al 5% en proporción 1:3. Se administró por sonda oral a dosis de 30 mg/kg/día en el modelo murino.

#### **4.2.3.4 Reactivos empleados en el ensayo clínico**

Albutein<sup>®</sup> 20% (Grifols): Solución para perfusión intravenosa formulado con albúmina humana que contiene proteínas obtenidas a partir de plasma humano. Cada vial contiene una solución con 200 g de plasmaproteínas/l, de las cuales al menos un 95% es albúmina humana. Este medicamento pertenece al grupo de medicamentos llamado sustitutos de plasma y fracciones proteicas plasmáticas. Se empleó en los procesos de selección celular.

Anticuerpos de citometría: Los anticuerpos de citometría empleados en el ensayo clínico se listan en la tabla 4.4.

<b>Anticuerpos humanos</b>	Laboratorio	Referencia
<b>Superficie</b>		
CD3-APC	BD	345767
CD3-APC-H7	BD	641415
CD3-PErcP-Cy5,5	BD	332771
CD3-V450	BD	558117
CD4-PErcP-Cy5,5	Invitrogen	45-0049-42
CD4-APC	BD	345771
CD4-V450	BD	560345
CD8-FITC	Cytognos	CYT-8F8
CD8-PEcy7	BD	335822
CD14-APC-H7	BD	641394
CD16-V450	BD	644489
CD19-PEcy7	Cytognos	CYT-19C4
CD20-V450	Bio Legend	302320
CD21-V450	EXBIC	PB-306-T100
CD25-FITC	BD	345796
CD25-APC	Macs Miltenyi Biotec	130-113-280
CD27-FITC	BD	340424
CD31-APC-H7	Invitrogen	47-0319-42
CD45-FITC	BD	345808
CD45-PErcP-Cy5,5	BD	322784
CD45-PO	BD	653806
CD45OC515-V500	Cytognos	CYT-45OC
CD45RA-V450	Invitrogen	MHCD45RA28
CD56-PE	BD	345810
CD62L-PEcy7	Bio Legend	304822
CD127-PE	BD	557938
HLADR-APC	BD	347403
TCR gamma delta-PE cy 7	BD	655410
CCR7 (CD197)-PE cy 7	Bio Legend	353226
Viability Dye	Thermo Fisher	65-0866
<b>Intracelular</b>		
Ki67-PE	Invitrogen	12-5698-82
FoxP3-APC	Invitrogen	17-4776-42
FoxP3-PE	Invitrogen	12-4776-42

**Tabla 4.4.** Listado de anticuerpos utilizados para los estudios de citometría en el ensayo clínico.

CliniMACS CD8 Reagent (275-01): cada vial consiste en anticuerpos monoclonales murinos anti-CD8 conjugados con partículas magnéticas de hierro dextrano. El vial contiene 7,5 ml de solución estéril apirógena.

CliniMACS CD19 Reagent (179-01): cada vial consta de anticuerpos monoclonales murinos anti-CD19 conjugados con partículas magnéticas de hierro dextrano. Cada vial contiene 7,5 ml de solución apirógena.

CliniMACS CD25 Reagent (274-01): cada vial consiste en anticuerpos monoclonales murinos anti-CD25 conjugados con partículas magnéticas de hierro dextrano. Un vial contiene 7,5 ml de solución estéril apirógena.

CliniMACS<sup>®</sup> PBS/EDTA Buffer (200-070-025, Miltenyi): solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2, suplementada con EDTA 1 mM. El tampón se suministra en bolsas de plástico de 1 L como una solución estéril apirógena y se utiliza en cada proceso de selección celular.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol. Marcador del núcleo celular mediante unión al ADN.

Fix/Perm Buffer and Permeabilization Buffer. (00-5523-00, eBiosciences): es una formulación optimizada para la tinción de factores de transcripción y proteínas nucleares (por ejemplo, FoxP3 y Ki-67), citoquinas y quimiocinas.

Gammaglobulina humana pasteurizada IgG 1,5 mg/ml (Grifols<sup>®</sup>): se empleó en los procesos de selección celular, para evitar la unión de los anticuerpos monoclonales a sitios de unión inespecíficos.

Lysis Buffer. (349202, BD): solución diseñada para la lisis de eritrocitos en muestras para citometría de flujo. Se utiliza tras la adición de los anticuerpos monoclonales.

PBS (sc-362299, Santa Cruz): Phosphate Buffered Saline. Es una solución tampón concentrada que se suele emplear diluida. Sirve para mantener un pH constante y, dado que es isotónica y no tóxica para las células, se puede utilizar en una amplia variedad de aplicaciones biológicas. Se utiliza con frecuencia como tampón de lavado y dilución en los procedimientos de citometría de flujo.

Viability Dye (65-0866-14, Thermo Fisher): es un tinte irreversible que marca viabilidad y que suele utilizarse previo a procedimientos de criopreservación, fijación o permeabilización. A diferencia de 7-AAD y del yoduro de propidio, las células marcadas pueden lavarse, fijarse, permeabilizarse o teñirse con antígenos intracelulares sin perder la intensidad de la tinción. Por lo tanto, permite la exclusión de las células no viables en análisis con marcadores intracelulares.

#### **4.2.4 Cell sorter**

Se empleó el sorter FACS Aria™ Fusion de BD para sortear las células en el ensayo clínico, que posteriormente fueron enviadas a centro internacional para su análisis. Dichas muestras fueron procesadas en el Instituto Max Planck de Genética Molecular, Berlín (Alemania).

#### **4.2.5 Animalario**

Los experimentos de origen murino se llevaron a cabo con las cepas de ratón BALB/c (H2<sup>d</sup>) y C57Bl/6 (H2<sup>b</sup>), y la cepa GFP C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J (H-2b). Todas las cepas se tutelaron en el Animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla.

#### **4.2.6 Equipos de imagen *in vivo***

Se empleó el sistema IVIS Lumina III para los experimentos murinos. El sistema está equipado con hasta 26 conjuntos de filtros que se pueden utilizar para captar imágenes que emiten desde el verde hasta el infrarrojo cercano. Permite obtener imágenes tanto fluorescentes como bioluminiscentes.

#### **4.2.7 AutoMACS Pro Separator (Miltenyi)**

Para el aislamiento de las células Treg en los modelos *in vitro* y murino se empleó el AutoMACS Pro Separator (Miltenyi). Es un separador celular automatizado que permite

obtener tanto las células marcadas como las células no marcadas, que fueron utilizadas posteriormente para todos los experimentos preclínicos.

#### **4.2.8 CliniMACs Plus (Miltenyi Biotec)**

Para la selección de las células T reguladoras se utilizó el equipo CliniMACs Plus de Miltenyi (Miltenyi Biotec) y su correspondiente kit de selección celular CliniMACS® Tubing Sets. Permite automatizar los procesos de separación celular a escala clínica de las células diana o su fracción negativa a partir de la sangre periférica o los productos de leucoaféresis en un sistema cerrado y estéril. El kit consta de un juego de tubos de un solo uso con una columna de separación magnética integrada que permite separar las células objetivo de las células no deseadas y recolectar las fracciones en diferentes bolsas. El procedimiento de selección de células Treg se basó en un procedimiento de 2 etapas: depleción seguido de enriquecimiento celular.

### **4.3 Procedimientos**

#### **4.3.1 Modelo preclínico**

##### **4.3.1.1 Modelo in vitro**

###### 4.3.1.1.1 Cultivos celulares

###### 4.3.1.1.1.1 Justificación

Evaluar el efecto del ruxolitinib sobre la cantidad y fenotipo de los linfocitos Treg en cultivos *in vitro*.

###### 4.3.1.1.1.2 Desarrollo

Las células mononucleadas (CMN) de origen humano se obtuvieron mediante centrifugación de concentrados leucoplaquetarios de donantes sanos sobre un lecho de ficoll (Lymphocyte isolation solution, Laboratorios Rafer). Las células se centrifugaron durante 25 min a 800 g. Las CMN se aislaron de la interfase entre el ficoll, en la parte inferior del tubo; y el suero, en la parte superior. Las CMN se lavaron con PBS y posteriormente se cultivaron a una densidad de  $10^6$  células/ml en placas de 48 pocillos. Se empleó RPMI-1640 suplementado con suero AB humano al 10%, penicilina, estreptomicina y glutamax. Para la activación celular, se utilizó anti CD3 humano unido a placa (0,5  $\mu$ g/ml) y anti CD28 humano soluble (BD) (0,25  $\mu$ g/ml). Las células se

incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%. NOVARTIS proporcionó el reactivo ruxolitinib (INCB018424), almacenado en una solución de DMSO a 10 mg/ml y conservado a -20°C. Las células se incubaron con dosis crecientes de ruxolitinib a 0,1; 0,3 o 1 µM y se analizaron por citometría a los 2, 5 y 8 días tras la activación.

#### 4.3.1.1.2 Ensayo de supresión

##### 4.3.1.1.2.1 Justificación

Evaluar el efecto del ruxolitinib sobre la capacidad reguladora de los linfocitos Treg en ensayos de supresión *in vitro*.

##### 4.3.1.1.2.2 Desarrollo

Para el ensayo de supresión, se procedió al aislamiento de células Treg de origen humano utilizando el kit de aislamiento de células T reguladoras II CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim</sup> /-, humano (Miltenyi) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se llevó a cabo con el separador magnético AutoMACS (Miltenyi). Las células mononucleadas de origen humano se tiñeron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen). Brevemente, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 1ml de PBS a una concentración de 10-100x10<sup>6</sup> cel./ml. Se añadió CFSE a una concentración final de 5µM y se incubó en oscuridad durante 5 minutos. Las células se lavaron con 5 volúmenes de medio con suero dos veces, y se sembraron a dosis de 5x10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 96 pocillos. Para la activación celular, se empleó anti CD3 y anti CD28 humano. Inmediatamente se añadieron células Treg en proporciones decrecientes, en presencia o ausencia de ruxolitinib. La proliferación se midió después de 5 días mediante citometría de flujo como dilución de la tinción CFSE.

El porcentaje de supresión se calculó como:

$$[1 - (\% \text{ de proliferación en la muestra } / \% \text{ de proliferación en el control})] \times 100\%.$$

#### 4.3.1.2 Modelo murino

##### 4.3.1.2.1 Justificación

Evaluar la capacidad terapéutica de la combinación de ruxolitinib y linfocitos Treg en comparación con los tratamientos simples en un modelo murino de enfermedad injerto contra huésped.

#### 4.3.1.2.2 Desarrollo

Para el modelo murino de EICH se emplearon ratones receptores de la cepa BALB/c de 8-12 semanas de edad. Se irradiaron con 800-860 cGy fraccionado en dos dosis con una separación de 4 horas en el día 0 del trasplante. Posteriormente se realizó el trasplante con la cepa donante C57Bl/6. En total, la cepa receptora recibió  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $2 \times 10^6$  esplenocitos, a excepción de un grupo que se destinó a control y que se trasplantó con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea, sin esplenocitos. Los esplenocitos fueron cultivados durante 2 horas previamente a la infusión para deplecionar la muestra de monocitos mediante su adhesión al sustrato de la placa de cultivo. Tras la realización del trasplante, los ratones experimentaron una primera fase de EICH aguda con un porcentaje moderado de mortalidad, y después de un breve periodo de recuperación, aquellos ratones que no fallecieron presentaron una segunda fase de EICH crónica. El día 28 postrasplante se llevó a cabo la aleatorización en la cual los especímenes fueron asignados a cuatro grupos de tratamiento, recibiendo: A)  $3 \times 10^5$  Treg aislados de ratones transgénicos GFP isogénicos del donante (C57Bl/6-Tg (ACTB-EGFP) 1OsB/J), B) Ruxolitinib 30 mg/kg/día por sonda oral, durante 5 a la semana, C)  $3 \times 10^5$  Treg más ruxolitinib 30 mg/kg/día en la misma pauta descrita, y D) vehículo de la infusión de ruxolitinib.

La solución oral de ruxolitinib se preparó a concentración 6 mg/ml en PEG 3000: dextrosa al 5% en proporción 1:3. Se administró por sonda oral.

El aislamiento de las células Treg se llevó a cabo a partir de ratones de la cepa C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)1OsB/J usando el kit de aislamiento de células T reguladoras CD4+ CD25+ para ratón (Miltenyi) y el separador magnético AutoMACS.

Tras el periodo de tratamiento, los ratones que no fallecieron fueron sacrificados en la semana 16 postrasplante y se procedió a la extracción y fijación en parafina de los órganos de interés: hígado, bazo, piel, intestino delgado, colon, pulmón y riñones para su posterior examen histopatológico. También se extrajeron células de sangre periférica, médula ósea, bazo, timo, placas de Peyer, intestino grueso e intestino delgado para análisis de citometría.

La puntuación de EICH aguda en el modelo murino se realizó siguiendo la escala de Cooke, K. R. y col.<sup>85</sup>, como se muestra en la tabla 4.5.

<b>Criterio</b>	<b>Grado 0</b>	<b>Grado 1</b>	<b>Grado 2</b>
Pérdida de peso	<10%	10% a 25%	>25%
Postura	Normal	Encorvado en reposo	Encorvamiento severo, afecta al movimiento
Actividad	Normal	Ligera a moderadamente reducido	Estático salvo estimulación eterna
Pelaje	Normal	Ligeramente erizado	Erizamiento severo, limpieza pobre
Piel	Normal	Descamaciones en cola y patas	Denudaciones obvias

**Tabla 4.5.** Puntuación clínica de EICH aguda en el modelo murino.

La puntuación de EICH crónica en el modelo murino se siguió a través de una escala adaptada de Anderson, B. E. y col.<sup>86</sup> y se midió a través de los siguientes ítems:

- Daño cutáneo con pérdida de pelo, menos de 1 cm<sup>2</sup> = 1, entre 1 y 2,5 cm<sup>2</sup> = 2, más de 2,5 cm<sup>2</sup> = 3.
- Escamas en la cola = 0,2
- Daño en las orejas = 0,3
- Lesiones oculares = 0,5

En el modelo de ratón para comprobar el efecto injerto contra leucemia se irradiaron ratones BALB/c de 8-12 semanas de edad con 800 cGy divididos en dos dosis separadas por 3 horas. A las 4 horas tras la irradiación, se procedió a realizar un trasplante con 5x10<sup>6</sup> células de médula ósea, 2x10<sup>6</sup> esplenocitos y 3x10<sup>5</sup> células Treg purificadas de donantes C57Bl/6, y/o 10<sup>6</sup> células leucémicas A20 transducidas con un vector de GFP-Luciferasa2, dependiendo del grupo de tratamiento. Se administró ruxolitinib (30 mg/kg/día) o vehículo de forma oral desde el día +1 hasta el final del experimento. La luminiscencia se midió los días +7 y +13 usando un sistema de adquisición de imágenes *in vivo* IVIS Lumina III (PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.), para lo que se inyectó de manera intraperitoneal 100 µl de una solución de Luciferina 0.1 M y se procedió a la medida de bioluminiscencia a los 10 minutos de la inyección.

#### 4.3.1.2.3 Análisis histopatológico

El sacrificio de los ratones se realizó mediante la administración de una dosis letal de Tiobarbital. Se extrajo sangre por punción cardíaca usando una jeringa heparinizada, y se recogió en un tubo de EDTA. Se extirparon los fémures y tibias, bazos, timos, riñones, placas de Peyer y fragmentos de pulmón, hígado, intestino grueso e intestino delgado. También se extrajeron muestras de piel.

Se fijaron en formalina los fragmentos de piel, riñones, pulmón, hígado, intestino grueso e intestino delgado, y posteriormente se fijaron en bloques de parafina para su posterior corte y análisis histológico.

#### 4.3.1.2.4 Citometría

Los bazos, timos y placas de Peyer se disgregaron mecánicamente utilizando el émbolo de una jeringa de 5 ml en un filtro de 40  $\mu\text{m}$  colocado sobre un tubo de 50 ml. Las células se recogieron añadiendo medio, y posteriormente se centrifugaron y se lavaron con PBS. La médula ósea se recogió haciendo pasar medio con una jeringa a través de los fémures y tibias. Las células se disgregaron haciéndolas pasar por un filtro de 40  $\mu\text{m}$ , y posteriormente se lavaron con PBS. Los fragmentos de intestino grueso e intestino delgado se lavaron con PBS y posteriormente fueron digeridos en una solución compuesta por RPMI+HEPES 0.05M, Dispasa 1.5 mg/ml (GIBCO 17105-041), Colagenasa Tipo IV 0,25 mg/ml (Gibco 17104-019), y DNAsa I 5 $\mu\text{g}$ /ml (Roche, 10104159001). Se incubó durante 1h a 37°C en agitación. Posteriormente el sobrenadante se filtró con un filtro de 40  $\mu\text{m}$  colocado sobre un tubo de 50 ml y se lavaron con PBS.

Las células de bazo, timo, médula ósea, placas de Peyer, intestino delgado e intestino grueso se procesaron y analizaron mediante citometría de flujo. Las muestras de sangre periférica se tiñeron y sometieron a un proceso de lisis para eliminar los eritrocitos: se resuspendieron en una solución de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM,  $\text{KHCO}_3$  10mM, EDTA 0,127 mM), se incubaron durante 15 min a 4°C, se centrifugaron y se lavaron con PBS.

Las células se recolectaron, centrifugaron y lavaron en PBS con FCS al 2%.

Para la tinción de moléculas de superficie, las células se incubaron con los correspondientes anticuerpos conjugados con fluorocromo durante 15 minutos a

temperatura ambiente y en oscuridad. Las células se lavaron con PBS con FCS al 2% y se procedió a la adquisición y análisis mediante el citómetro FACS Canto II.

Para la tinción intracelular con anticuerpos Anti FoxP3, anti Helios y Anti IL-10, se utilizó el kit de tinción FoxP3 (eBioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la tinción con anti IL-10, además, se trataron las células con 10 µg/ml de Brefeldin A (Sigma) durante 4 horas antes de la tinción para bloquear el tráfico intracelular y evitar la secreción de la citoquina. Para la tinción con anticuerpos anti-fosfo-Stat3 y anti-fosfo-Stat5, se estimularon las células con 100 ng/ml de IL-6 o IL-2 respectivamente durante 15 minutos antes de la tinción. Posteriormente se tiñeron usando el kit de activación de células T (BD) BD Phosflow™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se adquirieron en un citómetro BD FACS Canto II y se analizaron con el software FlowJo v.X.

### **4.3.2 Estudio retrospectivo ruxolitinib**

#### **4.3.2.1 Población de estudio**

La población seleccionada incluyó pacientes con EICH refractaria al menos a primera línea de tratamiento con corticoides que hubieran iniciado tratamiento con ruxolitinib por uso compasivo como tratamiento de la EICH aguda o crónica, tratados en los centros GETH participantes en el ensayo. Es de destacar que en el período de reclutamiento y análisis de nuestro estudio dicho tratamiento aún no había recibido aprobación por la FDA.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y recibió la aprobación de un Comité de Ética de Investigación Clínica independiente. Se obtuvo y firmó el consentimiento informado por escrito de cada paciente. Se preservó la confidencialidad de la recogida de datos siguiendo la normativa local (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal [LOPD]). Asimismo, se respetó la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

#### Crterios de inclusión

Se incluyeron en el análisis pacientes sometidos a alotrasplante de médula ósea, sangre periférica o cordón umbilical, de donante emparentado o no emparentado, con EICH

aguda o crónica refractaria a corticoides y que hubieran recibido tratamiento con ruxolitinib.

#### Criterios de exclusión

Dado el carácter retrospectivo y exploratorio del estudio, no se definieron variables o criterios de exclusión por edad, parámetros de laboratorio, tratamientos concomitantes actuales o previos ni otras patologías médicas.

#### **4.3.2.2 Diseño del estudio**

Diseñamos un estudio retrospectivo, descriptivo y multicéntrico que incluyó a 79 pacientes con EICH refractaria a corticoides entre octubre de 2015 y julio de 2017, a los que se les administró tratamiento con ruxolitinib mediante un programa de uso compasivo. Los datos fueron recopilados de un total de 13 centros españoles pertenecientes al Grupo Español de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular (GETH), e incluyó tanto pacientes adultos como pediátricos (definidos como aquellos con edad inferior a 14 años). El estudio no implicó cambio en la acción terapéutica ni pruebas adicionales. La recogida de los datos se realizó mediante revisión de historia clínica y se utilizó una base de datos electrónica diseñada específicamente para el estudio, que facilitó la comunicación y el intercambio de información entre los distintos centros mediante acceso con credenciales y claves asignadas por sistema informático. El tratamiento con ruxolitinib y el análisis de datos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, España.

#### **4.3.2.3 Administración del tratamiento**

En todos los casos la administración del ruxolitinib fue oral a criterio de cada investigador. La dosis habitual de inicio fue de 5 mg/12 h vía oral, pudiendo aumentarse a 10 mg/12 h.

#### **4.3.2.4 Bajada de inmunosupresión, duración del seguimiento y criterios de retirada del estudio**

Se analizó el aumento o descenso de la dosis del propio fármaco y del resto de tratamientos inmunosupresores concomitantes. Se valoró también como respuesta la

posibilidad de descenso del tratamiento inmunosupresor sin deterioro en la afectación o severidad de la EICH.

La duración del estudio fue de 1 año y 10 meses, desde octubre de 2015 hasta julio de 2017. Posteriormente los datos fueron recopilados, procesados y analizados mediante software estadístico.

Se contempló la retirada del estudio en los casos de muerte o progresión de la EICH. Se analizaron en todos los casos los motivos de muerte (por EICH, infecciones, progresión de la enfermedad de base u otras causas), así como la progresión de la EICH (aumento de inmunosupresión, aumento del *score* de EICH, entre otras).

#### **4.3.2.5 Evaluación de la respuesta al tratamiento**

La severidad de la EICH se evaluó según los criterios del Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea (IBMTR) en el caso de la EICHa<sup>87</sup> y según el consenso internacional del Instituto Nacional de la Salud (NIH) para la EICHc<sup>88</sup>. En nuestro estudio se evaluó a los pacientes por su mejor respuesta, definida como la mejor respuesta obtenida en cualquier momento desde el inicio del tratamiento con ruxolitinib.

En el caso de la EICH aguda, las respuestas fueron definidas como:

Remisión completa (RC): definida como la ausencia de síntomas relacionados con la EICHa.

Respuesta parcial (RP): definida como la mejora de al menos una categoría de la gravedad de la EICHa en un órgano sin deterioro o empeoramiento en ningún otro.

Fracaso del tratamiento: ausencia de mejoría de la EICH, deterioro de cualquier órgano, la aparición de nueva sintomatología asociada a la EICH o necesidad de iniciar un nuevo tratamiento para el control de la enfermedad, tanto tratamiento clásico como experimental.

En el caso de la EICH crónica, las respuestas fueron definidas como:

Remisión completa (RC): resolución de todas las manifestaciones relacionadas con la EICH crónica en un órgano específico.

Respuesta parcial (RP): mejora en la puntuación de un órgano desde el inicio del tratamiento sugiriendo beneficio clínico

Fracaso del tratamiento: cumplir con criterios de progresión definido consenso internacional del Instituto Nacional de la Salud (NIH) para EICHc<sup>14</sup>.

La interrupción de ruxolitinib debido a toxicidad no se consideró fracaso del tratamiento. La clasificación histológica de la EICH se realizó de acuerdo a un sistema de estadificación histológica publicado para la catalogación tanto de la EICHa como de la EICHc<sup>89</sup>.

#### **4.3.2.6 Toxicidades y eventos adversos**

Se analizó la aparición de toxicidad y eventos adversos durante el tratamiento con ruxolitinib. La clasificación de la toxicidad se realizó de acuerdo a los criterios CTCAE versión 5.0. (Common Terminology Criteria for Adverse Events). En el caso de aparición de toxicidad, se analizó la tanto la necesidad del uso de fármacos apropiados (antieméticos, antidiarreicos, etc.); como la acción implicada en el tratamiento con ruxolitinib (reducción de la dosis, suspensión temporal, suspensión definitiva u otras).

#### **4.3.2.7 Reactivación de infecciones**

Se evaluó la aparición o reactivación de infecciones, ya fueran fúngicas, bacterianas o virales.

### **4.3.3 Ensayo clínico Horizonte 2020 TREGeneration**

#### **4.3.3.1 Selección de pacientes y donantes**

Tras obtener el correspondiente consentimiento informado firmado por cada donante, se procedió a la realización de una aféresis de linfocitos con el sistema Spectra Optia. Se procesó un total de 3 volemias ajustado al peso de cada donante. En todo momento los donantes seleccionados recibieron la información adecuada y el carácter voluntario del estudio. Los donantes seleccionados fueron los donantes para trasplante que recibió el receptor, pudiendo ser donante familiar emparentado o donante no emparentado.

Los receptores fueron seleccionados en base a la presencia de los criterios de inclusión del ensayo clínico, y a la ausencia de los criterios de exclusión definidos en el momento del *screening*, que fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

Los pacientes deben cumplir los siguientes criterios en la visita de *screening* para ser incluidos en el estudio:

- Receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.
- Presentar EICHc refractaria a corticoides y haber obtenido una respuesta parcial tras al menos 4 semanas de tratamiento con ruxolitinib. La refractariedad a corticoides se define como la presencia de signos y síntomas de EICHc a pesar de prednisona  $\geq 0,25$  mg/kg/día (o 0,5 mg/kg a días alternos) durante al menos 4 semanas (o dosis equivalentes de glucocorticoides) sin alcanzar resolución completa de signos y síntomas.
- Dosis estable de corticoides durante las 4 semanas previas a la inclusión en el ensayo.
- No adición o retirada de otras medicaciones inmunosupresoras (como inhibidores de calcineurina, sirolimus, mofetil micofenolato) durante las 4 semanas previas a su inclusión en el ensayo. Las dosis de inmunosupresores deben estar ajustadas según los rangos terapéuticos de dichos fármacos.
- No existe edad límite para su inclusión. En caso de niños, el consentimiento informado será firmado por sus padres o tutor legal.
- ECOG 0-2.
- Los pacientes incluidos deberán tener una función orgánica adecuada como se define a continuación:
  - Hepática: adecuada función hepática (bilirrubina total  $<2,0$  mg/dl- permitida la excepción en pacientes con síndrome de Gilbert; AST (GOT)/ALT (GPT)  $\leq 2x$  valor superior de la normalidad), a no ser que la disfunción hepática sea una manifestación de EICHc. Para pacientes con hipertransaminasemia como única manifestación de EICHc, debe documentarse ésta mediante biopsia hepática antes de su inclusión. Casos de hipertransaminasemia en el contexto de EICHc activa que implique además otro/s

órgano/s estarían permitidos si el médico responsable documenta que esta alteración se corresponde con EICH hepática y no sería preciso una biopsia hepática.

· Renal: creatinina sérica menor del nivel superior de la normalidad o aclaramiento de creatinina  $> 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  para pacientes con niveles superiores a los rangos de laboratorio normales del centro.

· Función medular adecuada indicada por neutrófilos  $>1000/\text{mm}^3$  y plaquetas  $>50000/\text{mm}^3$  sin uso de factores de crecimiento o transfusiones.

- Las mujeres en edad fértil y los hombres deben aceptar el uso de métodos anticonceptivos adecuados (método anticonceptivo hormonal o de barrera, abstinencia) antes del ingreso al estudio y durante la participación en el estudio. Si una mujer queda embarazada o sospecha que está embarazada mientras participa en este estudio, debe informar de inmediato a su médico.

- Capacidad para comprender y la voluntad de firmar un documento de consentimiento informado por escrito.

#### Criterios de exclusión:

Los pacientes que presenten alguno de los siguientes criterios no serán incluidos en el ensayo clínico:

- Requerimiento de prednisona  $>1 \text{ mg/kg/día}$  (o equivalente).

- Uso concomitante de inhibidor de calcineurina y sirolimus (cualquiera de ellos por separado sería aceptable).

- Historia de microangiopatía trombótica, síndrome hemolítico urémico o púrpura trombótica trombocitopénica.

- Nueva medicación inmunosupresora en las 4 semanas previas.

- Fotoaféresis extracorpórea o rituximab en las 4 semanas previas.

- Administración postrasplante de medicación dirigida frente a linfocitos T o IL-2 (por ejemplo, ATG, alemtuzumab, basiliximab, denileukin difitox) en los 100 días previos.

- Infusión de linfocitos del donante en los 100 días previos.

- Recaída activa de enfermedad maligna.

- Infección activa no controlada.

- Receptor de trasplante de órgano sólido.

- Pacientes con infección VIH en terapia antirretroviral combinada no son elegibles por las interacciones farmacocinéticas potenciales con los agentes empleados postrasplante. Además, estos pacientes tienen un riesgo incrementado de infecciones letales.
- Pacientes con infección por hepatitis B o C activa no controlada no son elegibles porque tienen un riesgo incrementado de toxicidad hepática relacionada con el tratamiento postrasplante.
- Otros fármacos en investigación en las 4 semanas previas a la inclusión, a menos que sean aclaradas por el investigador principal.
- Las mujeres embarazadas son excluidas de este estudio.

#### **4.3.3.2 Diseño del estudio**

Se trata de un ensayo clínico de fase I que sigue un clásico diseño de 3+3 o de búsqueda de dosis. El diseño de dosis ha seguido el siguiente esquema: 3 pacientes se agrupan en un nivel de dosis dado. Si ningún paciente o solo uno experimenta una toxicidad, se produce una escalada de dosis. Si este es el nivel de dosis C, entonces esta dosis será la dosis máxima tolerada (DMT). Si dos o más pacientes en una cohorte experimentan DMT, entonces la DMT se considera excedida. Si este es el nivel de dosis A, no se procede a la escalada de dosis. Si este nivel de dosis es el B, el nivel de dosis A se considerará DMT. Si este es el nivel de dosis C, entonces el nivel de dosis B será la DMT. Se permite la inclusión de 10 pacientes adicionales que recibirán la DMT para evaluar toxicidad y eficacia (número máximo de pacientes 16, pudiendo ampliarse a 19).

En la búsqueda de dosis no se encontró toxicidad limitante de dosis, por lo que la dosis máxima tolerada correspondió al nivel C ( $2 \times 10^6$  células/kg receptor). Se incluyeron 3 pacientes tratados en el nivel A, 5 pacientes tratados en el nivel B, y 6 pacientes tratados en el nivel C).

#### 4.3.3.3 Método de selección, formulación e infusión de linfocitos Treg

Método de selección y purificación de los linfocitos Treg: Brevemente, tras la obtención de la leucoaféresis, se centrifugó dos veces con PBS/EDTA 5% a 300 g a temperatura ambiente eliminando el sobrenadante final, para llevarlo a un volumen final de 84,5 ml. Se añadieron 3 ml de IgG 1,5 mg/ml, incubando posteriormente 5-10 minutos a temperatura ambiente y con leve agitación. Se añadieron 7,5 ml de anticuerpos anti-CD8 y 7,5 ml de anti-CD19, incubando 30 minutos a temperatura ambiente con leve agitación. Tras la incubación se centrifugaron las células con PBS/EDTA 5% a 300 g a temperatura ambiente eliminando el sobrenadante final, y se llevó a un volumen de 100 ml. Se procedió a la etapa de depleción con el programa Depletion 2.1, y al recuento celular tras la finalización del procedimiento. La fracción deplecionada se sometió a la segunda etapa de enriquecimiento celular. Se centrifugaron las células con PBS/EDTA 5% a 300 g y 4 °C eliminando el sobrenadante final para llevarlo a un volumen final de 375 ml. Se añadieron 7,5 ml de anticuerpo anti-CD25 y se incubó a 4°C con leve agitación. Posteriormente se centrifugaron las células con PBS/EDTA 5% a 300 g y 4 °C retirando el sobrenadante final para llevarlo a un volumen final de 100 ml. Se procedió a la etapa de enriquecimiento con el programa Enrichment 1.1 o 3.2 en función de los recuentos de CD25+.

Dosis de Treg seleccionados: se establecieron 3 cohortes o niveles de dosis según el esquema que se muestra a continuación.

Nivel A:  $0,5 \times 10^6$  cel./kg receptor

Nivel B:  $1 \times 10^6$  cel./kg receptor

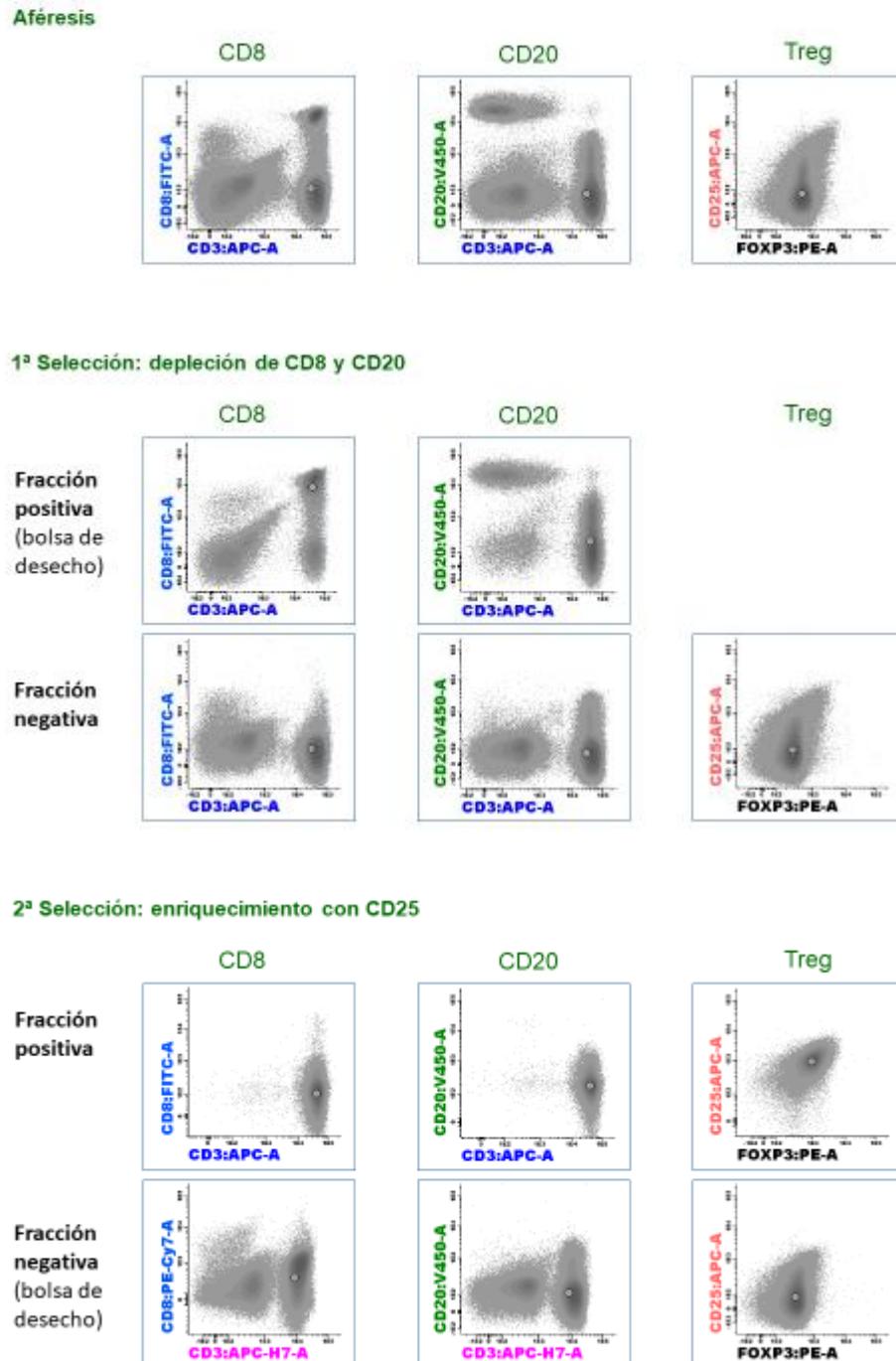
Nivel C:  $2 \times 10^6$  cel./kg receptor

#### Selección de poblaciones celulares:

La selección de poblaciones celulares para su posterior infusión se realizó mediante citometría de flujo, con el citómetro FACS Canto II y software específico.

La estrategia de selección de poblaciones para identificar las poblaciones en el producto enriquecido, se realizó como se esquematiza en la Figura 4.1.

## SELECCIÓN DE POBLACIONES Y CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO INFUNDIDO



**Figura 4.1.** Selección de poblaciones y características del producto infundido. Tras la obtención de la leucoaféresis, se realizó una depleción de CD8 y CD19 (identificado aquí como CD20+). La fracción deplecionada o fracción negativa se sometió a la segunda etapa de enriquecimiento celular de células CD25+. El producto enriquecido o fracción positiva fue el producto infundido, previa confirmación de los criterios de liberación.

Evaluación del producto celular: Del producto enriquecido se obtuvieron muestras para citometría, hemograma, viabilidad, investigación y se midió el volumen para determinar la fracción a infundir. De la fracción negativa se obtuvieron muestras para tinción de Gram, hemocultivos, hemograma y citometría. Se cuantificaron las células CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD25+, CD127+ y FoxP3+ tanto al inicio como al final del procedimiento.

Formulación: Una vez determinado el volumen con la dosis a infundir, los criterios de liberación incluyeron la presencia de:  $\geq 70\%$  de viabilidad celular, tinción de Gram/endotoxina negativa,  $\geq 70\%$  de células CD4+ CD25+ y  $\geq 50\%$  de células CD4+ CD25+ CD127-/low en el producto. Es de destacar que la dosis/kg objetivo de Treg seleccionados no fue un criterio de liberación. El producto se infundió incluso cuando la dosis celular/kg estuvo por debajo del objetivo, de acuerdo a lo especificado y consensuado en el protocolo. El producto se almacenó a 4°C hasta su uso.

Infusión de Treg: el producto celular obtenido tras CliniMACS no se administró hasta que se verificó el cumplimiento de los criterios de liberación establecidos en el ensayo. Cada producto se infundió al receptor a través de un catéter venoso central o periférico, durante ~5-10 minutos a través de dicho catéter. Se premedicó al paciente (paracetamol y antihistamínico iv) en todos los casos antes de la infusión. Posteriormente, los pacientes permanecieron bajo observación durante ~1 hora después del final de la infusión para vigilar la posible aparición de reacciones tras la infusión. El exceso de producto se criopreservó en todos los casos según procedimiento operativo estándar para uso futuro y análisis correlativos.

#### **4.3.3.4 Bajada de inmunosupresión, duración del seguimiento y criterios de retirada del estudio**

No se permitió la bajada de prednisona o ruxolitinib durante las 6 semanas iniciales del estudio, pero se valoró reducir posteriormente en los pacientes respondedores (después de la documentación de la respuesta según los criterios de NIH EICHc) a criterio del médico responsable.

Los pacientes incluidos en el ensayo fueron seguidos durante 1 año desde el inicio de

la terapia o hasta la muerte. Se siguió a los pacientes retirados del estudio por eventos adversos inaceptables hasta la resolución o estabilización del evento adverso. También se solicitó a los pacientes que permitieran un seguimiento a largo plazo con intención de búsqueda de toxicidades tardías.

Los motivos de retirada del estudio y la fecha en que se eliminó el paciente incluido en el ensayo fueron documentados. En caso de complicaciones inusuales o potencialmente mortales, se procedió a la notificación inmediata al investigador principal.

#### **4.3.3.5 Evaluación de la respuesta y seguimiento**

La evaluación de la respuesta se realizó de acuerdo a los formularios de evaluación de EICH según consenso NIH<sup>14</sup> (Figura 4.2). Las evaluaciones se realizaron al *screening* y en las semanas 1, 2, 4, 6, 8 y 12, y meses 6, 9 y 12 del estudio.

Es de destacar que la afectación oral y ocular no se han incluido *per se* en la determinación de la respuesta, ya que se permiten terapias tópicas para esos órganos.

Las respuestas se definieron como:

- Remisión completa: definida como la resolución de todas las manifestaciones reversibles relacionadas con la EICHc en un órgano específico. La respuesta global se ha considerado como la resolución de todas las manifestaciones reversibles en cada órgano o sitio de afectación.
- Respuesta parcial: existencia de al menos un 50% de mejora en la escala utilizada para medir las manifestaciones de la enfermedad relacionadas con la EICHc, con un mínimo del 25% de mejora en la escala completa. La respuesta global se definió como mejora en la medida de al menos un órgano o sitio, sin progresión en cualquier otro órgano. Además, el sello distintivo de la respuesta a la terapia para el síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) es la estabilización de la función pulmonar sin una disminución adicional del FEV1 durante un período de 3 meses.
- No respondedores (p. ej., respuesta menor, enfermedad estable): aquellos que no cumplan con los criterios de los NIH para respuesta parcial o progresión de la enfermedad.

- **Progresión:** se consideró como el aumento absoluto de al menos el 25% en la escala utilizada para medir las manifestaciones de la enfermedad relacionadas con la EICHc. Además, se tuvo en cuenta que el "empeoramiento clínico de la EICHc" no es sinónimo de EICHc progresiva según los criterios del NIH, ya que los participantes pueden experimentar un empeoramiento de los síntomas que no cumplen los criterios objetivos del NIH para la progresión.

FORM A		CHRONIC GVHD ACTIVITY ASSESSMENT- CLINICIAN								
CÓDIGO DEL ENSAYO: GVHD-TREGS		INVESTIGADOR PRINCIPAL: José Antonio Pérez Simón			CENTRO: Hospital Virgen del Rocio					
CÓDIGO DE PACIENTE:		VISITA:								
Current Patient Weight: _____		Today's Date: _____			MR#/Name: _____					
<b>Health Care Provider Global Ratings:</b> 0=none 1=mild 2=moderate 3=severe	Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms on the following scale, where 0 is cGVHD symptoms that are not at all severe and 10 is the most severe cGVHD symptoms possible: 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10						<b>Over the &lt;&lt;time&gt;&gt; would you say that this patient's cGVHD is</b> +3= Very much better +2= Moderately better +1= A little better 0= About the same -1=A little worse -2=Moderately worse -3=Very much worse			
	<b>cGVHD symptoms not at all severe possible</b>							<b>Most severe symptoms</b>		
<b>Mouth</b>		<b>Erythema</b>	None	0	Mild erythema or moderate erythema (<25%)	1	Moderate (≥25%) or Severe erythema (<25%)	2	Severe erythema (≥25%)	3
		<b>Lichenoid</b>	None	0	Lichen-like changes (<25%)	1	Lichen-like changes (25-50%)	2	Lichen-like changes (>50%)	3
		<b>Ulcers</b>	None	0			Ulcers involving (≤20%)	3	Severe ulcerations (>20%)	6
		<b>Total score for all mucosal changes</b>								
<b>Gastrointestinal-Esophageal</b>		0= no esophageal symptoms 1=Occasional dysphagia or odynophagia with solid food or pills during the past week 2=Intermittent dysphagia or odynophagia with solid foods or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3=Dysphagia or odynophagia for almost all oral intake, on almost every day of the past week								
<b>Gastrointestinal-Upper GI</b>		0= no symptoms 1=mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 2=moderate, intermittent symptoms, with some reduction in oral intake during the past week 3=more severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week								
<b>Gastrointestinal-Lower GI</b>		0= no loose or liquid stools during the past week 1= occasional loose or liquid stools, on some days during the past week 2=intermittent loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3=voluminous diarrhea on almost every day of the past week, requiring intervention to prevent or correct volume depletion								
<b>Lungs (Liters and % predicted)</b>		FEV1	FVC	Single Breath DLCO (adjusted for hemoglobin)			TLC	RV		
<b>Liver Values</b>		Total serum bilirubin	ULN	ALT	ULN	Alkaline Phosphatase	ULN	ULN		
<b>Baseline Values</b>		Total Distance Walked in 2 or 6 Mins: <input type="checkbox"/> 2 min <input type="checkbox"/> 6 min		Karnofsky or Lansky	Platelet Count	Total WBC	Eosinophils	%		
		Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify site/alternate cause): _____								
		Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify site/alternate cause): _____								
		Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify site/alternate cause): _____								

Figura 4.2. Formulario de evaluación de EICH crónica.

**CHRONIC GVHD ACTIVITY ASSESSMENT- CLINICIAN (FORM A)**

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
<b>SKIN</b> <i>GVHD features to be scored by BSA:</i> <b>Check all that apply:</b> Maculopapular rash / erythema Lichen planus-like features Sclerotic features Papulosquamous lesions or ichthyosis Keratosi pilaris-like	No BSA involved	1-18% BSA	19-50% BSA	>50% BSA
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				
<b>SKIN FEATURES SCORE:</b>	No sclerotic features		Superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)	<b>Check all that apply:</b> Deep sclerotic features "Hidebound" (unable to pinch) Impaired mobility Ulceration
If skin features score = 3, BSA % of non-moveable sclerosis/fasciitis _____				
How would you rate the severity of this patient's skin and/or joint tightening on the following scale, where 0 is not at all severe and 10 is the most severe symptoms possible:  0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Symptoms not at all severe Most severe symptoms possible				
<b>EYES</b>	No symptoms symptoms	Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), <b>WITHOUT</b> new vision impairment due to KCS	Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) <b>OR</b> unable to work because of ocular symptoms <b>OR</b> loss of vision due to KCS
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				
<b>LUNGS</b>	No symptoms	Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	Severe symptoms (shortness of breath at rest, requiring O <sub>2</sub> )
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				

**Figura 4.2. (Continuación).** Formulario de evaluación de EICH crónica.

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
<b>JOINTS AND FASCIA</b>	No symptoms	Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				

	1 (Worst)	2	3	4	5	6	7 (Normal)	
<b>Shoulder</b>								<input type="checkbox"/> Not done
	1 (Worst)	2	3	4	5	6	7 (Normal)	
<b>Elbow</b>								<input type="checkbox"/> Not done
	1 (Worst)	2	3	4	5	6	7 (Normal)	
<b>Wrist/finger</b>								<input type="checkbox"/> Not done
	1 (Worst)	2	3	4 (Normal)				
<b>Ankle</b>								<input type="checkbox"/> Not done

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): \_\_\_\_\_

**Figura 4.2. (Continuación).** Formulario de evaluación de EICH crónica.

Se realizó también un cuestionario sobre calidad de vida para determinar la mejoría o empeoramiento subjetivo con el tratamiento. Para ello se utilizó la Escala de Lee<sup>15</sup>. Dicha escala fue diseñada para evaluar la sintomatología relacionada con la EICHc. El cuestionario pregunta a los pacientes sobre el grado de molestia experimentado en 7 zonas potencialmente afectadas por la EICH: ojos, piel y mucosa oral, respiración, digestión, músculos y articulaciones, energía y estrés emocional (Figura 4.3).

**ESCALA DE PUNTUACIÓN DE LOS SINTOMAS DE LA EICH CRÓNICA**

**(Escala LEE)**

Nombre: \_\_\_\_\_

Visita: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

¿Alguna vez ha tenido alguno de los siguientes problemas en las últimas 2 semanas?

	Nada	Ligeramente	Moderadamente	Bastante	Extremadamente
<b>PIEL</b>					
a. Color de piel anormal	0	1	2	3	4
b. Erupciones	0	1	2	3	4
c. Piel engrosada	0	1	2	3	4
d. Llagas en la piel	0	1	2	3	4
e. Picor en la piel	0	1	2	3	4
<b>OJOS Y BOCA</b>					
f. Ojos secos	0	1	2	3	4
g. Necesita usar gotas para los ojos con frecuencia	0	1	2	3	4
h. Dificultad para ver claramente	0	1	2	3	4
i. Necesita evitar ciertos alimentos debido a dolor en la boca	0	1	2	3	4
j. Úlceras en la boca	0	1	2	3	4
k. Recibe nutrición por vía intravenosa o por sonda de alimentación	0	1	2	3	4
<b>RESPIRACIÓN</b>					
l. Tos frecuente	0	1	2	3	4
m. Esputo coloreado	0	1	2	3	4
n. Dificultad para respirar con el ejercicio	0	1	2	3	4
o. Dificultad para respirar en reposo	0	1	2	3	4
p. Necesita usar oxígeno	0	1	2	3	4

**Figura 4.3.** Escala de Lee o de puntuación de síntomas subjetivos para pacientes con EICHc.

**ESCALA DE PUNTUACIÓN DE LOS SINTOMAS DE LA EICH CRÓNICA**  
**(Escala LEE)**

	Nada	Ligeramente	Moderadamente	Bastante	Extremadamente
<b>COMER Y DIGESTION</b>					
q. Dificultad para tragar alimentos sólidos	0	1	2	3	4
r. Dificultad para tragar líquidos	0	1	2	3	4
s. Vómitos	0	1	2	3	4
t. Pérdida de peso	0	1	2	3	4
<b>MÚSCULOS Y ARTICULACIONES</b>					
u. Dolores articulares y musculares	0	1	2	3	4
v. Movilidad de las articulaciones limitada	0	1	2	3	4
w. Calambres musculares	0	1	2	3	4
x. Debilidad muscular	0	1	2	3	4
<b>ENERGÍA</b>					
y. Pérdida de energía	0	1	2	3	4
z. Necesita dormir más/ dormir siestas	0	1	2	3	4
Aa. Fiebre	0	1	2	3	4
<b>MENTAL Y EMOCIONAL</b>					
Bb. Depresión	0	1	2	3	4
Cc. Ansiedad	0	1	2	3	4
Dd. Dificultad para dormir	0	1	2	3	4

Firma del paciente

**Figura 4.3. (Continuación).** Escala de Lee o de puntuación de síntomas subjetivos para pacientes con EICHc.

#### 4.3.3.6 Toxicidades

En el caso de aparición de toxicidad, se permitió el uso de fármacos apropiados incluyendo antieméticos, antidiarreicos, etc., procurando un manejo sintomático. Todos los efectos secundarios experimentados por los participantes en el estudio fueron recogidos desde la infusión de linfocitos Treg hasta la visita final del estudio en el correspondiente cuaderno de recogida de datos. La clasificación de la toxicidad se realizó de acuerdo a los criterios CTCAE versión 5.0. Se valoró la posibilidad de que los pacientes que, tras finalización del estudio, continuaran presentando toxicidad relacionada o no con el tratamiento, fueran contactados para evaluaciones adicionales hasta resolución de la toxicidad.

#### 4.3.3.7 Estudios biológicos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica durante todo el ensayo para evaluar los efectos inmunológicos del tratamiento. Para ello se recogieron muestras en los siguientes puntos: 2 semanas previo a la infusión de Treg, en las semanas 1, 2, 4, 6, 8 y 12 y en los meses 6, 9 y 12. Se realizaron los siguientes estudios:

Análisis fenotípico de subpoblaciones de linfocitos: para identificar subpoblaciones de linfocitos fenotípicamente distintos. Se realizó el análisis mediante citometría de flujo. Para ello se crearon paneles de anticuerpos para distintas poblaciones celulares como Tregs CD4+, otras subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y células NK. El objetivo fue medir los cambios cuantitativos de las poblaciones celulares individuales que ocurren como resultado del tratamiento.

Citoquinas plasmáticas: se midieron los niveles de IL-2, IL-7 e IL-15 en muestras de plasma mediante ELISA. Dichas muestras fueron procesadas en el Instituto de Medicina Molecular, Lisboa (Portugal).

Ensayos funcionales: para evaluar la función de los Tregs que se expanden *in vivo* en respuesta al tratamiento. En estos experimentos, los Tregs se purificaron mediante *sorting* y se testó posteriormente su capacidad supresora sobre linfocitos T autólogos. Dichas muestras fueron procesadas en el Instituto Max Planck de Genética Molecular, Berlín (Alemania).

Análisis genómicos: Se realizó secuenciación de la cadena  $\beta$  del receptor TCR de los linfocitos T para analizar la diversidad clonal. Los linfocitos se seleccionaron mediante *sorter* y se congelaron para preservar la integridad celular. Dichas muestras fueron procesadas en el Instituto Max Planck de Genética Molecular, Berlín (Alemania).

#### 4.3.3.8 Citometría

Para el ensayo clínico, se llevó a cabo citometría y se analizaron distintos marcadores celulares en función de si se trató de la aféresis, de la muestra de producto celular enriquecido tras la selección de células Treg o si fue sangre periférica para monitorización *in vivo*.

En cuanto a la aféresis, el producto después de la depleción, o producto celular enriquecido, se sometió un marcaje de superficie para  $10^6$  células por cada tubo. Las células se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se añadieron 2 ml de Lysis Buffer por tubo y se volvió a incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un centrifugado y lavado con PBS, antes de resuspender y adquirir en el citómetro. Para el marcaje intracelular, también se recolectó un total de  $10^6$  células por cada tubo y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y centrifugado. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS, al cual se le añadió 1  $\mu$ l de *Viability Dye* y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron. Tras añadir 1 ml de *Fix/Perm Buffer* (preparado 1/4 en diluyente) se incubó a 4°C durante 35 minutos. Tras ello se lavó con 2 ml de *Permeabilization Buffer* y se centrifugó. Se resuspendió nuevamente en 100  $\mu$ l de *Permeabilization Buffer*, y se añadieron 20  $\mu$ l de anti-FoxP3-PE, tras lo cual se incubó durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se lavaron las células con 2 ml de *Permeabilization Buffer*, se procedió a centrifugado, resuspensión en PBS y adquisición en el citómetro. Los paneles empleados se muestran en la tabla 4.6.

	<b>Linfocitos</b>	<b>Treg+Linfocitos</b>	<b>Treg+FoxP3</b>
<b>FITC</b>	CD8	CD127	CD127
<b>PE</b>	CD56		FoxP3
<b>PercPCY5.5</b>	CD4	CD4	CD45
<b>PECy7</b>		CD8	
<b>APC</b>	CD3	CD25	CD25
<b>APCCy7</b>	CD14	CD3	CD4
<b>BV450</b>	CD20	CD20	CD3
<b>BV510</b>	CD45	CD45	CD45

**Tabla 4.6.** Paneles de citometría utilizados en la caracterización del producto celular.

En cuanto a la monitorización *in vivo* para seguimiento de los pacientes se empleó sangre periférica obtenida en un tubo de EDTA. Para los tubos de células T y NK y Linfocitos B se tomaron 150 µl de muestra, y se marcaron con sus respectivos anticuerpos monoclonales (Tabla 4.7.). Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual se añadieron 2 ml de *Lysis Buffer* y se incubó durante otros 10 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS. Tras centrifugar nuevamente, se añadieron 4 gotas de PBS para su adquisición en el citómetro.

Se realizó un tubo de contaje con bolas con 150 µl de muestra al que se añadieron los anticuerpos monoclonales. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se añadieron 2 µl de DAPI 5 minutos antes de finalizar los 20 minutos de incubación. Posteriormente se añadieron 2 ml de *Lysis Buffer* y se incubó 10 minutos, tras lo cual se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS. Se centrifugó nuevamente y se añadió 1 ml de PBS. Tras vortear bien la mezcla de bolas se añadieron 50 µl de bolas al tubo, para proceder a adquirir en el citómetro a pocos eventos/segundos y en velocidad de adquisición *low* (para evitar dobletes) y con *threshold* de 200 en FSC.

Para los tubos de Treg, caracterización de Treg y Treg/Tcon se añadieron 200 µl de muestra. Se añadieron los anticuerpos monoclonales, excepto anti-FoxP3 y anti-Ki67, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras lavar con PBS frío, se resuspendió en 1 ml de *Fix/Perm Buffer* (preparado 1/4 en Diluyente), y se incubó 35 minutos a 4°C. Se lavó con 2 ml de *Permeabilization Buffer* (preparado 1/10 en agua),

y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. Tras ellos, se resuspendió en 100 µl de *Permeabilization Buffer* y se añadieron los anticuerpos monoclonales anti-FoxP3 y anti-Ki67. Se incubó 30 minutos a 4°C, y se lavó con 2 ml de *Permeabilization Buffer*. Tras centrifugar 5 minutos a 2000 rpm, se añadieron 4 gotas de PBS y se procedió a su adquisición en el citómetro.

	Contaje	T y NK	Linfos B	Treg	Caracteriz. Treg	Treg/Tcon
<b>FITC</b>	CD45	CD8	CD27	CD25	CD25	CD25
<b>PE</b>	BOLAS	CD56		CD127	CD127	Ki67
<b>PercPCy5.5</b>	CD3	CD3		CD3	CD4	CD4
<b>PE-Cy7</b>	CD19	TCR	CD19		CCR7	CD62L
<b>APC</b>	CD4		HLADR	FoxP3	FoxP3	FoxP3
<b>APC-H7</b>	CD14					CD31
<b>V450</b>	DAPI	CD16	CD21	CD4	CD45RA	CD45RA
<b>V500</b>		CD45	CD45	CD45	CD45	CD45

**Tabla 4.7.** Paneles de citometría utilizados en la monitorización de los pacientes.

#### 4.3.3.9 Cell sorting

Para aislar las células Treg (pre-infusión, semana 2 y 12, y meses 6 y 12) se realizó un ficoll con 30 ml de muestra de sangre periférica y se recogió la capa de células mononucleadas. Se lavó con RPMI, y se resuspendió en 100-500 µl de PBS + SBF 1% (según el tamaño del pellet). Se añadieron los siguientes anticuerpos: CD25-FITC, CD127-PE, CD3-APC y CD4-BV450. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS. Tras ello se procedió al *sorting* mediante citómetro separador de las células. Una vez realizado, las muestras obtenidas se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 300 µl de *RNA Protect Cell Reagent*. Posteriormente se sumergió lentamente en nitrógeno líquido y se congeló a -80°C.

#### 4.4 Métodos estadísticos

Para los experimentos con cultivos celulares, ensayo de supresión y modelo murino se empleó el programa GraphPad PRISM 7.03. Los gráficos representan la media y el error estándar de la media (S.E.M). La comparación estadística se realizó utilizando la prueba T de Student, y la prueba ANOVA cuando fue apropiado. Para verificar la normalidad,

se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. Las curvas de supervivencia se representaron mediante el método de Kaplan Meyer y se utilizó la prueba Log-Rank para determinar las diferencias estadísticas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p < 0,05$ . Los valores  $p$  representados fueron: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Para el estudio retrospectivo los resultados se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS PASW 18. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  fue menor de 0,05. La supervivencia global (SG) se calculó en nuestro estudio a los 6 meses y al año con el programa Stata / IC 15.0. Dado que el objetivo del estudio fue meramente descriptivo y, por tanto, no existía hipótesis por confirmar, no fue necesaria la estimación muestral previa al estudio.

Para la mayoría de los análisis estadísticos del ensayo clínico en el proyecto Horizonte 2020 se usó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  fue menor de 0,05. Para los gráficos se empleó el programa GraphPad PRISM 7.03, donde se representan la media y el error estándar de la media (S.E.M). Para la comparación en la evolución de los subtipos celulares en el seguimiento de los pacientes tras la infusión de células Treg se empleó el test general de medidas repetidas. Para medir la características clínicas de la población evaluada se realizó un estudio descriptivo.

# **RESULTADOS**



## 5 Resultados

### 5.1 PARTE I: Estudio retrospectivo con ruxolitinib

Se analizaron un total de 79 pacientes, de los cuáles 72 eran adultos y 7 pediátricos. La mediana de edad fue de 51 años, con un rango de 0 a 73 años. Las características basales de la población incluida se muestran en la tabla 5.1.

Por patologías, la enfermedad de base más frecuente fue la leucemia mieloide aguda (38%), seguida del linfoma no Hodgkin (16,5%) y la leucemia linfoblástica aguda (15,2%).

Predominó ligeramente el régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (57%). La fuente predominante fue la sangre periférica (95%). Es de destacar que el 53% y el 55% de los pacientes con EICH aguda y crónica, respectivamente, habían recibido tres o más líneas o tratamiento previo.

Características basales	N(%)
Género	
Masculino	48 (60,8)
Femenino	31 (39,2)
Edad	
Mediana (rango)	51 (0-73)
Patología de base	
Leucemia mieloblástica aguda	30 (38)
Leucemia linfoblástica aguda	12 (15,2)
Síndrome mielodisplásico	11 (13,9)
Mieloma múltiple	3 (3,8)
Linfoma de Hodgkin	2 (2,5)
Linfoma no Hodgkin	13 (16,5)
Mielofibrosis	4 (5,1)
Otros	4 (5,1)

**Tabla 5.1.** Características basales de los pacientes incluidos en el estudio retrospectivo para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con ruxolitinib.

<b>Características basales</b>	<b>N(%)</b>
Estado de la enfermedad previo al trasplante	
Remisión completa	47 (59,5)
Respuesta parcial	13 (16,5)
Enfermedad estable	11 (13,9)
Otras	8 (10,1)
Tipo de trasplante	
Donante emparentado HLA idéntico	33 (41,7)
Haploidéntico	7 (8,8)
Donante no emparentado	39 (49,3)
Acondicionamiento	
Mieloablativo	34 (43)
Intensidad reducida	45 (57)
Fuente	
Sangre periférica	75 (95)
Médula ósea	2 (2,5)
Cordón umbilical	2 (2,5)

**Tabla 5.1 (Continuación).** Características basales de los pacientes incluidos en el estudio retrospectivo para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con ruxolitinib.

### 5.1.1 Eficacia del ruxolitinib en el tratamiento de la EICH aguda

Del total de la población analizada, 23 pacientes recibieron ruxolitinib como tratamiento para la EICH aguda refractaria. Todos los pacientes presentaban EICHa grados 2-4 y 20 pacientes (87%) presentaban grados 3-4. La mediana del número de líneas previas de tratamiento fue de 3 (rango 1-5). Las características de los pacientes con EICH aguda se muestran en la tabla 5.2.

<b>EICH aguda (n = 23)</b>	<b>N (%)</b>
Grados	
2-4	23 (100)
3-4	20 (87)
Órganos afectados	
Piel	16 (69,6)
Tracto digestivo	21 (95,5)
Hígado	13 (59,1)
Líneas previas de tratamiento	
1	4 (18,2)
2	7 (31,8)
3	6 (26,1)
>3	6 (27,2)

**Tabla 5.2.** Características de la población de pacientes con EICHa previo al uso de ruxolitinib.

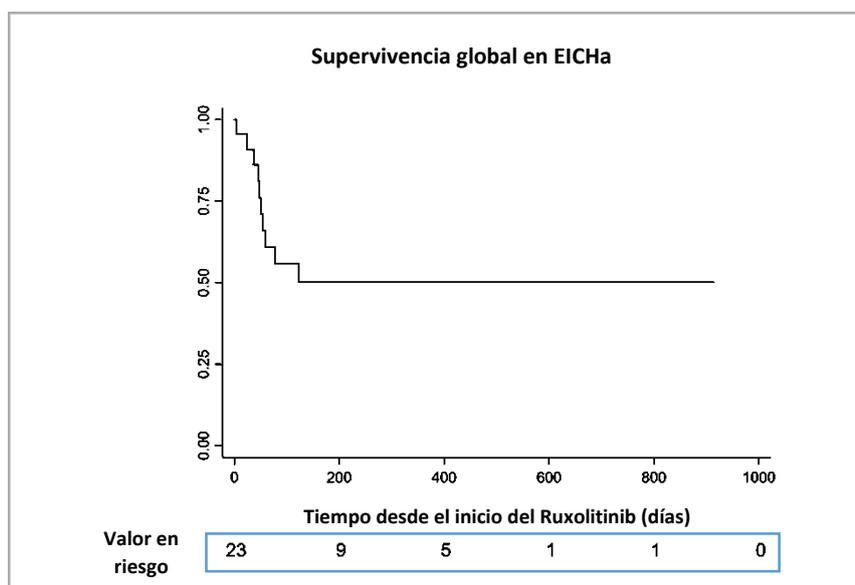
Cuando analizamos la tasa de respuestas tras inicio de tratamiento con ruxolitinib, encontramos una respuesta global del 69,5% (16/23) entre los pacientes que lo recibieron en contexto de EICHa, de lo cuáles el 21,7% (5/23) alcanzó remisión completa (tabla 5.3). La mediana de tiempo hasta observar respuesta desde el inicio del tratamiento fue de 2 semanas (rango: 0,5-4 semanas) y la dosis más empleada de ruxolitinib fue de 20 mg/día dividido en dos dosis.

En cuanto a órganos afectados no encontramos diferencias significativas, con unas tasas de respuestas completas que oscilaron en torno al 20%. Además, el tratamiento con ruxolitinib permitió reducir las dosis de corticoides en el 73,7% (17/23) de los pacientes.

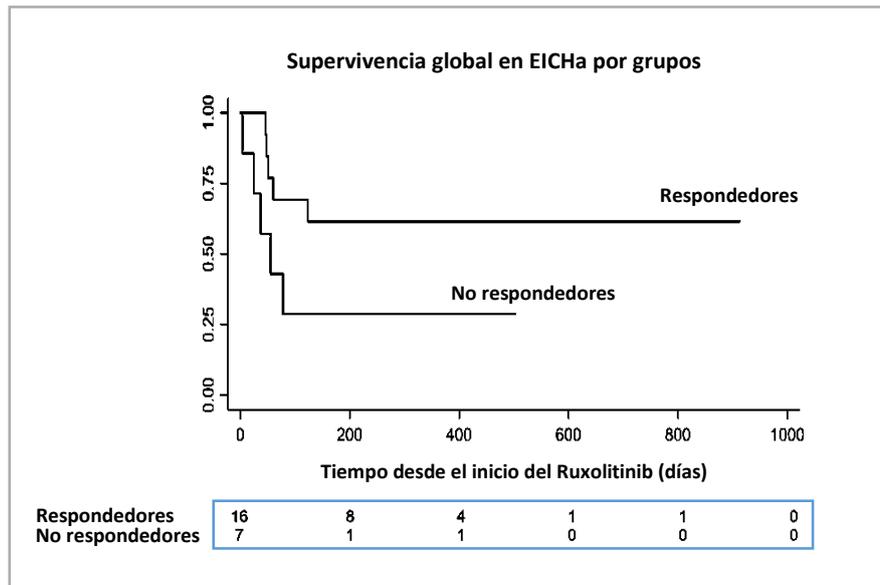
La mediana de seguimiento de toda la serie de pacientes con EICHa fue de 78 días (rango 4-913). La supervivencia global a los 6 meses fue del 47% (IC: 23-67%). La supervivencia global a los 6 meses en los que respondieron frente a los que no respondieron fue del 62% frente al 28%, respectivamente (Figuras 5.1 y 5.2).

<b>Respuesta al ruxolitinib en pacientes con EICHa</b>		
<b>N° sujetos (n = 23)</b>	<b>Respuestas globales (%)</b>	<b>Remisiones completas (%)</b>
Respuesta global	16/23 (69,5)	5/23 (21,7)
Respuesta en los grados 3-4	14/20 (70)	5/20 (25)
Respuesta por órganos		
Piel	11/16 (68,8)	3/16 (18,7)
Tracto digestivo	14/21 (66,7)	4/21 (19)
Hígado	9/13 (69,2)	3/13 (23)
Respuesta global en pacientes con $\geq 3$ líneas de tratamiento	9/12 (75)	
Con EICHa grados 3-4	8/11 (72,7)	2/11 (18,2)
Con afectación en piel	8/10 (80)	2/9 (20)
Con afectación en tracto digestivo	8/11 (72,7)	1/11 (9)
Con afectación hepática	4/6 (66,7)	1/6 (16)

**Tabla 5.3.** Respuesta al ruxolitinib entre los pacientes con EICH aguda.



**Figura 5.1.** Supervivencia global en los pacientes con EICHa que recibieron ruxolitinib.



**Figura 5.2.** Supervivencia global en pacientes con EICHa diferenciando entre grupo de pacientes respondedores vs. no respondedores.

### 5.1.2 Eficacia del ruxolitinib en el tratamiento de la EICH crónica

Las características de los pacientes con EICH crónica se muestran en la tabla 5.4. Del total de la población analizada, 56 pacientes recibieron ruxolitinib como tratamiento para la EICHc refractaria a corticoides. Todos los pacientes presentaban EICHc moderada (50%) o grave (50%). La mediana del número de líneas previas de tratamiento fue de 3 (rango 1-10).

Cuando analizamos la tasa de respuestas tras inicio de tratamiento con ruxolitinib, encontramos una respuesta global del 57,1 % (32/56) entre los pacientes que lo recibieron en el contexto de EICHc, de lo cuáles el 3,5 % (2/56) alcanzó remisión completa (tabla 5.5). La mediana de tiempo hasta observar respuesta desde el inicio del tratamiento fue de 4 semanas (rango: 1-24 semanas) y la dosis más empleada fue de 20 mg/día dividido en dos dosis. Nuevamente no encontramos diferencias significativas en cuanto a las respuestas por órganos afectados. Es de destacar que aquellos pacientes con afectación en piel con cambios escleróticos tuvieron una respuesta del 56%, en el 61,5% en el caso de pacientes con afectación pulmonar y en el 56,3% en aquellos con afectación del tracto digestivo. Además, el tratamiento con ruxolitinib permitió reducir las dosis de corticoides en el 59,2% (32/56) de los pacientes.

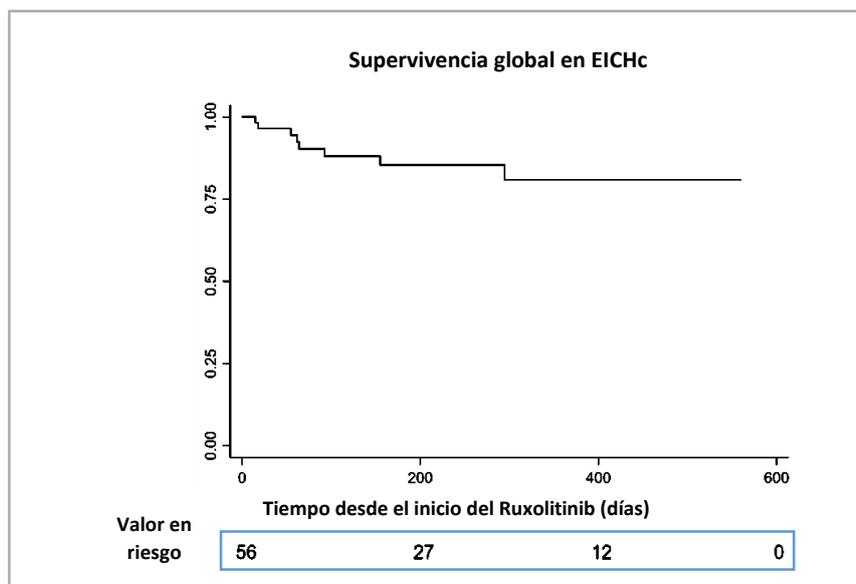
<b>EICH crónica (n =56)</b>	<b>N (%)</b>
<b>Gradación NIH</b>	
Leve	0 (0)
Moderada	28 (50)
Severa	28 (50)
<b>Órganos afectados</b>	
Piel	44 (78,5)
Cambios escleróticos	25 (41,1)
Liquen plano	2 (3,6)
Rash	13 (23,2)
Hiper/hipopigmentación	3 (5,4)
Ictiosis	3 (5,4)
Oral	33 (58,9)
Ocular	23 (41)
Tracto digestivo	16 (28,6)
Hígado	10 (17,8)
Pulmón	26 (45)
Afectación en la movilidad articular	22 (39,4)
Tracto urinario	7 (12,5)
Membrana esofágica	2 (3,6)
Derrame pleural/pericárdico	2 (3,6)
Síndrome nefrótico	1 (1,8)
Neuropatía	1 (1,8)
Microangiopatía	1 (1,8)
Polimiositis	3 (5,3)
<b>Líneas previas de tratamiento</b>	
1	4 (7,1)
2	20 (35,7)
3	11 (19,6)
>3	21 (37,6)

**Tabla 5.4.** Características de la población de pacientes con EICHc previo al uso de ruxolitinib.

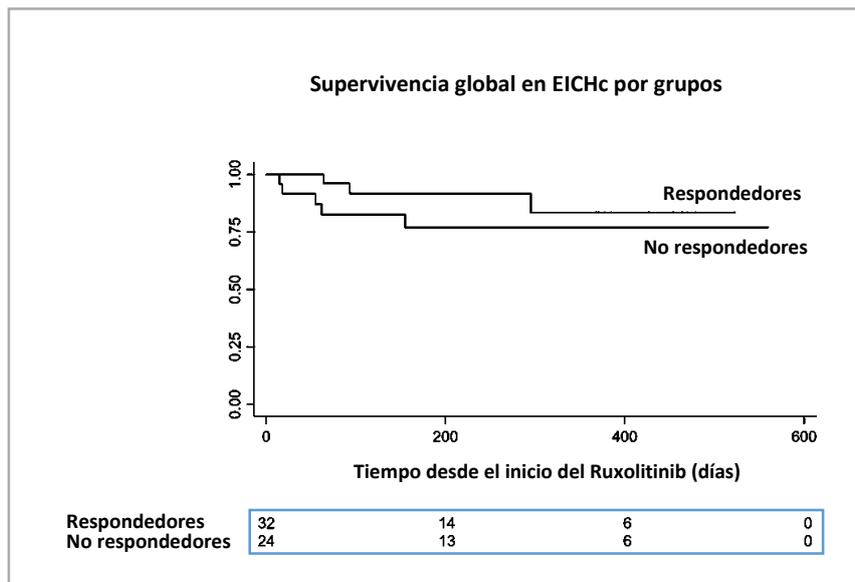
Respuesta al ruxolitinib en pacientes con EICHc	Respuestas globales (%)	Remisiones completas (%)
Respuesta global	32/56 (57,1)	2/56 (3,5)
Respuesta global por grados		
Moderado	17/28 (60,7)	1/28 (3,5)
Severo	15/28 (53,5)	1/28 (3,5)
Respuesta global por órganos		
Piel con cambios escleróticos	14/25 (56)	0/25 (0)
Pulmón	16/26 (61,5)	2/26 (7)
Tracto digestivo	9/16 (56,3)	2/16 (12)
Respuesta global en pacientes con $\geq 3$ líneas de tratamiento	17/32 (53,1)	2/32 (6,3)
Con afectación moderada o severa	17/32 (53,1)	2/32 (6,3)
Con afectación en piel con cambios escleróticos	8/15 (53,3)	0/15 (0)
Con afectación pulmonar	10/14 (71,4)	2/14 (14,2)
Con afectación en tracto digestivo	7/10 (70)	2/10 (20)

**Tabla 5.5.** Respuesta al ruxolitinib entre los pacientes con EICH crónica.

La mediana de seguimiento fue de 181 días (rango 15-560). La supervivencia global al año fue del 81% (IC: 63-89%). La supervivencia global al año en respondedores frente a no respondedores fue del 83% frente al 76%, respectivamente (Figuras 5.3. y 5.4.).



**Figura 5.3.** Supervivencia global en los pacientes con EICHc que recibieron ruxolitinib.



**Figura 5.4.** Supervivencia global en pacientes con EICHc diferenciando entre grupo de pacientes respondedores *vs.* no respondedores.

### 5.1.3 El ruxolitinib no aumenta la reactivación de infecciones virales respecto a la tasa de reactivación previa al inicio del tratamiento

En el grupo de pacientes con EICHa, la frecuencia de reactivación de CMV fue del 52,2% (12/23). Sin embargo, cuando analizamos la incidencia antes del inicio del tratamiento, ésta fue también del 52,2% (12/23); por lo que no se apreció un aumento en la incidencia de reactivaciones de CMV durante el tratamiento.

En el grupo de pacientes con EICHc, la frecuencia de reactivación de CMV fue del 19,6% (11/56) durante el tratamiento con ruxolitinib, y del 26% (15/56) previo al mismo, por lo que tampoco se observó aumento de reactivaciones de CMV tras el inicio del ruxolitinib. La monitorización y seguimiento del CMV se realizó mediante PCR de CMV en plasma y las reactivaciones se trataron según la práctica clínica institucional cuando el número de copias por mililitro fue superior a 500.

#### 5.1.4 Ruxolitinib presenta un perfil de toxicidad aceptable

De forma global, 26 pacientes (32,9%) interrumpieron el tratamiento con ruxolitinib. Las principales causas fueron falta de respuesta (14), citopenias (3 pacientes tenían trombocitopenia, 3 anemia, 3 tenían ambas); infecciones (1); y otras causas (2).

Se observó una frecuencia del 32,9% (26/79) de pacientes que tuvieron algún tipo de toxicidad o evento adverso relacionado con el fármaco de cualquier grado. De ellos, solo tres pacientes interrumpieron de forma definitiva el tratamiento con ruxolitinib. Las causas de la interrupción del tratamiento en estos pacientes fueron la infección fúngica, trombocitopenia e insuficiencia hepática. Para el resto, fue suficiente con la suspensión temporal, la reducción de dosis o el manejo sintomático (Tabla 5.6).

<b>Toxicidades y eventos adversos</b>	<b>N= 26/79 (32,9 %)</b>
Infecciones	4 (5)
Infecciones fúngicas	2
Infecciones bacterianas/virales	2
Citopenias	14 (17,7)
Anemia	3
Leucopenia	2
Trombocitopenia	5
Combinaciones	4
Otras	8 (10,1)
Disfunción renal	3
Disfunción hepática	3
Hipertensión	1
Edemas	1
<b>Acción</b>	
Reducción de dosis	14 (17,7)
Suspensión temporal	2 (2,5)
Discontinuación	3 (3,7)
Sin acción/Otras	7 (8,8)

**Tabla 5.6.** Toxicidades y eventos adversos observados durante el tratamiento con ruxolitinib.

### **5.1.5 Ruxolitinib no disminuye el EICL**

Sólo se encontró un paciente en la población analizada que sufrió recaída de su patología hematológica, y éste además se calificó como paciente no respondedor al tratamiento con ruxolitinib.

En cuanto a la mortalidad, fallecieron 18 pacientes (22,8%) de forma global; 10 pacientes (43,5%) en el grupo de pacientes con EICHa, y 8 pacientes (14,3%) en el grupo de pacientes con EICHc. Las causas de muerte fueron: infecciones (10), EICH refractaria (6) y otras causas (2).

## 5.2 PARTE II: Modelo preclínico

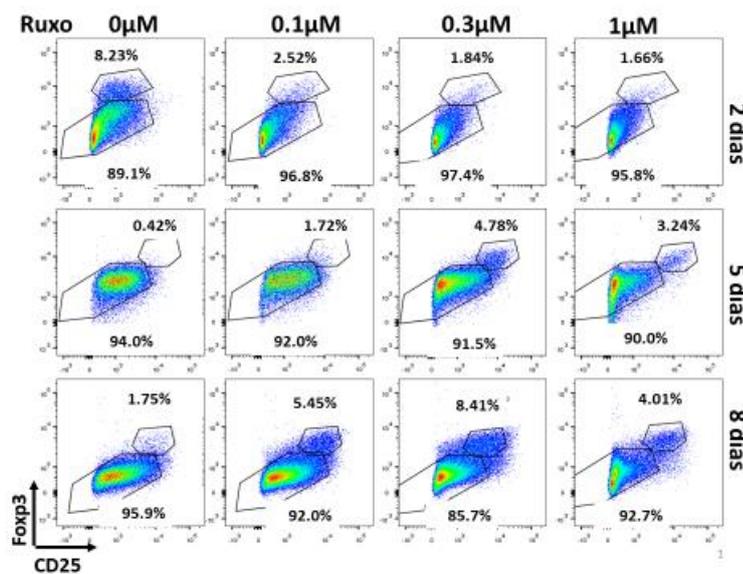
### 5.2.1 Modelo *in vitro*

#### 5.2.1.1 Cultivos celulares

##### 5.2.1.1.1 Ruxolitinib favorece el ratio nTreg:Tcon *in vitro* a lo largo del tiempo

En nuestro modelo estudiamos el efecto del inhibidor de JAK 1 y 2, ruxolitinib, sobre células Tregs *in vitro* activadas previamente con anti-CD3 y anti-CD28 a los 2, 5 y 8 días.

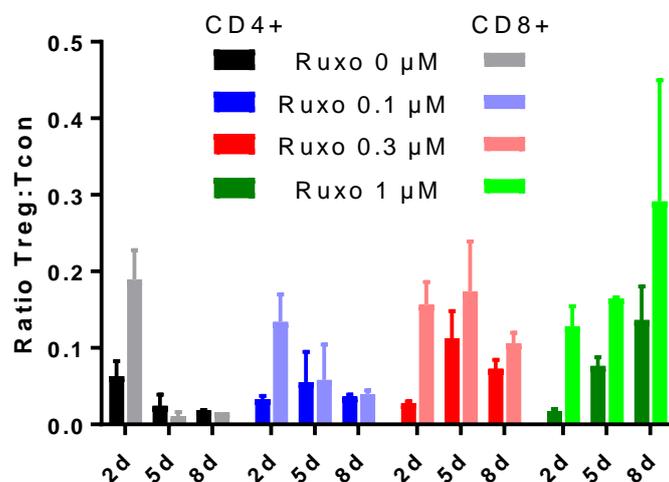
A los 2 días del experimento encontramos que a proporciones crecientes de ruxolitinib, se produjo una reducción en la activación de las células T, así como una disminución en el número de células CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>high</sup>, las cuales experimentaron una caída significativa en el porcentaje (Figura 5.5 y 5.8A) en comparación con aquellos pocillos que no contenían ruxolitinib.



**Figura 5.5.** La figura representa los gráficos de citometría de las células mononucleadas activadas con anti-CD3 y anti-CD28 en distintos puntos y a distintas concentraciones de ruxolitinib, en concreto se muestran los marcadores CD25 y FoxP3 dentro de la subpoblación de CD4<sup>+</sup>.

A los 5 y 8 días del experimento volvió a realizarse la misma medición. Los resultados arrojaron un incremento progresivo a lo largo del tiempo en el porcentaje de células Treg en los pocillos tratados con dosis crecientes de ruxolitinib, mientras que los no tratados experimentaron una caída drástica en dicho porcentaje de células. En nuestros experimentos la concentración óptima de ruxolitinib para obtener el mayor porcentaje de células Treg fue de 0,3  $\mu\text{M}$ .

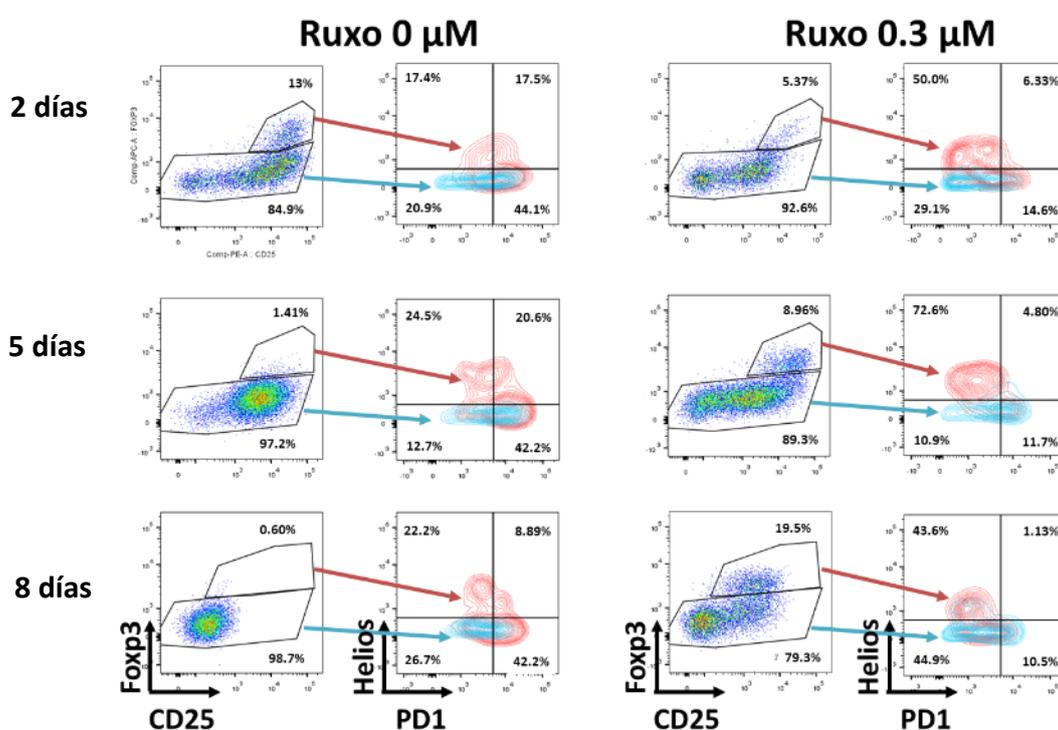
También se contabilizó el ratio de células Treg con respecto a células CD4 y CD8, que se muestra en la siguiente figura (Figura 5.6).



**Figura 5.6.** Cuantificación del ratio de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>high</sup> con respecto a células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Se muestra la media y el error estándar de la media (SEM) de dos experimentos independientes.

Nuestra hipótesis sobre este comportamiento a lo largo del tiempo es que las células CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> que detectamos en los pocillos no tratados con ruxolitinib se corresponden con Treg inducidos (iTregs) generados a partir de Tcon tras la activación con anti-CD3 y anti-CD28, y cuyo fenotipo es más inestable, mientras que las células Treg detectadas en los pocillos tratados con ruxolitinib eran células Treg naturales (nTregs) de origen tímico, de fenotipo es más estable en el tiempo.

Para demostrar esta hipótesis realizamos tinciones para el factor de transcripción Helios. Si bien la expresión de Helios es un marcador que puede expresarse tanto en células Treg tímicas como en Tregs inducidas<sup>90,91</sup>, en nuestro estudio utilizamos activación con anti-CD3 y anti-CD28 en placas, método que se ha descrito que no incrementa la expresión de Helios en las células Treg inducidas<sup>92</sup>. Al realizar esta tinción observamos como los cultivos tratados con ruxolitinib presentaron mayores porcentajes de células Helios+FoxP3<sup>high</sup> en comparación a los pocillos no tratados con ruxolitinib. Dicha diferencia se mantuvo a lo largo de todo el experimento (Figuras 5.7 y 5.8B).



**Figura 5.7.** La figura representa los gráficos de citometría de las células mononucleadas activadas con anti-CD3 y anti-CD28 en distintos puntos y a concentraciones de ruxolitinib 0 y 0.3 μM. Los gráficos de puntos muestran los marcadores CD25 y FoxP3 dentro de la subpoblación de CD4<sup>+</sup>. Los gráficos de densidad muestran las tinciones para Helios y PD1.

A fin de definir esta población procedimos a la caracterización fenotípica de las células Treg de los cultivos mediante la medición de PD1, CTLA4, CD39 y CD45RA.

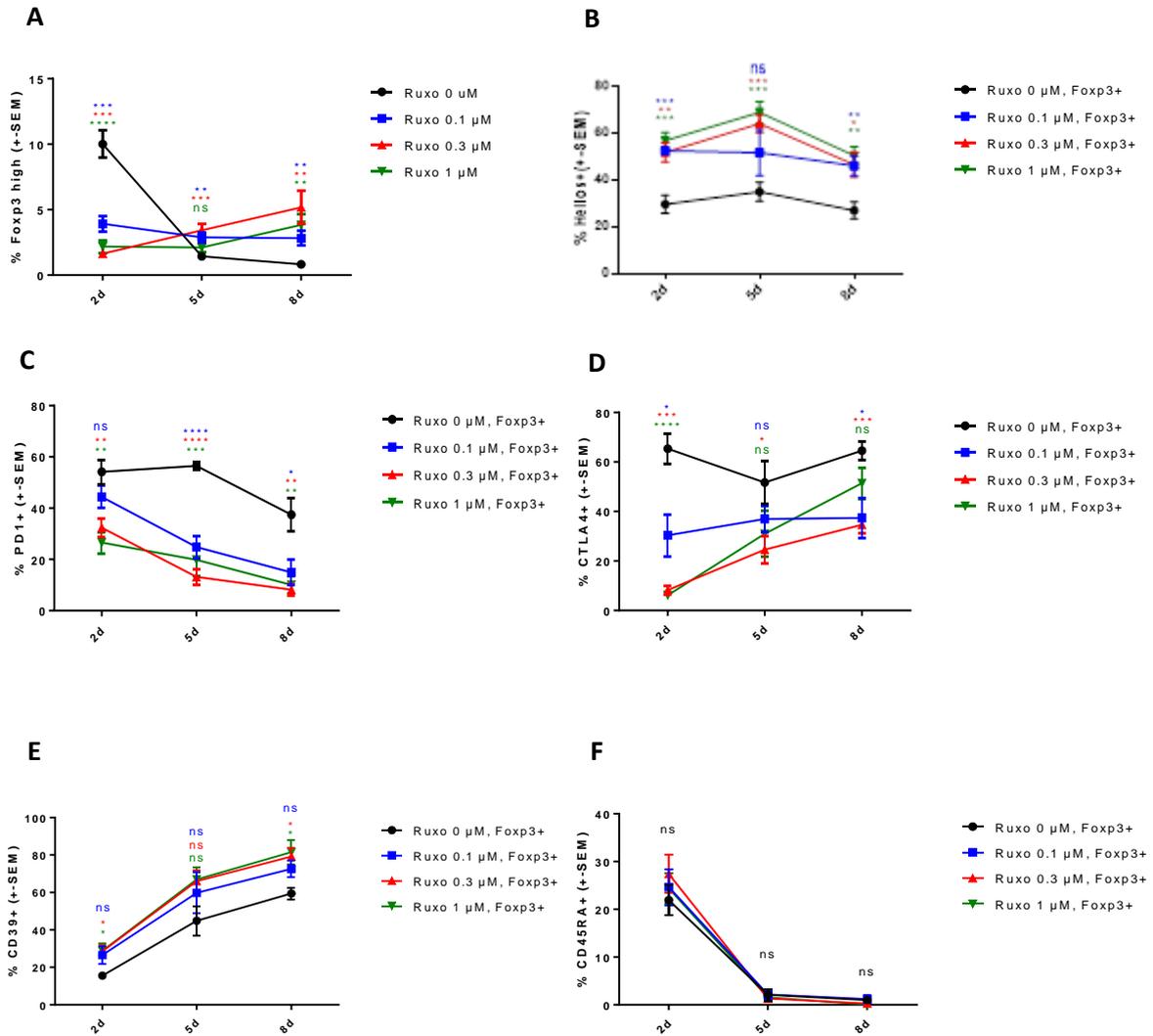
El PD1 (promotor de muerte celular programada 1) es una proteína presente en la superficie celular de linfocitos T implicada en la regulación de la activación inmune mediante dos mecanismos, el aumento de la apoptosis en células T específicas, y la reducción de la apoptosis de las células Tregs<sup>93</sup>. Por otro lado, también es un marcador de agotamiento de las células T efectoras. En nuestros experimentos encontramos que la expresión de PD1 fue mayor en las células Helios- FoxP3<sup>high</sup> comparado con las células Treg Helios+ (Figuras 5.7 y 5.8C), mostrando una relación inversa. Recientemente se ha publicado que la delección de PD1 favorece la capacidad de supresión de las células reguladoras en ratones KO para esta proteína<sup>94</sup>. En células mononucleadas aisladas no estimuladas, la mayoría de las células FoxP3+ son Helios+ y no existe correlación con la expresión de PD1 (no mostrado).

El CTLA4 (antígeno citotóxico de células T 4) es otro inhibidor de la activación linfocitaria que regula la respuesta inmune. CTLA4 se expresa de forma constitutiva en las células Treg e incrementa su expresión tras la activación celular<sup>95</sup>. En nuestros experimentos encontramos que el ruxolitinib reduce la expresión de este inhibidor a tiempos cortos de incubación, pero que a mayores concentraciones, aumenta la expresión a lo largo del tiempo (Figura 5.8D), sugiriendo que este fármaco podría potenciar la capacidad supresora de las células Tregs.

Por otro lado, el CD39 es un marcador celular que se ha relacionado con la capacidad supresora de las células Tregs<sup>56,96</sup>, gracias a su actividad catalítica productora de adenosina extracelular. Su expresión se vio aumentada a lo largo del tiempo en los cultivos en todas las condiciones experimentales (Figura 5.8E), aunque fue notablemente mayor en las Treg tratadas con ruxolitinib en comparación a las Treg no tratadas en todos los puntos medidos.

Por último, analizamos expresión de CD45RA. Dicho marcador se presenta en los fenotipos *naïve* que caracteriza a las células vírgenes y que se pierde progresivamente al estimular los linfocitos para dar paso a la expresión de CD45RO, asociado a los linfocitos T de memoria. En el caso de las Treg de sangre periférica, se utiliza para identificar una población que puede expandirse *in vitro* manteniendo su capacidad supresora<sup>97,98</sup>. Al analizar dicho fenotipo en nuestros experimentos, encontramos una pérdida de este marcador en todas las células Treg, independientemente de su fenotipo Helios, indicando

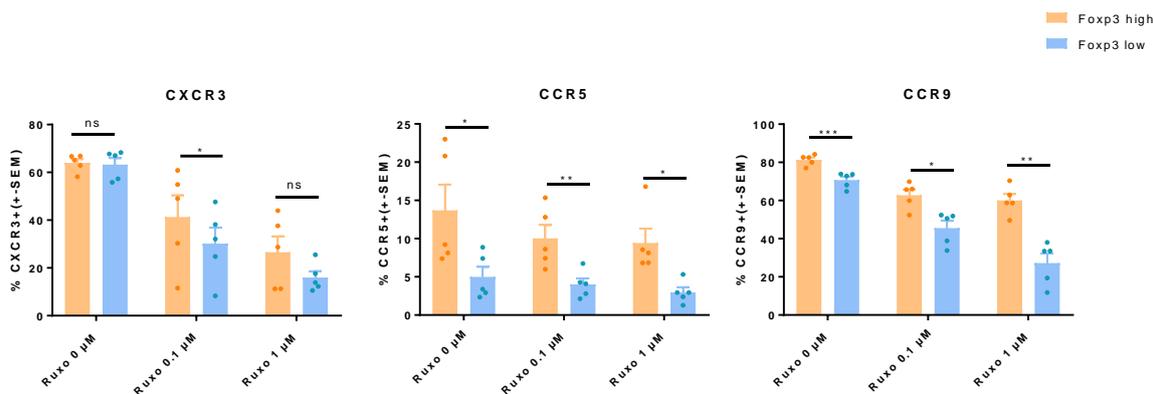
que, en nuestros cultivos, las células T pierden su fenotipo *naïve* al activarse con anti-CD3 y anti-CD28, incluyendo las células derivadas del timo nTreg (Figura 5.8F).



**Figura 5.8.** Se muestra la cuantificación de los distintos marcadores dentro de la subpoblación de células CD4+ FoxP3<sup>high</sup>. **(A)** Cuantificación de células FoxP3<sup>high</sup>; **(B)** Cuantificación de Helios+; **(C)** Cuantificación de PD1+; **(D)** Cuantificación de CTLA4+; **(E)** Cuantificación de CD39+; **(F)** Cuantificación de CD45RA+. Valores de p: \* <0,05, \*\* <0,01, \*\*\* <0,001, \*\*\*\* <0,0001.

### 5.2.1.1.2 La expresión de los receptores de quimiocinas de tubo digestivo se ve menos afectada por ruxolitinib en Tregs que en Tcon

Otro aspecto que se valoró fue la capacidad migratoria de las células Treg hacia los órganos diana afectados por el EICHc, dado que es un aspecto que podría influir en la eficacia del tratamiento con dichas células. Para ello estudiamos los marcadores Cxcr3, Ccr5 y Ccr9, pues la expresión de dichas moléculas se ha correlacionado con las propiedades migratorias de las células T al intestino en condiciones patológicas<sup>99,100</sup>. Se realizaron mediciones de estos tres marcadores tanto en células Treg como en células Tcon. Nuestros hallazgos muestran que ruxolitinib reduce la expresión de Cxcr3 y Ccr9 en Tregs y Tcon y de Ccr5 sólo en Tregs. A pesar de que reduce la expresión de estas moléculas en Tregs, algo indeseado en los casos de afectación del tracto intestinal por EICHc, en todos los casos la expresión de dichos marcadores fue significativamente mayor en las células Treg en comparación a las células Tcon. Ello sugiere que ruxolitinib podría afectar menos a la capacidad migratoria de las células Treg (Figura 5.9).



**Figura 5.9.** Porcentaje de células positivas Cxcr3, Ccr5 y Ccr9 en células CD4+ FoxP3<sup>high</sup> y FoxP3<sup>low</sup> después de 48 h de estimulación anti-CD3 / CD28. Las células se trataron con las cantidades indicadas de ruxolitinib desde el comienzo de la estimulación. Se representa la media y el error estándar de la media (SEM) de 5 experimentos independientes. Valores de p: \* <0,05, \*\* <0,01, \*\*\* <0,001, \*\*\*\* <0,0001.

### 5.2.1.1.3 La fosforilación de Stat3 y Stat5 está reducida tanto en las células Treg como en las Tcon tras tratamiento con ruxolitinib

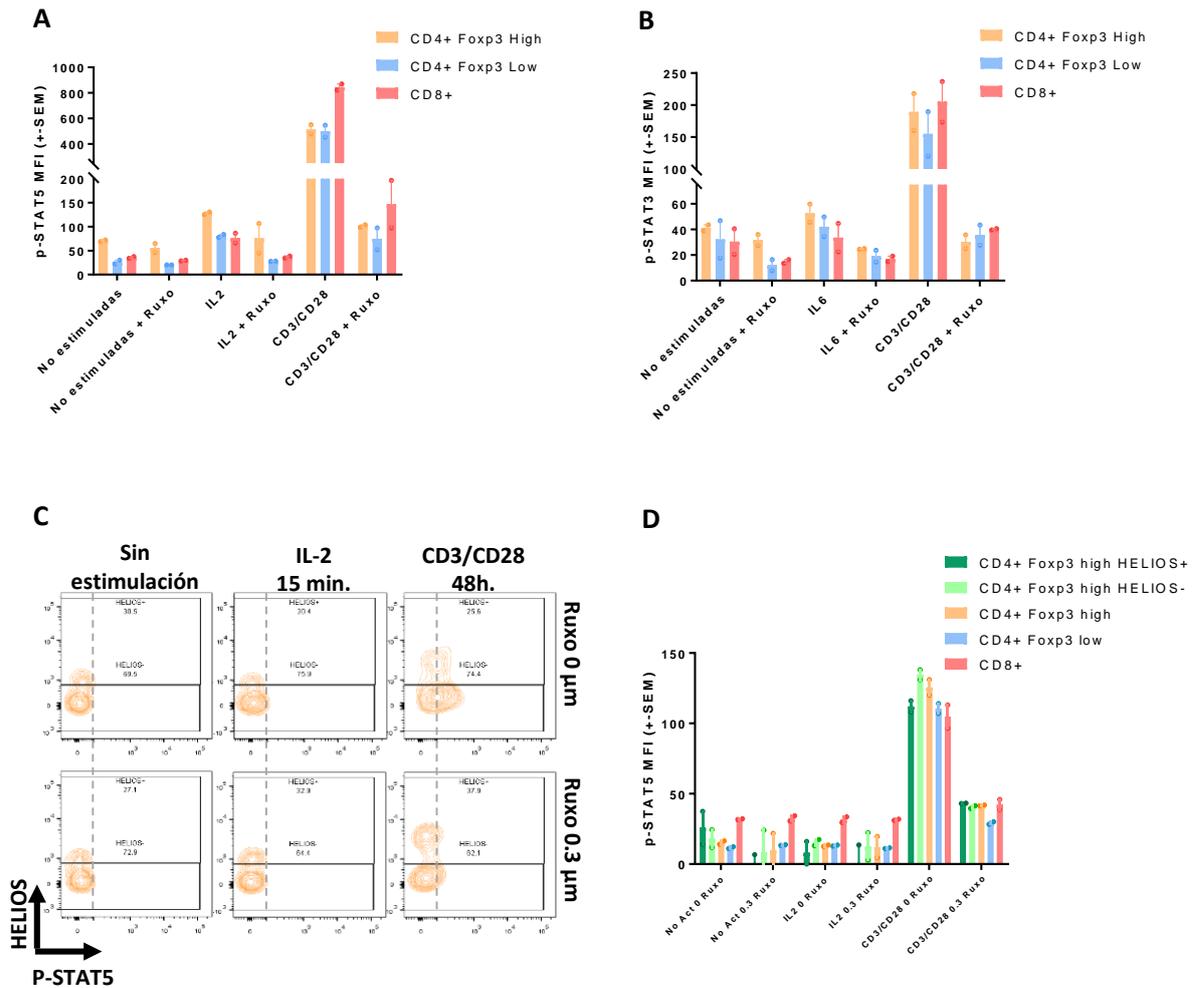
Se ha descrito previamente que el ruxolitinib reduce la fosforilación de Stat3<sup>34</sup> y Stat5<sup>101</sup> en los linfocitos T. También se ha descrito que Stat5 es esencial en el desarrollo de las Tregs, mientras que Stat3 no lo es. Sin embargo, no se ha abordado el efecto del ruxolitinib en cuanto a fosforilación de Stat3 y Stat5 sobre las células Tregs. Se ha llegado a proponer que la fosforilación de Stat3 depende principalmente de JAK1 y JAK2, mientras que Stat5 depende más de JAK2 y JAK3<sup>29</sup>. Decidimos medir en nuestros experimentos la influencia del ruxolitinib en la fosforilación tanto de Stat3 como de Stat5, tanto en células Treg como en Tcon. A las 48h de activación celular con anti-CD3 y anti-CD28, se evidenció una fuerte fosforilación de Stat5 en células CD8+, CD4+ FoxP3<sup>low</sup> y células Treg (Figura 5.10A), que fue completamente abolido por el tratamiento con ruxolitinib en todos los casos. Lo mismo ocurrió con la fosforilación Stat3 (figura 5.10B). Verificamos si había o no alguna diferencia en las células Helios+ y Helios-, y se observó el mismo resultado para ambas poblaciones (figura 5.10C, D).

### 5.2.1.2 Ensayo de supresión

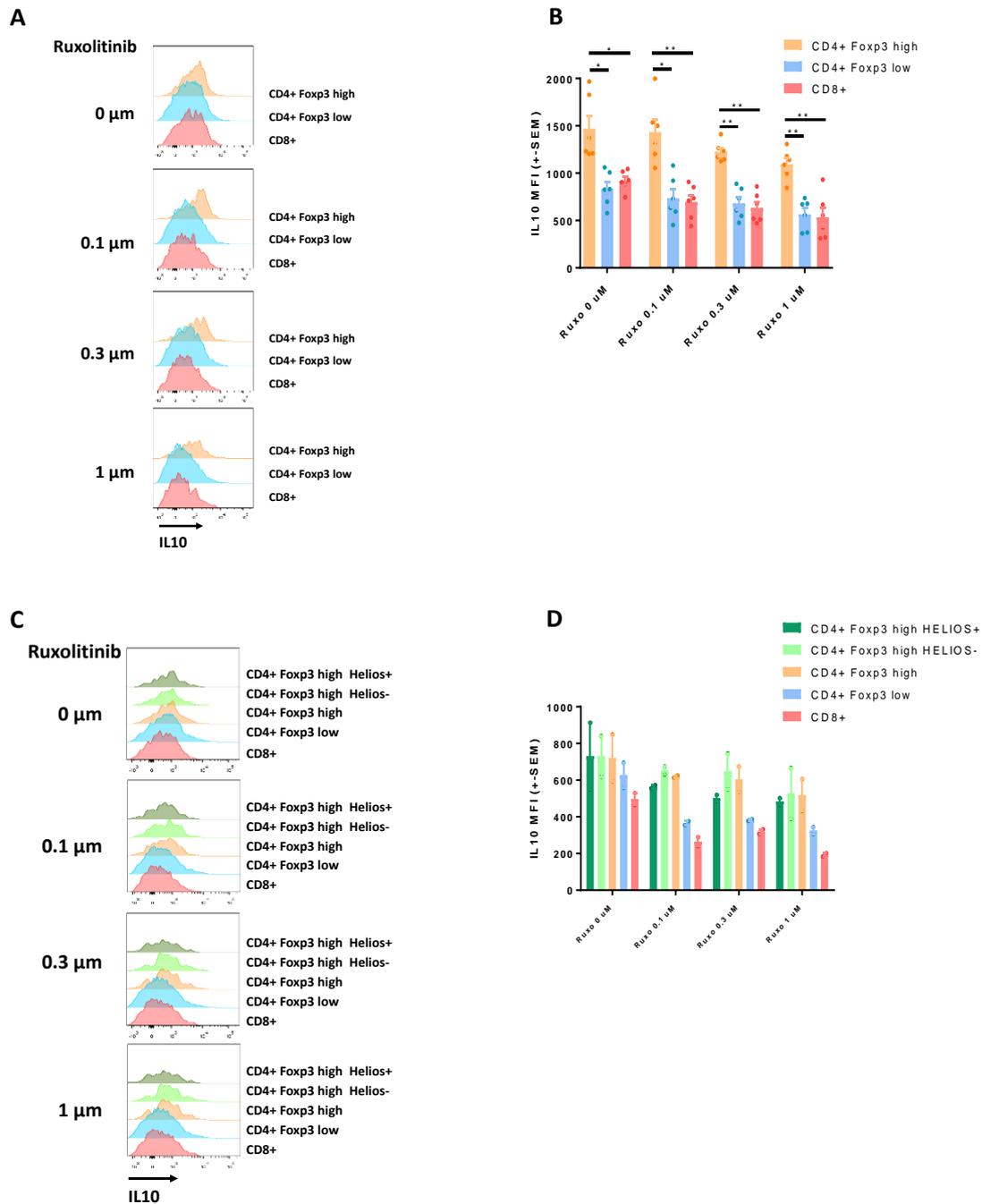
#### 5.2.1.2.1 Ruxolitinib no afecta la capacidad supresora de las células Treg

Para comprobar la capacidad supresora de las Treg tratadas con ruxolitinib, primero analizamos la producción de IL-10 de las células CD4+ FoxP3<sup>high</sup> presentes en los cultivos de células mononucleadas tras dos días de activación y tratamiento con diferentes concentraciones de ruxolitinib (Figura 5.11A, B), en comparación con las células CD4+ FoxP3<sup>low</sup> y CD8+.

Las primeras mostraron una mayor capacidad de producción de IL-10 a todas las concentraciones de ruxolitinib, a pesar de mostrar una ligera disminución progresiva del marcaje intracelular de IL-10 a concentraciones crecientes de ruxolitinib. Esto fue así para las células Helios+ y Helios- CD4+ FoxP3<sup>high</sup> (Figura 5.11C, D).



**Figura 5.10.** (A) Cuantificación de Fosfo-Stat5 intracelular. Las células mononucleadas se cultivaron durante 48 h en presencia de ruxolitínib a concentraciones de 0 o 0,3  $\mu\text{M}$ , con o sin estimulación anti-CD3 y CD28. Cuando se indica, las células no estimuladas se estimularon con IL-2 durante 15 minutos antes de la tinción por citometría. Las células se activaron para CD4+ FoxP3<sup>high</sup>, CD4+ FoxP3<sup>low</sup> y CD8+. Se muestra el promedio y el error estándar de la media (SEM) de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de dos experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno; (B) Como en A, pero en su lugar se utilizó tinción con Fosfo-Stat3. En este caso, se utilizó IL-6 para la estimulación celular; (C) Gráficos de densidad de citometría de Fosfo-Stat5 y Helios; (D) Como en A, pero en este caso, las células CD4+ FoxP3<sup>high</sup> también están diferenciadas en células Helios+ y Helios-. Se representan los valores  $p$  de la prueba *t de Student* pareada. Valores de  $p$ : \* <0,05, \*\* <0,01, \*\*\* <0,001, \*\*\*\* <0,0001.



**Figura 5.11. Cuantificación de IL-10 intracelular.** (A) Histogramas representativos de tinción de IL-10 intracelular. Las células mononucleadas se cultivaron durante 48 h en presencia de ruxolitinib a concentraciones de 0, 0,1, 0,3 o 1  $\mu\text{M}$ , con estimulación anti-CD3 y CD28; (B) Cuantificación de la citometría mostrada en A. Promedio y SEM de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cinco experimentos independientes; (C) Como en A, pero las células CD4+ FoxP3<sup>high</sup> también se tiñeron con anticuerpos contra Helios para mostrar las poblaciones Helios+ y Helios-. Se muestran los valores p de un ANOVA de una vía. \* <0,05, \*\* <0,01, \*\*\* <0,001, \*\*\*\* <0,0001; (D) Cuantificación de la citometría mostrada en C.

Posteriormente realizamos mediciones de la capacidad supresora de las Tregs en presencia de ruxolitinib en un modelo de supresión *in vitro*. Para ello procedimos a la purificación mediante separación inmunomagnética de células Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>). Éstas se mezclaron con células mononucleadas humanas marcadas con el marcador de proliferación celular CFSE en ratios diferentes y en presencia de distintas concentraciones de ruxolitinib, y fueron activadas con anti-CD3 y anti-CD28.

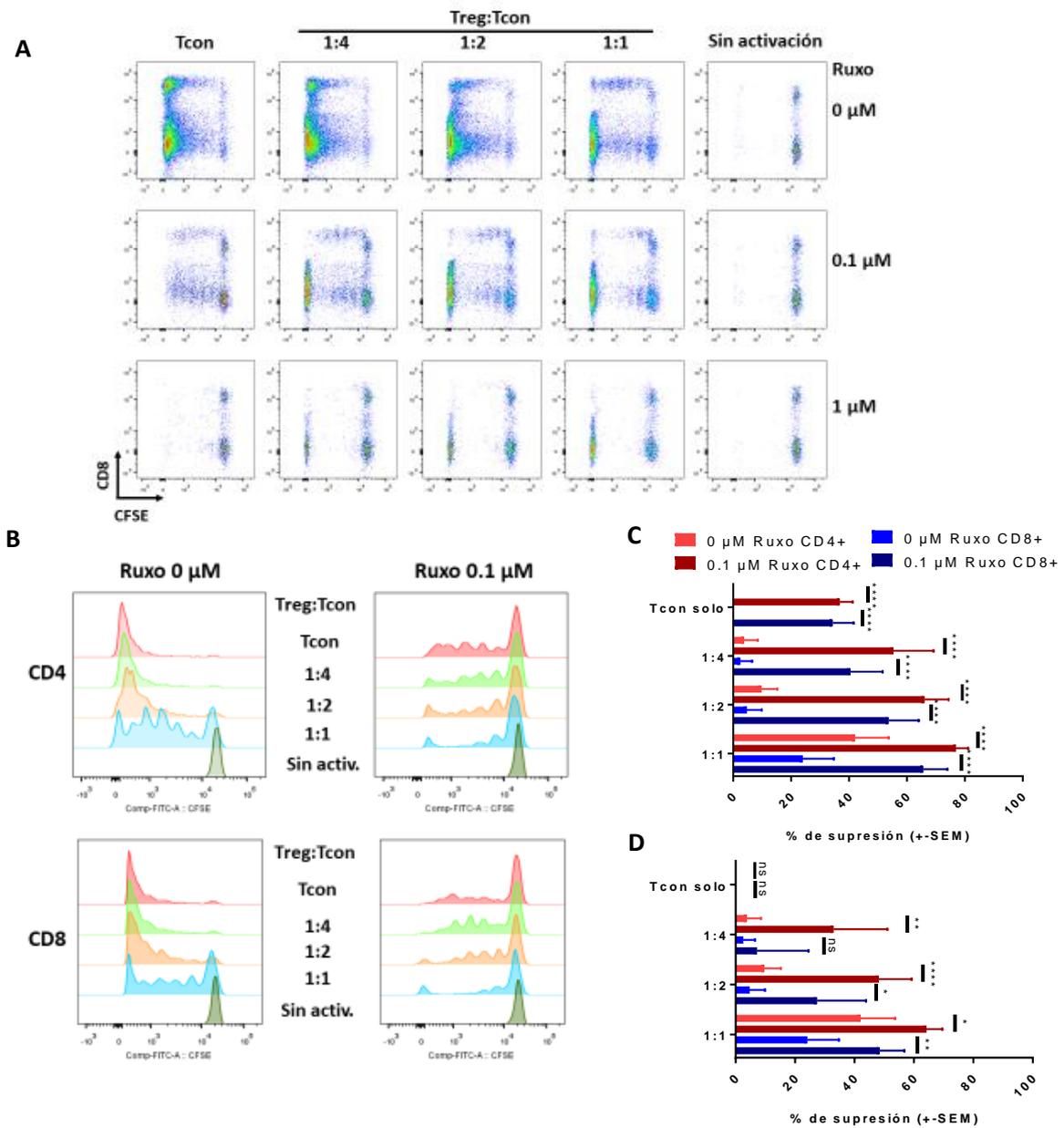
El estudio mostró que a concentraciones de ruxolitinib 1  $\mu$ M, independientemente de la presencia o no de Tregs, la proliferación de linfocitos T respondedores quedó abolida casi por completo. A concentraciones de ruxolitinib 0,1  $\mu$ M la proliferación de linfocitos T se redujo de manera considerable, pero aún quedaban células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> capaces de proliferar en ausencia de células Treg (Figura 5.12A, B). Sin embargo, la adición de células Tregs suprimió esta proliferación residual y esta supresión fue mayor a mayor dosis de dichas células. La cuantificación de la capacidad de supresión normalizada a los controles no tratados con ruxolitinib no Tregs mostró el efecto aditivo de ruxolitinib y Tregs (Figura 5.12C). Más interesante aún, cuando normalizamos al control sin Treg de cada tratamiento, podemos observar que la capacidad de supresión de Tregs no disminuye en presencia de ruxolitinib 0,1  $\mu$ M y, por el contrario, es incluso mayor (Figura 5.12D), lo que sugiere un efecto sinérgico de ruxolitinib y Tregs en la supresión de la activación.

## 5.2.2 Modelo murino

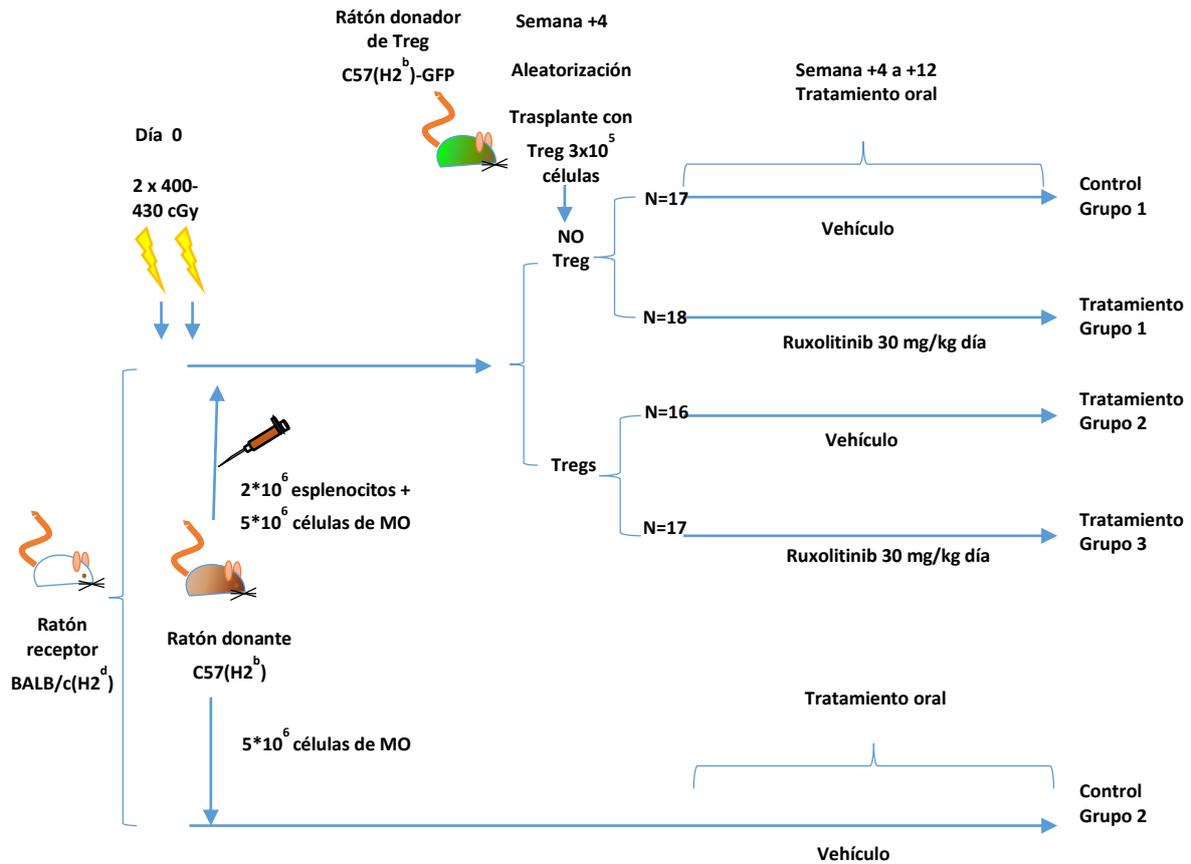
### 5.2.2.1 La terapia combinada de ruxolitinib y Treg disminuye la gravedad de la EICH en modelo murino

Para confirmar el potencial terapéutico de una combinación de ruxolitinib y Treg en el tratamiento de la EICH, decidimos realizar un estudio preclínico utilizando un modelo de ratón de EICH crónico progresivo<sup>102</sup>.

Una vez los ratones fueron trasplantados, el día +28 postrasplante se realizó una aleatorización a distintos grupos de tratamiento. Utilizamos como punto temporal el día +28 postrasplante por ser el inicio de la fase crónica de la EICH. A continuación, se muestra el diseño del estudio (Figura 5.13):

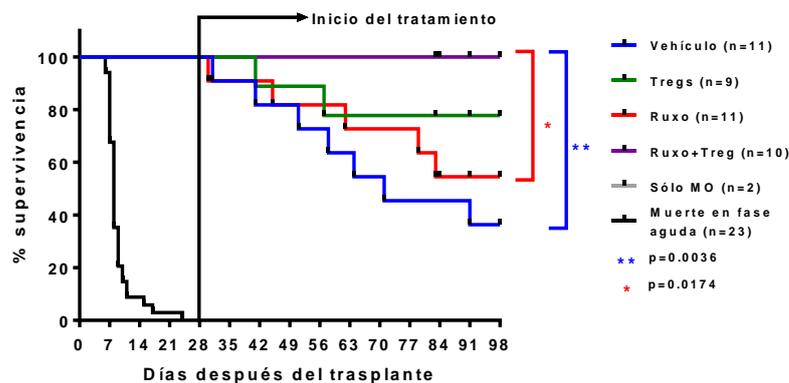


**Figura 5.12. Ensayo de supresión.** (A) Plots de citometría que representan la tinción de CD8 y CFSE. Se realizó tinción con CFSE de las células mononucleadas activadas en presencia de distintas concentraciones de ruxolitinib y Tregs; (B) Histograma representativo de la tinción con CFSE de células Tcon respondedoras; (C) Se muestra el porcentaje de supresión utilizando como control las células Tcon. El porcentaje de supresión se calcula como  $\{1 - (\% \text{ de proliferación en la muestra} / \% \text{ de proliferación en el control})\} \times 100\%$ , siendo el control la muestra sin tratamiento; (D) Como en C, pero en este caso la muestra control es una muestra sin Treg con ruxolitinib 0,1 μM para las muestras tratadas con ruxolitinib. Se muestran los valores p por pares de una prueba T de Student pareada. Valores de p: \* <0,05, \*\* <0,01, \*\*\* <0,001, \*\*\*\* <0,0001. SEM = Error estándar de la media.



**Figura 5.13. Modelo murino de EICH.** Se emplearon ratones receptores de la cepa BALB/c. Se irradiaron con 800-860 cGy fraccionado en dos dosis con una separación de 4 horas en el día 0 del trasplante. Posteriormente se realizó el trasplante con la cepa donante C57Bl/6. En total, la cepa receptora recibió  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $2 \times 10^6$  esplenocitos, a excepción de un grupo que se destinó a control y que se trasplantó con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea, sin esplenocitos. El día +28 postrasplante se llevó a cabo la aleatorización en la cual los especímenes fueron asignados a cuatro grupos de tratamiento, recibiendo: A)  $3 \times 10^5$  Treg aislados de ratones transgénicos GFP isogénicos del donante (C57Bl/6-Tg (ACTB-EGFP) 10sb/J), B) Ruxolitinib 30 mg/kg/día por sonda oral, durante 5 a la semana, C)  $3 \times 10^5$  Treg más Ruxolitinib 30 mg/kg/día en la misma pauta descrita, y D) vehículo de la infusión de ruxolitinib. MO = médula ósea.

La supervivencia (Figura 5.14) de los ratones que recibieron el tratamiento combinado fue significativamente mayor en comparación con los que recibieron el vehículo ( $p = 0,0036$ ) o el tratamiento único con ruxolitinib ( $p = 0,0164$ ), y aunque no fue estadísticamente significativa, también fue mayor que el tratamiento único con Tregs.

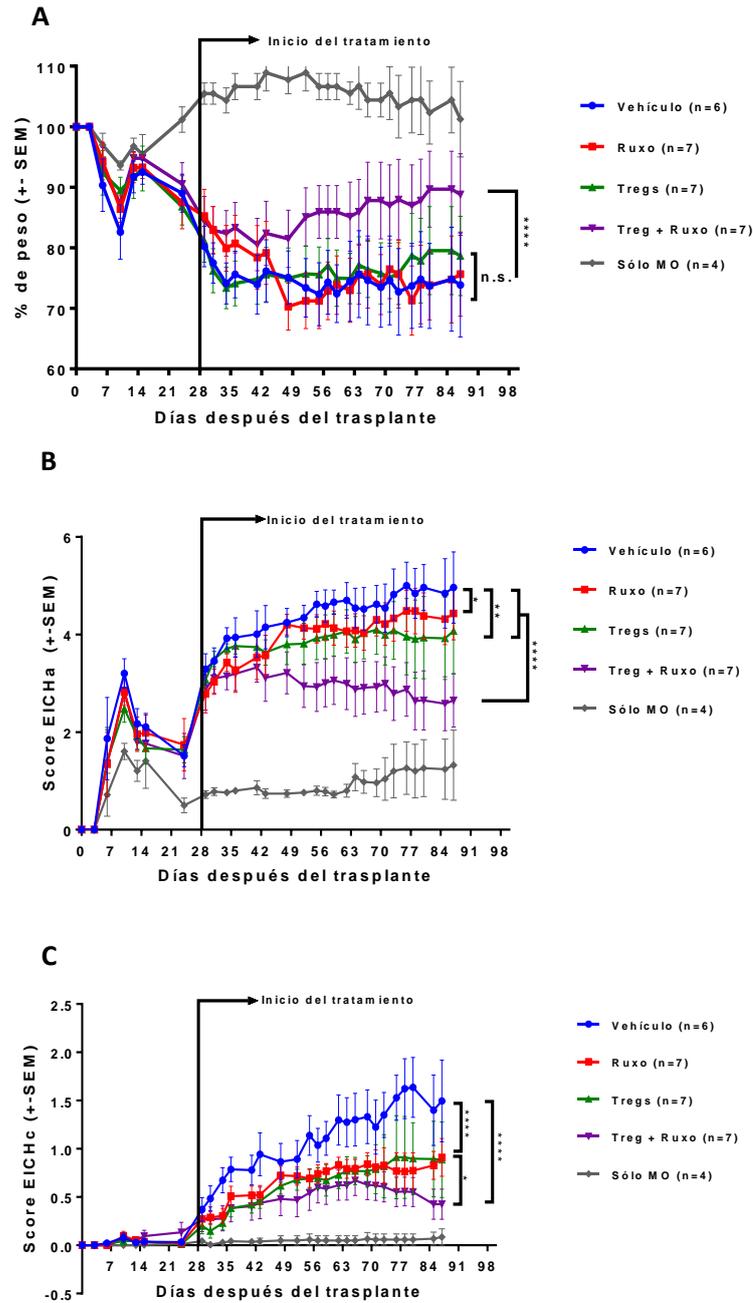


**Figura 5.14.** Representación de la supervivencia mediante curva de Kaplan-Meier. Se empleó el *Log Rank test* para calcular las diferencias estadísticas entre el grupo de doble tratamiento y el resto de grupos.

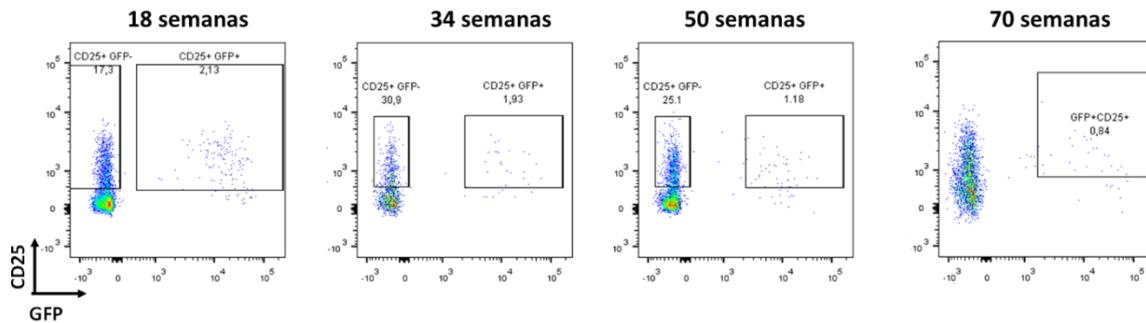
En cuanto a las puntuaciones clínicas de pérdida de peso, puntuación en EICHa y puntuación en EICHe (Figura 5.15) también se encontró una mejora estadísticamente significativa en el grupo de tratamiento combinado comparado con los brazos control y de terapia única. También analizamos mediante citometría de flujo y hematimetría la cantidad y fenotipo celular hallados en muestras de sangre periférica de los ratones en las semanas 2, 4 y 6 tras el inicio del tratamiento.

Algunos ejemplares se sacrificaron en la semana 12 de tratamiento y se procedió a estudio histológico de órganos como sangre, MO, bazo, timo, placas de Peyer e intestino delgado. Dado que la cepa utilizada de ratón era GFP, pudimos cuantificar las células Treg GFP+. Encontramos dichas células presentes tanto en sangre periférica como en médula ósea a las 18, 34, 50 y 70 semanas (Figura 5.16), momento en el cuál se sacrificaron todos los ratones seleccionados con este fin.

En resumen, el modelo murino muestra una mayor efectividad del tratamiento combinado con ruxolitinib y Treg en la evolución del score clínico de EICH que también se relaciona con una mejora significativa de la supervivencia en los ratones que reciben ambos tratamientos.



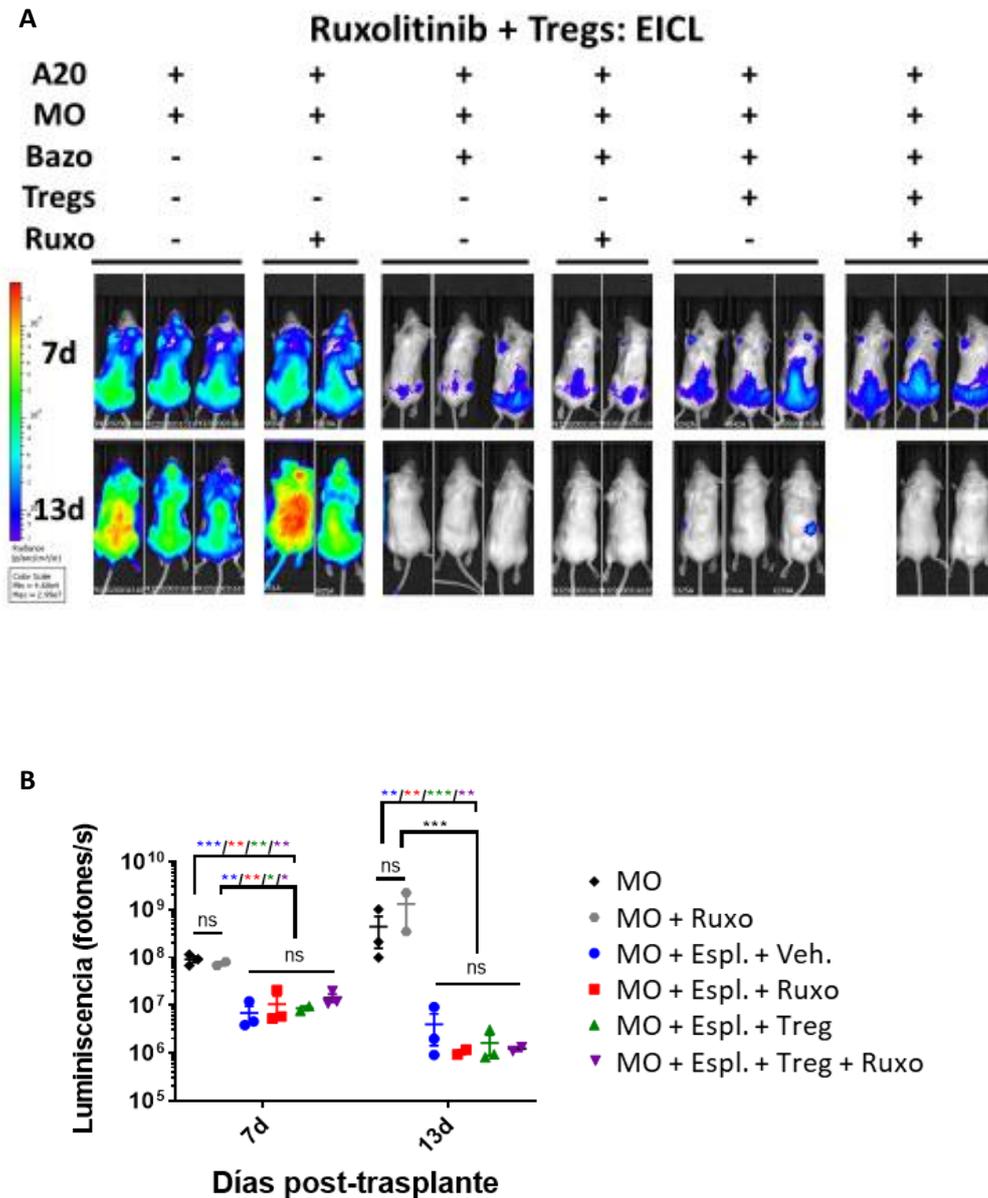
**Figura 5.15.** (A) Representación de la pérdida de peso en los distintos grupos de tratamiento. Se utilizó ANOVA de dos vías para el cálculo de los *p-values*; (B) Representación del *score* de EICH aguda; (C) Representación del *score* de EICH crónica. Valores de *p*: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\* <0,001; \*\*\*\* <0,0001. SEM = Error estándar de la media.



**Figura 5.16.** Citometría de biopsias de médula ósea de ratones infundidos con linfocitos Treg GFP+. Se muestra la tinción con CD25 y GFP dentro de la población CD4+.

### 5.2.2.2 La terapia combinada con ruxolitinib y Treg no afecta al efecto injerto contra leucemia

Algunas publicaciones previas describen que ni el ruxolitinib ni el tratamiento con células Treg interfieren en el EICL<sup>36,77</sup>. En nuestro modelo, también llevamos a cabo esta verificación mediante la infusión de células leucémicas A20 marcadas con luciferasa en ratones BALB/c junto con esplenocitos de donantes C57Bl/6 (Figura 5.17). Como se puede apreciar en la imagen, en aquellos ratones que no recibieron esplenocitos se produjo una proliferación de células tumorales, mientras que en aquellos ratones que sí recibieron esplenocitos no se produjo proliferación de las mismas en todos los grupos de tratamiento.



**Figura 5.17. Modelo murino para estudio del EICL.** (A) Imágenes de bioluminiscencia *in vivo* de ratones BALB/c trasplantados con médula ósea y esplenocitos de donantes C57Bl/6 y células leucémicas A20 que expresan la luciferasa. Las imágenes se obtuvieron los días +7 y +13 después del trasplante; (B) Cuantificación de la bioluminiscencia mostrada en A. Se representa la media y la SEM en escala logarítmica. MO = Médula ósea, Espl. = Esplenocitos, Veh. = Vehículo.

### **5.3 PARTE III: Ensayo clínico con linfocitos Treg y ruxolitinib**

Este ensayo clínico se enmarca dentro del proyecto de investigación TREGeneration, financiado por la Unión Europea del programa Horizonte 2020, que combina siete estudios clínicos paralelos en Europa y Estados Unidos para investigar el efecto de los linfocitos Treg como terapia para la EICH. El consorcio está formado por 8 colaboradores de 6 países europeos y un tercero en Estados Unidos.

#### **5.3.1 Análisis de datos clínicos**

##### **5.3.1.1 Población de análisis incluida**

Se reclutaron 16 pacientes, de los cuáles se infundieron un total de 14. Los pacientes fueron asignados a 3 cohortes de dosis:

- Cohorte 1: se infundieron 3 pacientes, a dosis de  $0,5 \times 10^6$ /kg receptor de Tregs infundidos
- Cohorte 2: se infundieron 5 pacientes, a dosis de  $1 \times 10^6$ /kg receptor de Tregs infundidos
- Cohorte 3: se infundieron 6 pacientes, a dosis de  $2 \times 10^6$ /kg receptor de Tregs infundidos

De los 16 pacientes analizados, la mediana de edad fue de 54 años, con un rango de 35 a 69 años. Las características basales de la población incluida y el nivel de afectación de EICH se muestran en las tablas 5.7.

Por patologías, las enfermedades de base más frecuente fueron la leucemia mieloblástica aguda (31,2%) y el síndrome mielodisplásico (26%). La fuente de progenitores fue la sangre periférica (100%), ya fuera de donante emparentado (50%) o no emparentado (50%). Todos presentaban EICHc refractaria a corticoides y con respuesta subóptima a ruxolitinib. La mediana de líneas previas de tratamiento inmunosupresor fue de 4,5 (2-11).

Características basales	N (%)
Edad	54 (35-69)
Sexo	11 hombres, 5 mujeres
Enfermedad	
Leucemia mieloblástica aguda	5
Leucemia linfoblástica aguda	2
Síndrome mielodisplásico	4
Linfoma de Hodgkin	0
Linfoma no hodgkin	2
Otros	3
Líneas previas de tratamiento	Mediana = 4,5 (2-11)
1	0
2	3
3	4
4	1
≥5	8
Tipo de donante	
Emparentado	8
No emparentado	8
Fuente de progenitores	
Sangre periférica	16
Gradación EICHc previo a la infusión	
Moderado	6
Severo	9

**Tabla 5.7.** Características basales de la población incluida en el ensayo clínico con ruxolitinib y linfocitos Tregs.

### **5.3.1.2 La aféresis de linfocitos del donante fue segura**

En todos los casos la aféresis de linfocitos se realizó mediante una única aféresis, previa firma del consentimiento informado del donante. En todos los casos se explicó el carácter investigacional y voluntario del ensayo clínico. No se notificó ninguna incidencia relacionada con la donación en los donantes. En total se llevaron a cabo 15 procedimientos de aféresis para recolección de linfocitos de sangre periférica.

### **5.3.1.3 La selección celular de linfocitos Treg no expandidos fue posible**

Dos pacientes fueron reclutados pero finalmente excluidos del ensayo. Las causas fueron falta de disponibilidad del donante en un caso durante el período de pandemia COVID; y el exceso de contaminación de células CD8+ en el producto elaborado en el otro caso. Es de resaltar que el procesamiento de este último caso se realizó en condiciones subóptimas, esto es, el producto de aféresis llegó a nuestro centro tras más de 48 horas de viaje y presentaba agregados celulares de difícil eliminación. Además, aunque este parámetro no estaba considerado como criterio de liberación *per se*, finalmente se optó por no infundir a criterio del investigador principal del estudio tras consulta previa. Los criterios de liberación del producto fueron los mismos para todos los productos celulares elaborados, consistente en la presencia de:  $\geq 70\%$  de viabilidad celular, tinción de Gram/endotoxina negativa,  $\geq 70\%$  de células CD4+ CD25+ y  $\geq 50\%$  de células CD4+ CD25+ CD127-/dim en el producto. De esta forma, la elaboración del producto celular fue posible finalmente en 14 de 16 pacientes.

La dosis celular diana de cada cohorte se consiguió en 9 de 14 pacientes. De los 5 que no alcanzaron estrictamente la dosis completa, 3 se aproximaron con una variación máxima del 10%, y los otros 2 consiguieron una dosis en torno al 50% de la dosis objetivo. Por este motivo los dos últimos pacientes fueron reasignados a la cohorte inmediatamente inferior para su análisis.

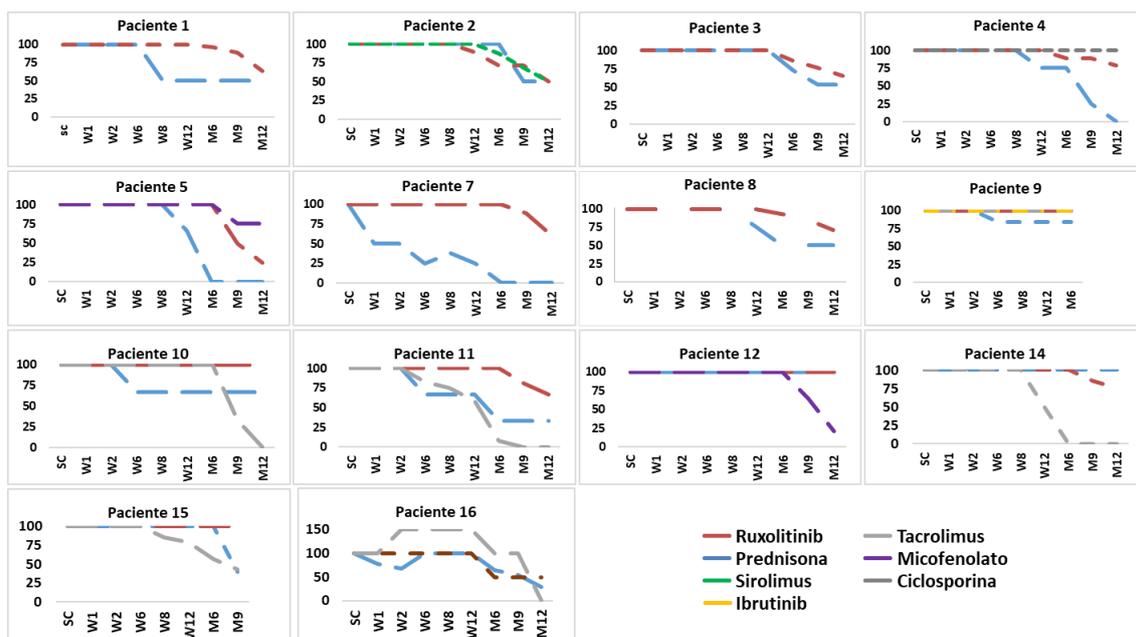
Las características de los productos obtenidos se describen en la siguiente tabla (Tabla 5.8):

	Dosis Treg/kg asignada	Dosis Treg/kg infundida	Alcanza dosis diana	Pureza Treg	Dosis total CD8+	Dosis total CD20+
SAS_CHR_P01	0,50x10 <sup>06</sup>	0,50x10 <sup>06</sup>	Si	50,80 %	1,10x10 <sup>04</sup>	5,50x10 <sup>03</sup>
SAS_CHR_P02	0,50x10 <sup>06</sup>	0,50x10 <sup>06</sup>	Si	85,91 %	1,30x10 <sup>04</sup>	5,20x10 <sup>03</sup>
SAS_CHR_P03	0,50x10 <sup>06</sup>	0,50x10 <sup>06</sup>	Si	58,70 %	2,60x10 <sup>04</sup>	1,56x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P04	1,00x10 <sup>06</sup>	1,00x10 <sup>06</sup>	Si	76,27 %	2,80x10 <sup>04</sup>	2,80x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P05	1,00x10 <sup>06</sup>	0,90 x10 <sup>06</sup>	Si	61,68 %	7,00x10 <sup>04</sup>	4,90x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P07	1,00x10 <sup>06</sup>	1,00x10 <sup>06</sup>	Si	91,66 %	1,72x10 <sup>05</sup>	0
SAS_CHR_P08	2,00x10 <sup>06</sup>	2,00x10 <sup>06</sup>	Si	65,50 %	2,27x10 <sup>05</sup>	0
SAS_CHR_P09	2,00x10 <sup>06</sup>	2,00x10 <sup>06</sup>	Si	75,79 %	1,00 <sup>06</sup> x10 <sup>05</sup>	0
SAS_CHR_P10	2,00x10 <sup>06</sup>	2,00x10 <sup>06</sup>	Si	69,54 %	0	7,00x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P11	2,00x10 <sup>06</sup>	2,00x10 <sup>06</sup>	Si	78,10 %	0	4,63x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P12	2,00x10 <sup>06</sup>	1,33x10 <sup>06</sup>	No	77,38 %	2,00x10 <sup>05</sup>	6,00x10 <sup>03</sup>
SAS_CHR_P14	2,00x10 <sup>06</sup>	0,84x10 <sup>06</sup>	No	78,20%	4,00x10 <sup>03</sup>	3,10x10 <sup>04</sup>
SAS_CHR_P15	2,00x10 <sup>06</sup>	1,90x10 <sup>06</sup>	Si	80,30%	1,00x10 <sup>06</sup>	0
SAS_CHR_P16	2,00x10 <sup>06</sup>	1,80x10 <sup>06</sup>	Si	72,10%	1,4x10 <sup>06</sup>	0

**Tabla 5.8. Características de los productos elaborados.** Como se aprecia en la tabla, la pureza fue >50%. Se cumplieron los criterios de liberación en todos productos elaborados. Sólo un producto no fue infundido por exceso de contaminación de CD8+ (no mostrado).

#### 5.3.1.4 La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg permitió disminuir el tratamiento inmunosupresor

De los 14 pacientes evaluables, se consiguió reducir la inmunosupresión en todos. En 12 de 14 pacientes se redujeron los corticoides, si bien la desescalada de inmunosupresión no se realizó con un solo fármaco, sino que se pudo reducir de forma paralela junto con otros fármacos inmunosupresores a lo largo de todo el periodo de estudio (Figura 5.18). Es importante mencionar que todos los pacientes estaban recibiendo una mediana de 3 fármacos de forma concomitante (rango 2-4), entre los que se incluyeron: ruxolitinib, corticoides, sirolimus, tacrolimus, ciclosporina e ibrutinib. Esto supuso todo un desafío al tratarse de una cohorte de pacientes muy tratados y severamente afectados por la EICHc.



**Figura 5.18.** Descenso de inmunosupresión en la población analizada. SC = *Screening*; W = Semana; M = Mes.

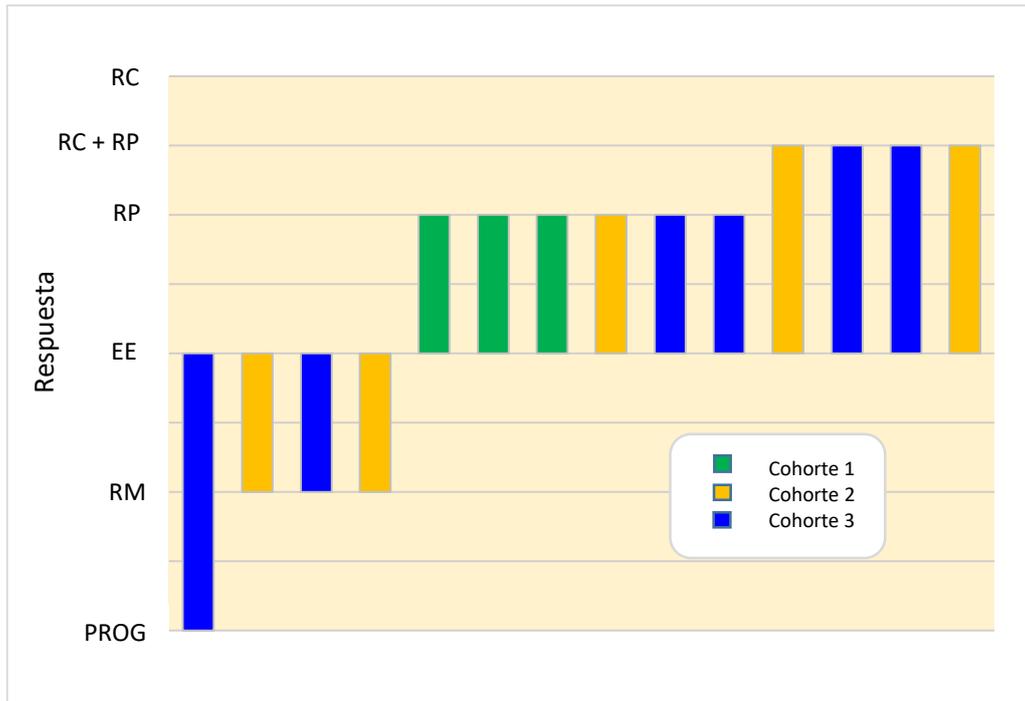
### 5.3.1.5 Respuesta de la EICHc a la terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg

Se analizó la respuesta global y por órganos desde el momento basal hasta el último seguimiento de cada paciente (Figura 5.19 y 5.20).

En cuanto a las respuestas globales alcanzadas, se encontraron respuestas parciales en 10 de 14 pacientes (71,4%), dentro de los cuáles encontramos 4 pacientes (40%) en los que se había obtenido remisión completa en algún órgano; 3 de 14 pacientes (21,4%) presentaron respuestas mixtas y sólo 1 paciente progresó (7,1%). El paciente que progresó lo hizo a los 9 meses del tratamiento por lo que salió del estudio y se inició una nueva línea de tratamiento. El tiempo medio desde la infusión a la máxima respuesta fue de 6 meses con mejorías progresivas a lo largo de todo el año de seguimiento.

Id	Estado basal									Último seguimiento									Visita	Resp.
	Piel	Esclerodermia	Articulaciones	Oral	Ojos	Gastrointestinal	Hígado	Genital	Pulmón	Piel	Esclerodermia	Articulaciones	Oral	Ojos	Gastrointestinal	Hígado	Genital	Pulmón		
1	3	2	1	0	2	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	M12	RP
2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	3	M12	PR
3	2	3	2	0	2	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	M12	RP
4	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	2	M12	RP
5	3	3	1	1	2	0	0	0	0	2	3	1	0	3	0	0	0	0	M12	RM
7	1	3	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	M12	RP+ RC
8	2	3	3	2	1	0	0	0	0	1	3	2	1	1	0	0	0	0	M12	RP
9	3	3	1	3	3	0	0	0	0	3	3	1	1	3	0	0	0	2	M6	RM
10	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	M12	RP+ RC
11	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	M12	RP+ RC
12	2	3	2	1	2	0	0	0	0	2	3	1	0	2	0	0	0	0	M12	RP+ RC
14	2	2	2	0	2	3	0	0	0	2	3	2	0	2	2	0	0	0	M12	RM
15	2	2	3	1	1	0	0	0	2	2	3	3	1	1	1	0	0	2	M9	P
16	3	3	3	0	2	0	0	0	3	2	1	0	1	1	0	0	0	1	M12	RP

**Figura 5.19.** Puntuación NIH a 1 año de seguimiento en los distintos órganos diana desde el momento basal hasta la última fecha de seguimiento y respuesta global Resp. = Respuesta, RC = remisión completa, RP = respuesta parcial, RM = respuesta mixta, P = progresión.



**Figura 5.20.** *Waterfall plot* que muestra las respuestas obtenidas. RC = Respuesta completa; RP = Respuesta parcial; EE = Enfermedad estable; RM = Respuesta mixta; Prog = Progresión.

En cuanto a la afectación por órganos, la afectación en piel, la esclerodermia, la afectación articular y ocular fueron los órganos más frecuentemente afectados (Tabla 5.9).

EICH crónica (n =14)	N (%)
Gradación NIH	
Leve	0 (0)
Moderada	6 (42,8)
Severa	9 (64,2)
Órganos afectados	
Piel	12/14 (85,7)
Esclerodermia	12/14 (85,7)
Afectación en la movilidad articular	12/14 (85,7)
Ocular	12/14 (85,7)
Oral	6/14 (42,8)
Pulmón	4/14 (28,5)
Tracto digestivo	1/14 (7,14)
Hígado	0/14 (0)
Genital	0/14 (0)

**Tabla 5.9.** Nivel de afectación de los pacientes previo a la infusión de células Tregs.

Las respuestas por órganos fueron las siguientes (Tabla 5.10): 12 de 14 pacientes presentaban afectación en piel con mejorías de la gradación NIH en 7 de 12 pacientes (58,3%) al final del seguimiento; 12 de 14 pacientes presentaban esclerodermia de los cuales mejoraron 4 de estos 12 (33,3%); 12 de 14 pacientes presentaban afectación articular observando mejorías en 5 de ellos (41%); 6 de 14 pacientes presentaban afectación oral presentando mejoría 5 pacientes (83%); 12 de 14 pacientes presentaban afectación ocular observando mejorías en 3 de los 12 (25%), mientras que 2 pacientes empeoraron la sintomatología a dicho nivel; 1 de 14 pacientes presentaba afectación en el tracto gastrointestinal, el cual presentó mejoría al año de seguimiento, y otro paciente progresó en la sintomatología a este nivel; 4 de 14 pacientes presentaban afectación pulmonar de los cuáles dos de ellos mejoraron la gradación NIH (50%), el resto se mantuvo en la misma respuesta.

<b>EICH crónica (n = 14)</b>	<b>Respuestas globales (%)</b>	<b>Respuestas completas (%)</b>
Respuesta global	10/14 (71,4)	4/14 (28,5)
Respuesta global por grados		
Moderado	6/6 (100)	4/6 (66,6)
Severo	4/8 (50)	0/8 (0)
Respuesta global por órganos		
Piel	7/12 (58,3)	1/12 (8,3)
Esclerodermia	4/12 (33,3)	2/12 (16,6)
Afectación en la movilidad articular	5/12 (41)	1/12 (8,3)
Oral	5/6 (83,3)	3/6 (50)
Ocular	3/12 (25)	0/12 (0)
Tracto digestivo	1/1 (100)	0/1 (0)
Pulmón	2/4 (50)	0/0 (0)
Hígado	0/0 (0)	0/0 (0)
Genital	0/0 (0)	0/0 (0)

**Tabla 5.10.** Respuesta a la infusión de Tregs entre los pacientes con EICH crónica.

Hubo un paciente que presentó un deterioro en la capacidad pulmonar coincidiendo días después con un ingreso hospitalario por un proceso neumónico, por lo que se entendió disminuida en contexto del proceso infeccioso y no fue contabilizado como empeoramiento a nivel pulmonar (paciente 9).

Se realizó un análisis por subgrupos para identificar factores predictores de respuesta. No hubo diferencias significativas en términos de respuesta en relación con los tratamientos concomitantes ( $p = 0,16$ ), líneas de tratamiento previas ( $p = 0,38$ ) o la dosis recibida ( $p = 0,88$ ). Sí que hubo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta en cuanto al grado de EICH crónica previo a la infusión ( $p = 0,005$ ), encontrando respuestas mejores en aquellos pacientes con EICHc moderada con respecto a los que presentaban EICHc severa.

También se evaluó la respuesta en la movilidad articular por medio de la escala JOINT/PROM. De los 14 pacientes evaluables, 12 presentaban afectación de la movilidad articular; de ellos, 9 obtuvieron algún tipo de respuesta al tratamiento, y 3 empeoraron (Figura 5.21). Es de destacar que aquellos pacientes que respondieron lo hicieron de forma notable con cambios de más de 2 puntos en el PROM (rango 2-8 puntos). De los que empeoraron, 2 lo hicieron únicamente en 1 punto, por lo que no se tradujo en un cambio en el *score* NIH global en relación a la afectación articular<sup>103</sup>.

ID	Estado basal						Último seguimiento						Visita	Cambios PROM
	Hombro	Codo	Muñeca	Tobillo	Score	PROM	Hombro	Codo	Muñeca	Tobillo	Score	PROM		
1	7	7	5	3	1	22	7	7	6	4	1	24	M12	+2
2	7	7	7	4	0	25	7	7	7	4	0	25	M12	0
3	6	5	7	3	2	21	7	7	7	3	1	24	M12	+3
4	7	7	7	4	0	25	7	7	7	4	0	25	M12	0
5	7	7	7	3	1	24	6	7	6	4	1	23	M12	-1
7	7	7	6	3	1	23	7	7	7	4	0	25	M12	+2
8	6	5	2	3	3	16	6	6	4	4	2	20	M12	+4
9	6	5	3	2	1	16	7	7	7	3	1	24	M6	+8
10	7	7	4	3	1	21	7	7	5	4	1	23	M12	+2
11	6	6	4	3	1	19	7	7	7	4	1	25	M12	+6
12	5	7	6	4	2	22	6	7	7	4	1	24	M12	+2
14	4	5	2	4	2	15	6	5	4	2	2	16	M12	+2
15	3	3	1	2	3	9	2	3	1	2	3	8	M9	-1
16	7	7	6	2	3	22	5	6	6	3	1	20	M12	-2

**Figura 5.21.** Escala JOINT/ROM a 1 año de seguimiento.

### 5.3.1.6 La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg produjo una mejora en la sintomatología de la EICHc

Se realizó también un cuestionario sobre calidad de vida para determinar la mejoría o empeoramiento subjetivo con el tratamiento. Para ello se utilizó la Escala de Lee: 9 de 14 pacientes notificaron mejoría en la sintomatología subjetiva, 2 de 14 pacientes no reportaron cambios y 3 de 14 pacientes refirieron empeoramiento subjetivo (figura 5.22).

Entre los pacientes que empeoraron su *score* subjetivo, destacamos que uno notificó empeoramiento a nivel ocular y otro notificó empeoramiento tras notificársele la presencia de enfermedad mínima residual.

ID	Estado basal							Último seguimiento							Visita	Cambio
	Ojos secos	Necesidad de gotas	Dolores articulares	Calambres	Dificultad al ejercicio	Disfagia a sólidos	Ansiedad	Ojos secos	Necesidad de gotas	Dolores articulares	Calambres	Dificultad al ejercicio	Disfagia a sólidos	Ansiedad		
1	2	3	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	M12	-3
2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	M12	0
3	4	4	4	3	3	3	2	3	3	3	2	3	2	2	M12	-5
4	3	3	0	0	3	0	0	3	3	0	0	1	0	0	M12	-2
5	4	4	2	3	4	0	1	4	4	4	2	3	0	0	M12	-1
7	1	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	M12	+1
8	3	3	2	2	0	0	3	3	3	1	3	0	0	3	M12	0
9	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	M6	-3
10	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	M12	-1
11	1	1	1	1	0	0	0	2	2	3	3	0	0	0	M12	+6*
12	3	3	2	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	0	M12	-1
14	3	4	2	2	1	3	2	3	2	3	2	2	2	0	M12	-4
15	4	4	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	0	M9	-7
16	2	2	3	3	3	0	2	3	2	3	3	3	0	2	M12	+1

**Figura 5.22. Puntuación en la escala subjetiva de síntomas.** (\*) Cuando se realizó el cuestionario el paciente presentaba enfermedad mínima residual positiva en sangre.

### 5.3.1.7 La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg fue segura con un perfil de toxicidad aceptable

No se alcanzó toxicidad limitante de dosis. Tras un año de seguimiento, los eventos adversos fueron mayoritariamente de grados 1 y 2. En cuanto a eventos adversos  $\geq 3$ , un paciente presentó una necrosis avascular en contexto de altas dosis de corticoides, y 3 pacientes presentaron procesos infecciosos, en un intervalo de tiempo de más de 4 meses desde la infusión. En la siguiente tabla se exponen los eventos adversos descritos durante el seguimiento (Tabla 5.11).

<b>N° de paciente</b>	<b>Grado &lt;=2</b>	<b>Grado &gt;= 3</b>
SAS_CHR_P01	Enteritis por C. Jejuni (W2) Rinorrea (W3) Diarrea (W3) Fiebre (W3)	-
SAS_CHR_P02	Dolor abdominal (W12)	-
SAS_CHR_P03	Astenia (W3) Diarrea (W2) Vómitos (W4) Náuseas (W8) Gastritis crónica superficial(W8) Gonalgia (W12) Disfagia (M9) Sequedad genital (M9)	-
SAS_CHR_P04	Sintomas gripales (W4) Infección respiratoria (W12) Muguet oral(M6)	-
SAS_CHR_P05	Dolor difuso musculoesquelético (W4) Calambres en piernas (W6) Edemas (M9) Parestesia g1 (M9) Disnea moderada(M12)	Necrosis avascular (W12)
SAS_CHR_P07	Tirantez muscular (W6) Rinorrea (M6) Infección respiratoria tracto superior (W12)	-
SAS_CHR_P08	Calambres (W2)	-
SAS_CHR_P09	Rinorrea (W4) Diarrea (W12)	Shock séptico (M6) Muerte
SAS_CHR_P10	Pérdida de audición (W4)	-
SAS_CHR_P11	Fiebre (M6) Infección respiratoria(M6)	-

**Tabla 5.11.** Eventos adversos. W = Semana; M = Mes; MS = Miembro superior.

Nº de paciente	Grado <=2	Grado >= 3
SAS_CHR_P12	Calambres (W2) Fiebre (M3) Infección respiratoria (M3)	Neumonía (M5) Artritis séptica (M6)
SAS_CHR_P14	Tos (M3) Fiebre (M3) Vómitos (M9) Náuseas (M9) Sinusitis (M12)	Neumonía (M4) Neumonía (M11) Shock séptico (M11) Trombosis MS (M11)
SAS_CHR_P15	Calambres (W2)	-
SAS_CHR_P16	Calambres (W2) Calambres (W8) Diarrea (M12)	-

**Tabla 5.11 (Continuación).** Eventos adversos. W = Semana; M = Mes; MS = Miembro superior.

### 5.3.1.8 La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg no provocó ningún detrimento en la supervivencia ni el efecto injerto contra leucemia

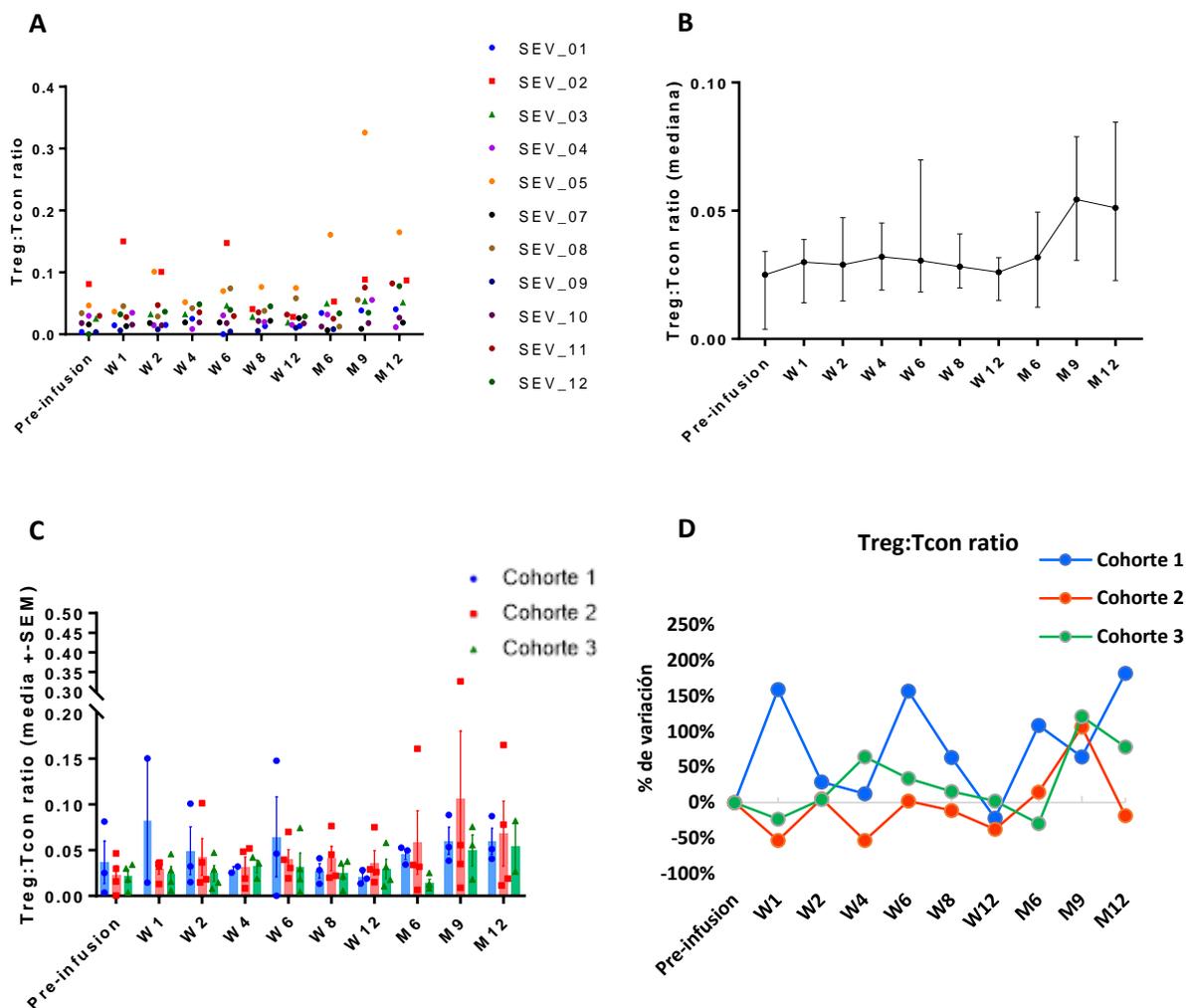
La población analizada se siguió durante un período de 12 meses o hasta progresión o muerte. En concreto, hubo un paciente que falleció a los 6 meses por un proceso infeccioso y otro que se retiró del estudio por progresión de la EICHc a los 9 meses post-infusión. Ningún paciente experimentó recaída de la enfermedad hematológica de base. La supervivencia global de la serie fue del 92,8% y la mediana de seguimiento de 52 semanas (rango 24-52).

## 5.3.2 Análisis de datos biológicos

### 5.3.2.1 La terapia combinada con infusión de linfocitos Treg y ruxolitinib favorece el ratio Treg:Tcon *in vivo* a lo largo del tiempo

Evaluamos el efecto de la infusión única de linfocitos Treg y del tratamiento concomitante del inhibidor de JAK 1/2, ruxolitinib, *in vivo* en la población tratada en las semanas 1, 2, 4, 6, 8 y 12 y en los meses 6, 9 y 12.

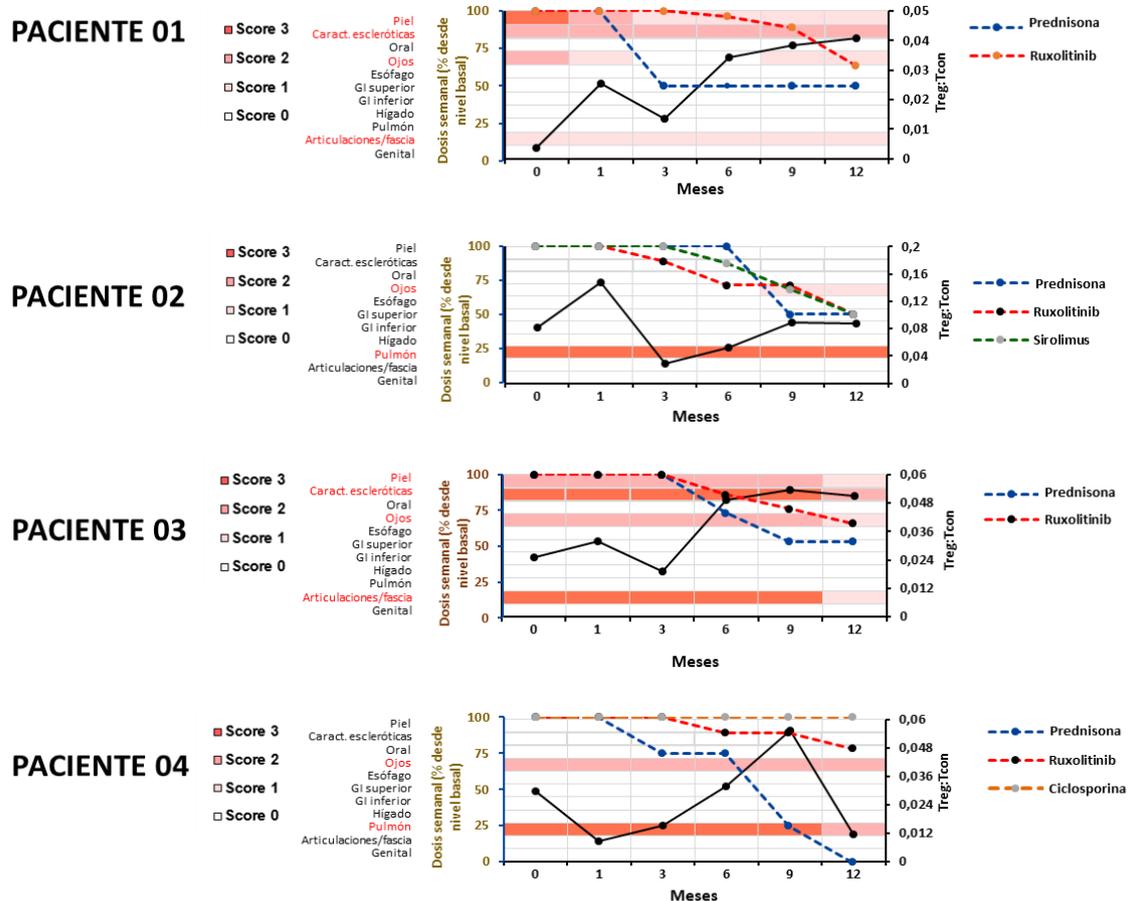
De forma global, de 11 pacientes analizados, encontramos que el ratio Treg:Tcon fue incrementándose a lo largo del tiempo ( $p = 0,03$ ) (Figura 5.23 A y B). Además analizamos la evolución del ratio Treg:Tcon por cohortes, observando esta misma tendencia, aunque el análisis por cohortes no fue significativo ( $p = 0,38$ ,  $p = 0,31$ ,  $p = 0,058$  para las cohortes 1, 2 y 3 respectivamente) (Figura 5.23 C y D).



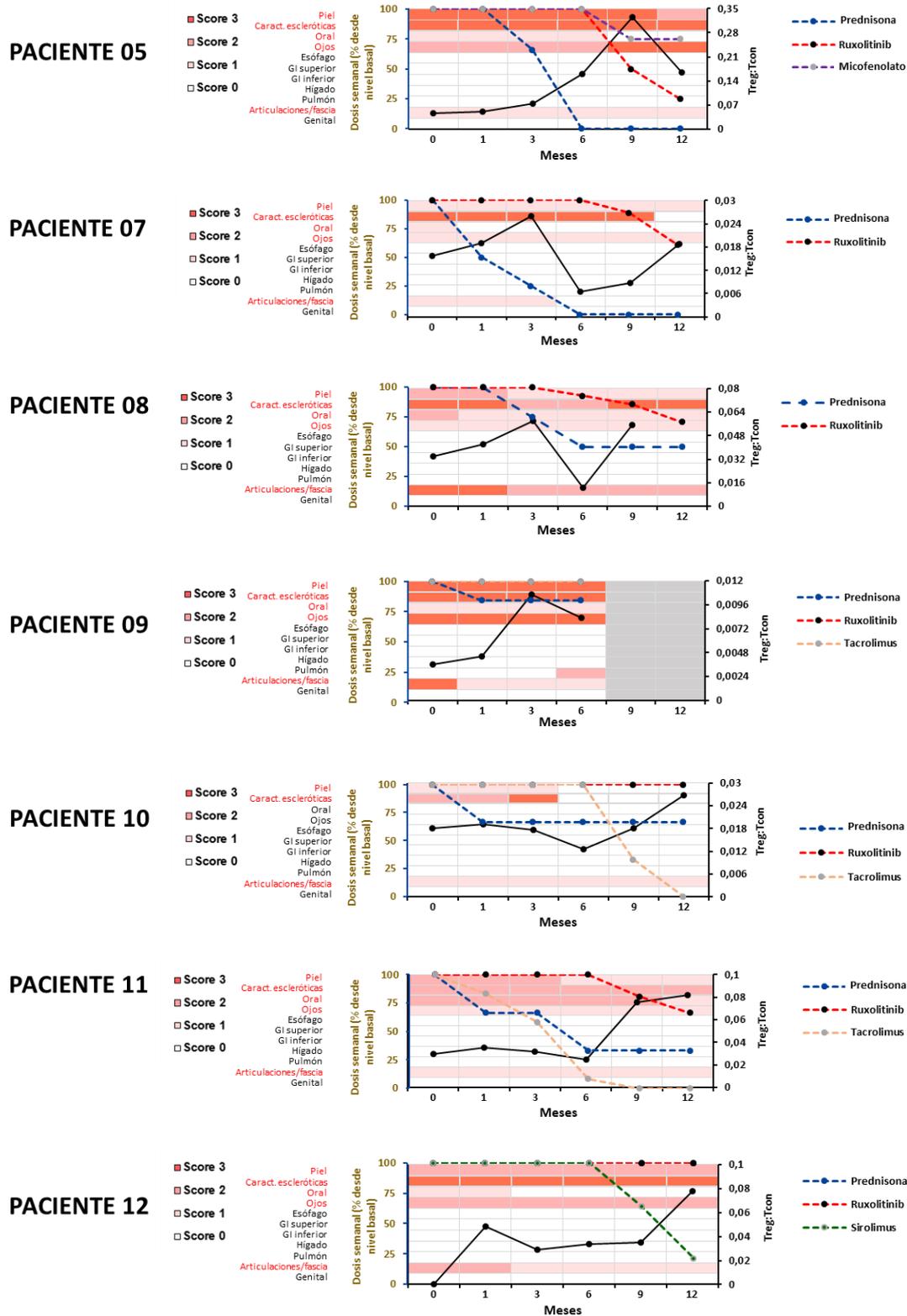
**Figura 5.23.** (A) Gráfico que muestra el ratio Treg:Tcon de los 11 pacientes analizados desde la situación basal a los 12 meses post-infusión; (B) Se representa la mediana del ratio Treg:Tcon de la población analizada; (C) Gráfico de barras que muestra la evolución del ratio Treg:Tcon a lo largo del seguimiento diferenciado por cohortes: 1 (Dosis Treg  $0,5 \times 10^6/\text{Kg}$ ), 2 (Dosis Treg  $1 \times 10^6/\text{kg}$ ) y 3 (Dosis Treg  $2 \times 10^6/\text{Kg}$ ); (D) Se muestra la evolución del ratio Treg:Tcon en porcentaje y por cohortes desde la situación basal a los 12 meses post-infusión. W = semana; M = Mes, SEM = Error estándar de la media.

Coincidiendo por tanto con nuestro modelo *in vitro*, observamos que el ruxolitinib tampoco inhibe la capacidad de proliferación de los linfocitos Treg *in vivo*, aún a pesar de las altas dosis de tratamiento inmunosupresor y diferentes agentes empleados bajo el que se encontraba la población analizada.

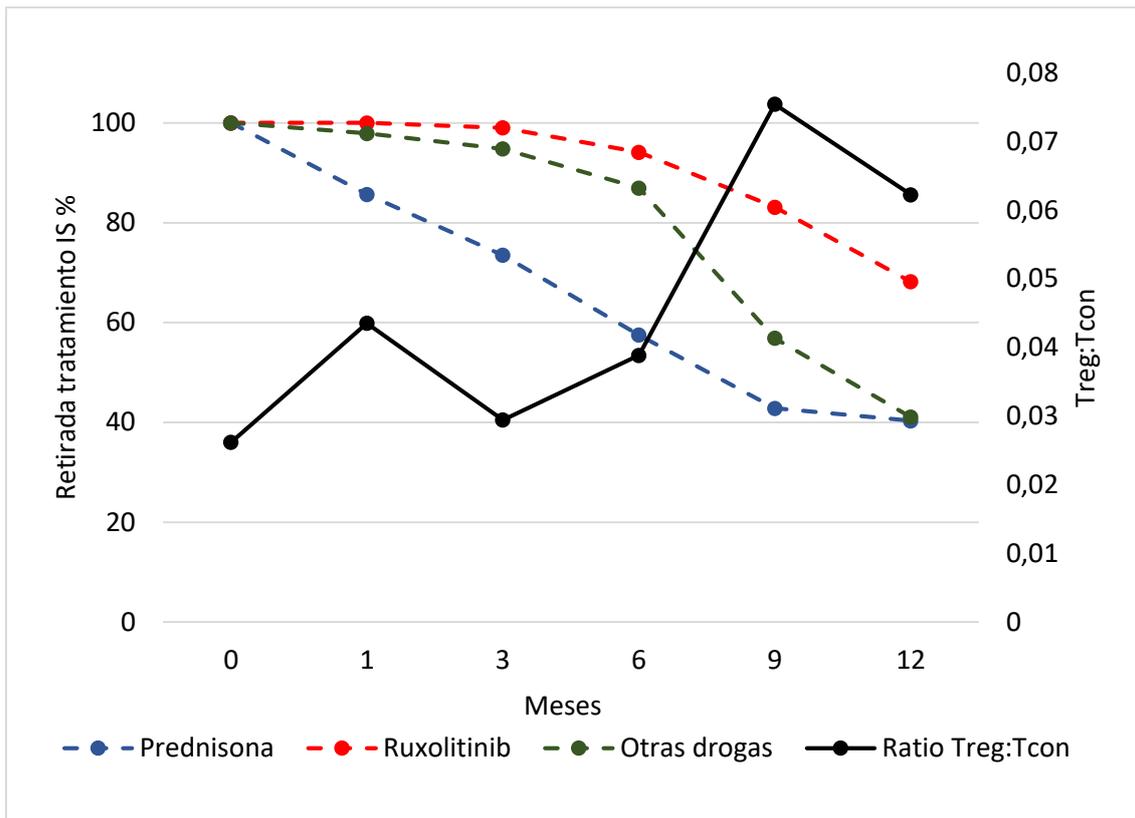
Profundizando en el análisis, este aumento progresivo del ratio Treg:Tcon también coincidió con el aumento progresivo de las respuestas en el tiempo observadas en la población analizada y con el descenso de corticoides y resto de medicación inmunosupresora concomitante; si bien con el número de pacientes incluidos únicamente se puede hablar de tendencias (Figuras 5.24 y 5.25).



**Figura 5.24.** Evolución del ratio Treg:Tcon, descenso de inmunosupresión y cambios en la gradación EICH en la población analizada. Línea en negro = ratio Treg:Tcon; líneas discontinuas = inmunosupresores; fondo coloreado = cambios en la gradación EICH.



**Figura 5.24. (Continuación).** Evolución del ratio Treg:Tcon, descenso de inmunosupresión y cambios en la gradación EICH en la población analizada. Línea en negro = ratio Treg:Tcon; líneas discontinuas = inmunosupresores; fondo coloreado = cambios en la gradación EICH.



**Figura 5.25. Evolución del ratio Treg:Tcon y el porcentaje de tratamiento inmunosupresor con respecto al inicial.** Se representa la media de los 11 pacientes tratados de forma conjunta. Línea en negro = ratio Treg:Tcon; líneas discontinuas = inmunosupresores (IS).

Nuestros datos sugieren una coincidencia temporal entre el aumento del ratio Treg:Tcon y la mejora en las manifestaciones de la EICHc en la población analizada. El hecho de que el descenso de los corticoides coincida también con el aumento de dicho ratio, alienta a la disminución de dicho fármaco en primer lugar al mismo tiempo que disminuye la conocida toxicidad del mismo a largo plazo.

### 5.3.2.2 No se observaron cambios significativos en las poblaciones de linfocitos Treg ni en otros subtipos de estas

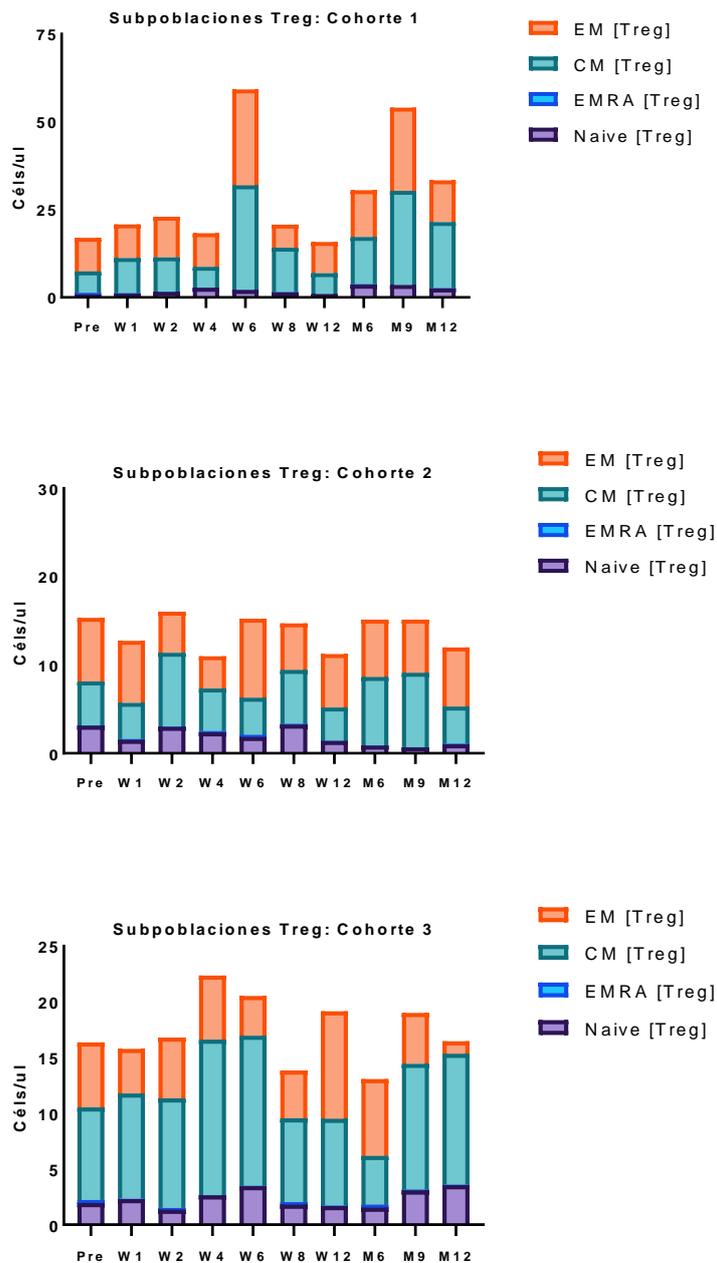
Se realizó un seguimiento mediante inmunofenotipo de las células Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup>). Cuando estudiamos los recuentos de linfocitos Treg, no observamos diferencias significativas en los recuentos absolutos a lo largo del tiempo (Tabla 5.12).

	Pre-infusión	S1	S2	S4	S6	S8	S12	M6	M9	M12
SAS_CHR_P01	3,32	8,77	12,30	18,59	-	7,72	11,04	32,35	44,60	22,24
SAS_CHR_P02	22,00	53,64	37,20	-	73,55	25,58	20,53	32,57	95,86	38,67
SAS_CHR_P03	25,62	-	19,49	18,02	44,92	28,86	15,83	26,67	21,57	39,39
SAS_CHR_P04	14,73	32,79	8,46	5,12	24,34	13,70	11,88	27,37	21,13	5,86
SAS_CHR_P05	9,20	3,95	19,26	6,79	13,66	12,39	7,22	27,73	24,12	21,21
SAS_CHR_P07	37,37	12,94	32,85	29,08	21,32	30,41	23,30	4,07	12,29	11,37
SAS_CHR_P08	19,33	14,09	13,44	25,75	42,97	15,58	16,45	3,53	16,51	-
SAS_CHR_P09	2,77	6,66	17,31	-	2,18	5,56	9,86	15,92	-	-
SAS_CHR_P10	33,36	32,52	11,81	13,59	17,05	16,55	35,66	17,91	14,91	17,42
SAS_CHR_P11	9,99	10,57	24,69	27,76	20,21	17,65	14,66	19,06	25,67	15,53
SAS_CHR_P12	0,02	1,25	3,54	2,94	1,67	2,36	2,52	1,40	3,02	6,77

**Tabla 5.12.** Recuentos de linfocitos Treg. Se muestran los recuentos absolutos de los linfocitos Treg expresado en células/ $\mu$ L a lo largo de todo el seguimiento en los 11 pacientes analizados. Test de medidas repetidas  $p = 0,26$ . S = Semana; M = Mes.

Otro parámetro analizado fueron las distintas subpoblaciones de células Treg. Éstas fueron identificadas en base a su inmunofenotipo como Treg naïve (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>), Treg de memoria central (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>), Treg efectoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup>) y Treg efectoras terminalmente diferenciadas (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup>).

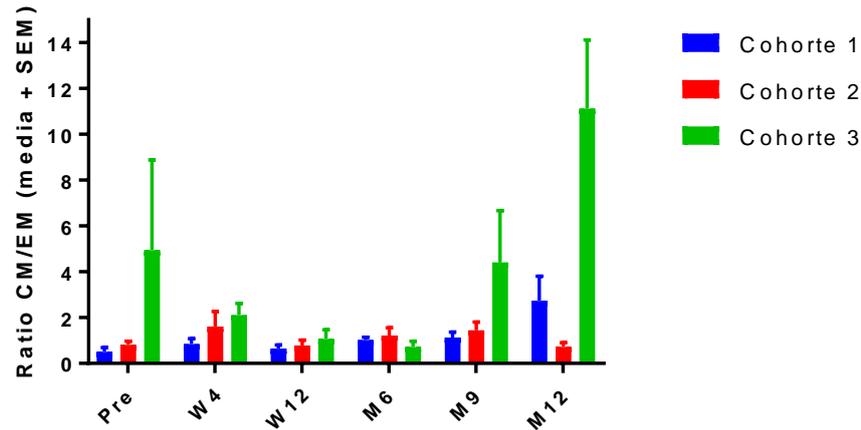
De forma global, no apreciamos diferencias a lo largo del tiempo entre las distintas subpoblaciones dentro de las Treg: naïve, memoria central, efectoras y EMRA (Figura 5.26).



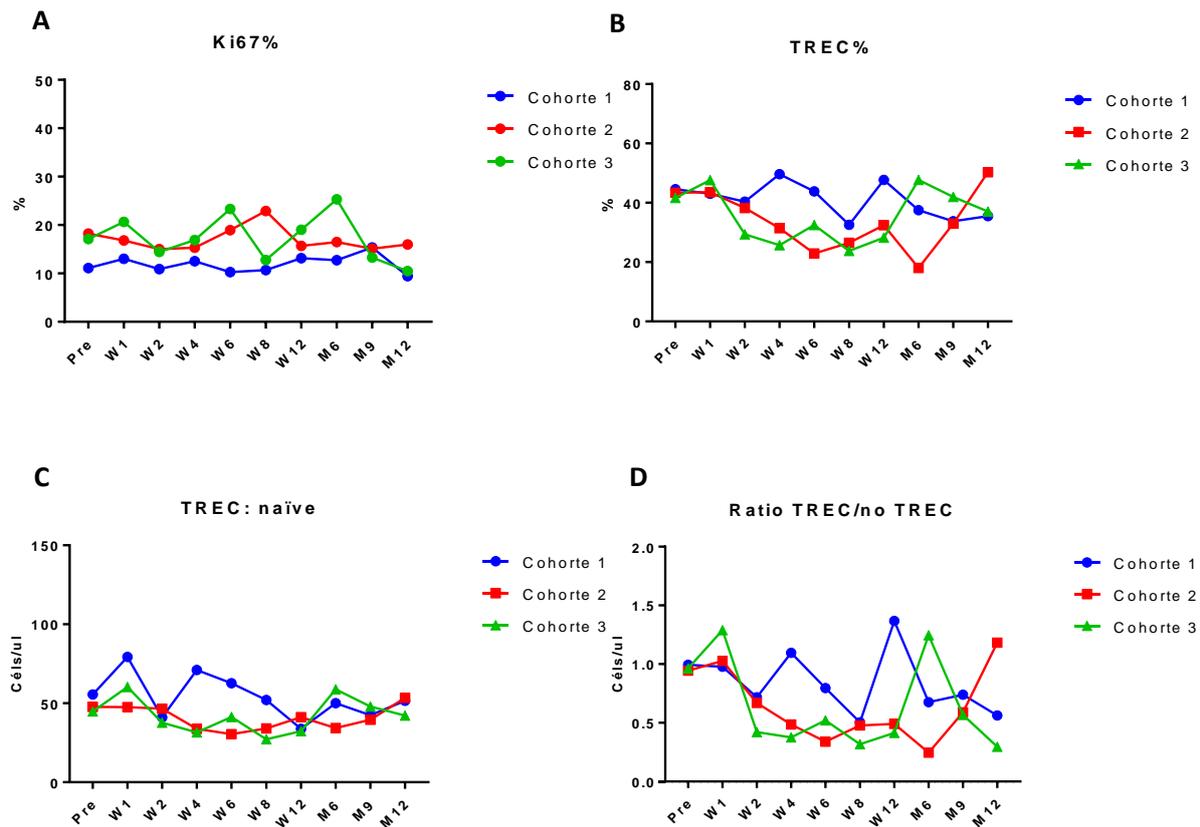
**Figura 5.26.** La figura muestra la distribución de subpoblaciones celulares de Treg en las distintas cohortes. Como se observa en la figura, no se apreciaron diferencias cuantitativas desde la infusión hasta el mes 12 de seguimiento. EM = células efectoras de memoria; CM = células de memoria central; EMRA = células terminalmente diferenciadas. W = Semana; M = Mes.

Tampoco encontramos relación entre el ratio de células efectoras/memoria central a lo largo del análisis y la dosis de células administrada (Figura 5.27).

También analizamos marcadores de proliferación, en concreto el marcador Ki67; así como marcadores de diferenciación tímica o células TREC (CD31+)<sup>104</sup>. Dentro de estas, también analizamos los recuentos de TREC *naïve* y el ratio TREC/células no TREC. Tampoco encontramos diferencias significativas entre las distintas cohortes (Figura 5.28).



**Figura 5.27.** Ratio de células de memoria central/efectoras de memoria. EM = células efectoras de memoria; CM = células de memoria central. Test de medidas repetidas de forma global  $p = 0,247$ ; y por cohortes: 1) Cohorte 1  $p = 0,256$ ; 2) Cohorte 2  $p = 0,44$ ; 3) Cohorte 3  $p = 0,306$ . W = Semana; M = Mes.

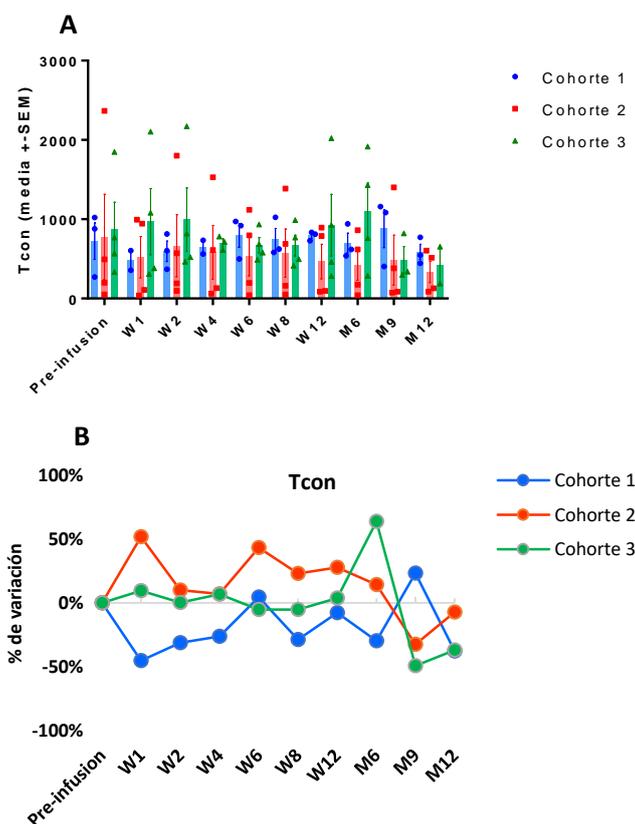


**Figura 5.28.** (A) Cambios en el porcentaje de Ki67 desde el momento de la infusión hasta el mes 12 post-infusión.  $p = 0,69$ ; (B) Cambios en el porcentaje de células TREC desde

el momento de la infusión hasta el mes 12 post-infusión.  $p = 0,43$ ; **(C)** Evolución en los recuentos celulares de las TREC naïve; **(D)** Evolución del ratio de células TREC/células no TREC a lo largo del análisis. W = Semana; M = Mes.

### 5.3.2.3 La terapia combinada con infusión de linfocitos Treg y ruxolitinib no afecta a los recuentos de linfocitos T

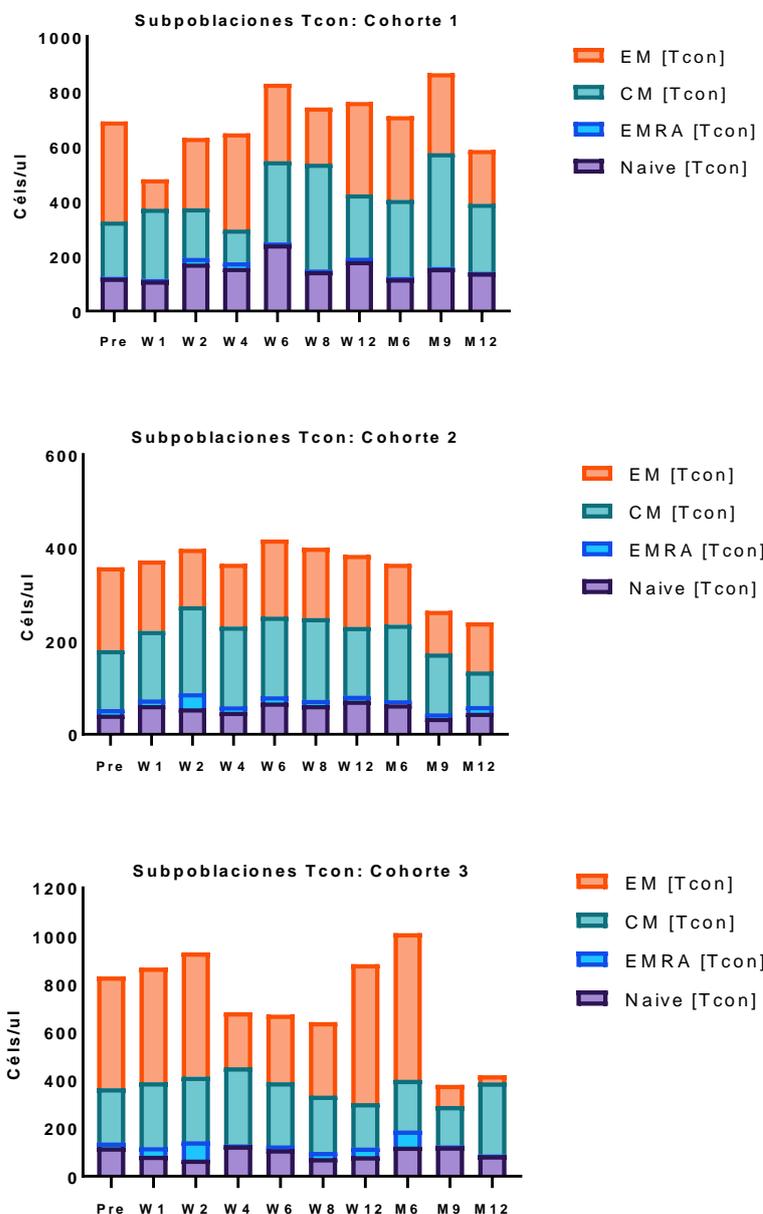
Analizamos los linfocitos T convencionales (Tcon) durante todo el período de seguimiento de los 11 pacientes analizados mediante su inmunofenotipo por citometría de flujo (CD3+ CD4+ CD25- FoxP3-). No encontramos diferencias cuantitativas de forma global ni por cohortes (Figura 5.29).



**Figura 5.29.** (A) Análisis de los linfocitos Tcon por cohortes; (B) Variación en el porcentaje de linfocitos Tcon durante el seguimiento por cohortes. Test de medidas repetidas  $p = 0,65$ ; por cohortes: 1) Cohorte 1:  $p = 0,50$ ; 2) Cohorte 2:  $p = 0,71$ ; 3) Cohorte 3:  $p = 0,68$ . W = Semana; M = Mes.

Dentro de las subpoblaciones de células Tcon analizamos los distintos subtipos. Éstas fueron identificadas en base a su inmunofenotipo como Tcon *naïve* (CD3+ CD4+ CD25- FoxP3- CD62L+ CD45RA+), Tcon de memoria central (CD3+ CD4+ CD25-FoxP3- CD62L+ CD45RA-), Tcon efectoras (CD3+ CD4+ CD25- FoxP3- CD62L- CD45RA-) y Tcon efectoras terminalmente diferenciadas (CD3+ CD4+ CD25-FoxP3- CD62L- CD45RA+).

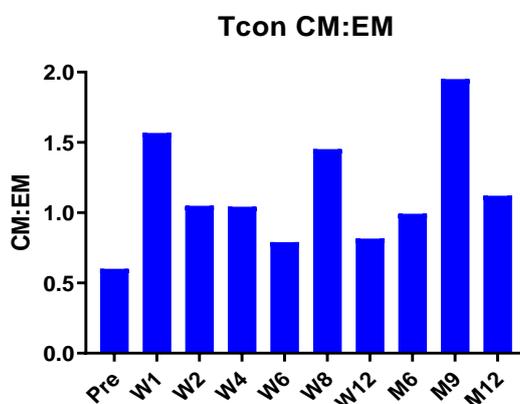
De forma global, no apreciamos diferencias cuantitativas a lo largo del tiempo entre las distintas subpoblaciones dentro de las Tcon (Figura 5.30).



**Figura 5.30.** La figura muestra la distribución de subpoblaciones celulares de Tcon en las distintas cohortes. Como se aprecia en la figura, no se apreciaron diferencias cuantitativas desde la infusión hasta el mes 12 de seguimiento. EM = células efectoras de memoria; CM = células de memoria central; EMRA = células terminalmente diferenciadas.

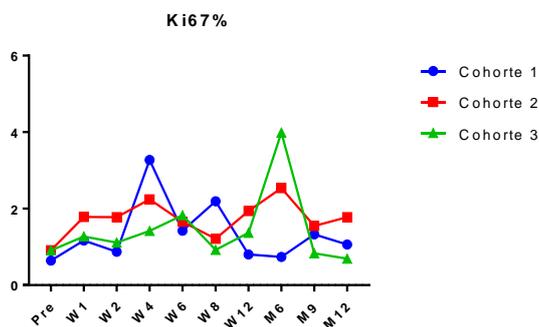
W = Semana; M = Mes.

De manera análoga a las Treg, también analizamos el ratio de células Tcon efectoras/memoria central a lo largo del análisis, sin encontrar diferencias significativas en el período de análisis (Figura 5.31).

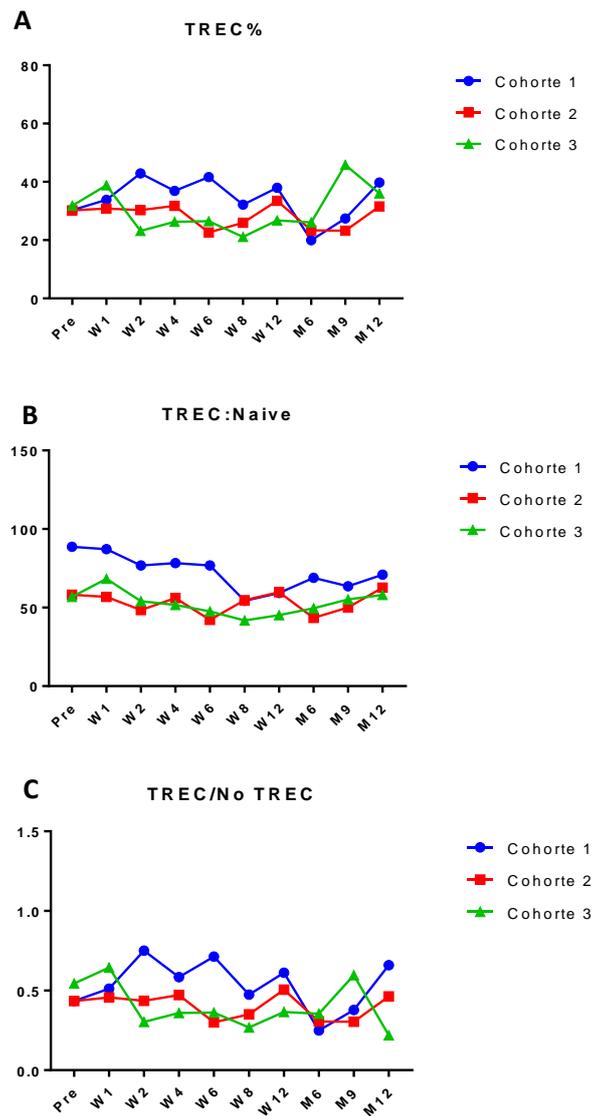


**Figura 5.31. Ratio de células Tcon memoria central/efectoras de memoria.** EM = células efectoras de memoria; CM = células de memoria central. Test de medidas repetidas  $p = 0,51$ . W = Semana; M = Mes.

Tampoco encontramos diferencias significativas al realizar análisis de marcadores de proliferación (Ki67); así como marcadores de diferenciación tímica o células TREC (CD31+). Dentro de estas, también analizamos los recuentos de TREC *naïve* y el ratio TREC/células no TREC (Figuras 5.32 y 5.33).



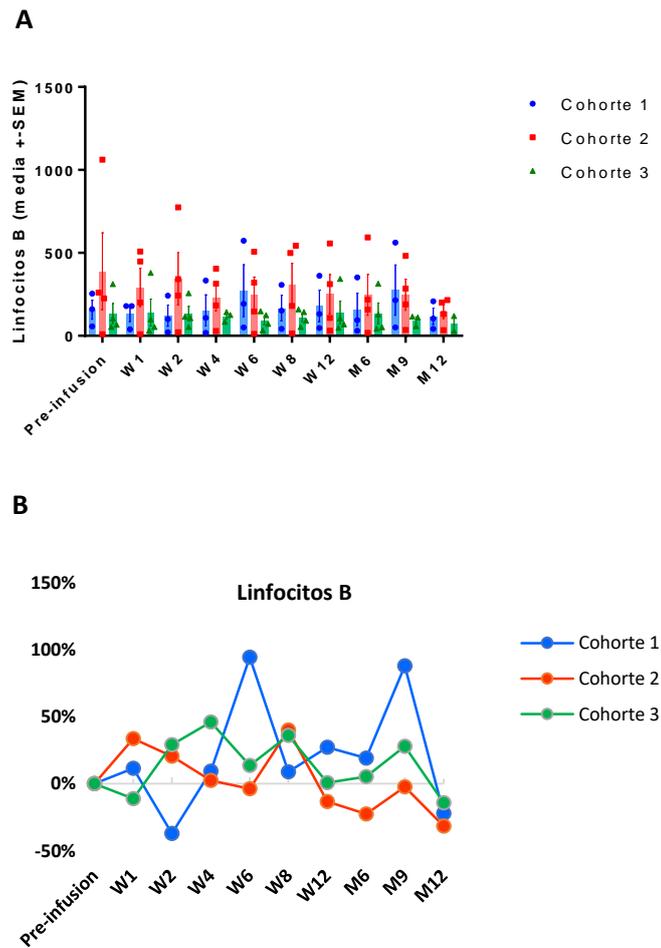
**Figura 5.32. Cambios en el porcentaje de Ki 67.** Se representan los cambios en el porcentaje de Ki67 desde el momento de la infusión hasta el mes 12 post-infusión.  $p = 0,14$ .



**Figura 5.32.** (A) Cambios en el porcentaje de células TREC desde el momento de la infusión hasta el mes 12 post-infusión.  $p = 0,001$ ; (B) Evolución en los recuentos celulares de las TREC *naïve*.  $p = 0,001$ ; (C) Evolución del ratio de células TREC/células no TREC a lo largo del análisis.  $p = 0,14$ . W = Semana; M = Mes.

#### 5.3.2.4 No se observaron cambios significativos en las poblaciones de linfocitos B

Analizamos los linfocitos B convencionales durante todo el período de seguimiento de los 11 pacientes analizados. No encontramos diferencias cuantitativas de forma global ni por cohortes (Figura 5.34).



**Figura 5.34.** (A) Análisis de los linfocitos B por cohortes; (B) Variación en el porcentaje de linfocitos B durante el seguimiento por cohortes. Test de medidas repetidas global  $p = 0,47$ ; y por cohortes: 1) Cohorte 1:  $p = 0,23$ ; Cohorte 2:  $p = 0,69$ ; 3) Cohorte 3:  $p = 0,87$ . W = Semana; M = Mes.



## **DISCUSIÓN**



## 6 Discusión

### 6.1 PARTE I: Estudio retrospectivo con ruxolitinib

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EICH refractaria a corticoides que permitan tratar esta complicación sin perturbar la respuesta inmune postrasplante es una necesidad médica no cubierta. La aproximación terapéutica actual se basa, en términos generales, en el aumento de la inmunosupresión. En base a la implicación de la vía JAK/STAT en la fisiopatología de la EICH dada su naturaleza proinflamatoria, los inhibidores de JAK se han postulado como una terapia innovadora con potencial terapéutico en el tratamiento de la EICH.

La señalización JAK1 y JAK2 puede ser inhibida por ruxolitinib, aprobado inicialmente para el tratamiento de la mielofibrosis<sup>105</sup>. La inhibición de la vía de señalización JAK1/2 no sólo inhibe la proliferación de células T y la activación de células dendríticas, sino que también reduce la migración de los neutrófilos<sup>106</sup>. Su uso ha sido evaluado en varios modelos preclínicos reduciendo de forma significativa la severidad de las manifestaciones de la EICH. Estos hallazgos se asociaron a una reducción significativa de la concentración de citoquinas, una reducción en la infiltración de linfocitos T procedentes del donante en los órganos dañados y una reducción en la proliferación de células T.

Existen otras drogas que también actúan sobre la vía JAK/STAT. Itacitinib es un potente inhibidor selectivo de JAK1 que ha mostrado eficacia en modelos inflamatorios como artritis, o enfermedad inflamatoria intestinal, además de la EICHa<sup>107</sup>. Un estudio preclínico que utilizó el itacitinib en un modelo de ratón humanizado para EICHa mostró una supervivencia superior y una reducción en las manifestaciones de EICH en comparación a un grupo control. Al analizar la frecuencia de células CD4+ y CD8+, éstas fueron inferiores en el grupo que recibía este tratamiento, mientras que el número de células Tregs fue superior<sup>108</sup>. También se ha evaluado el uso de itacitinib en ensayos clínicos de fase 1 (NCT02614612)<sup>109</sup>. La respuesta global reportada a día +28 fue del 70,6% y 75% para pacientes refractarios a corticoides y no refractarios respectivamente. Se describió anemia y trombopenia como los efectos adversos más frecuentes. Sin embargo, aunque el estudio demostró seguridad y eficacia, los resultados estaban limitados por el reducido tamaño muestral y la carencia de grupo control.

Otro inhibidor de la vía JAK, baricitinib, capaz de bloquear JAK1 y JAK2, ha mostrado su eficacia como profilaxis de EICH en un modelo preclínico<sup>110</sup> con resultados prometedores. No obstante, a pesar de estos resultados preclínicos, los ensayos clínicos que evalúan el uso de baricitinib en EICH (NCT02759731) o como profilaxis postrasplante (NCT04131738) apenas acaban de iniciar el reclutamiento de pacientes por lo que los resultados aún no se encuentran disponibles.

Así pues, entre los inhibidores de la vía JAK/STAT disponibles, ruxolitinib parece ser el agente que más ha sido evaluado tanto en modelos preclínicos como en modelos clínicos con resultados muy prometedores. Además, se cuenta con experiencia en su uso en otras patologías hematológicas, como la mielofibrosis.

#### Respuestas en EICH agudo

En nuestro estudio retrospectivo encontramos una tasa de respuestas globales del 69,5% en el caso de la EICH aguda, con una tasa de RC de 21,7%. Es interesante destacar que la respuesta global observada en nuestro estudio en pacientes con afectación del tubo digestivo fue del 67%, por tanto, similar a lo descrito en otros órganos, lo que es especialmente relevante considerando que se trata de un fármaco de administración por vía oral.

A destacar que el 53% de los pacientes habían recibido 3 o más líneas de tratamiento y que el 87% presentaban EICHa grados 3-4. En el momento en el que iniciamos nuestro estudio ya existían datos de otro estudio retrospectivo, del grupo alemán<sup>40</sup>, que había comunicado resultados sobre 95 pacientes con EICH moderada-refractaria a corticoides. Dicho estudio analizó población de pacientes con EICHa y EICHc. Para la EICHa, reportó unas tasas de respuesta global del 81% (44/54) y de RC del 46 % (25/54). El tratamiento permitió la reducción gradual de los corticoides en el 73% (17/23) de los pacientes y la supervivencia global a 6 meses fue del 79%.

En nuestro estudio, la tasa de respuesta global y RC fueron menores, a pesar de que las dos poblaciones de pacientes incluidos no parezcan a priori muy diferentes.

En definitiva, sólo los ensayos prospectivos aleatorizados podrían confirmar o no los resultados de estos estudios retrospectivos, aunque en ambos estudios las tasas de respuestas descritas ya apuntaban a cierto beneficio clínico con respecto a otros enfoques

terapéuticos disponibles<sup>7,26,28</sup>. De esta forma, nuestros datos anticiparon los datos de los estudios REACH1 y 2<sup>32,42,45,111</sup>.

El REACH1 (NCT02953678), fue un ensayo de fase II para el tratamiento de la EICHa refractaria que incluyó un total de 71 pacientes, de los cuáles 48 presentaban EICHa grados III/IV. La respuesta global en el día +28 fue del 54,9%, incluyendo un 26,8% de remisiones completas, y el tiempo hasta observar la respuesta fue de 7 días. La mejor respuesta en cualquier momento desde el inicio del tratamiento se situó en el 73,2%, con unas respuestas completas del 56,3%. En cuanto a la respuesta por órganos, se describieron un 61,1% de respuestas en piel, 45,5% en tracto digestivo superior, 46% en tracto digestivo inferior e hígado 26,7%. La supervivencia global a los 6 y 12 meses fue del 51% y 42,6% respectivamente, siendo menor en aquellos pacientes que presentaron EICHa de grados III/IV que habían recibido tratamiento de larga duración con corticoides previo al uso de ruxolitinib. A día +28, fue posible la reducción de los corticoides en el 55,8% de los pacientes en más de un 50%. Coincidiendo con los efectos adversos observados en los estudios retrospectivos, de nuevo la anemia (64,8%), trombopenia (62%) y neutropenia (47,9%) fueron los más frecuentes. Otros eventos adversos no hematológicos incluyeron la hipokaliemia (49,3%) y el edema periférico (45,1%).

El REACH2 (NCT02913261), es un ensayo fase III randomizado en proporción 1:1 que compara ruxolitinib frente a la mejor terapia disponible, encontrando respuestas globales a día +28 del 62.3% en el grupo de ruxolitinib vs. 39.4% en el grupo control; *odds ratio* 2.64, IC 95% 1,65-4,22,  $p < 0,001$ . El porcentaje de pacientes con remisión completa fue del 34% en el grupo de tratamiento vs. 19% en el grupo control. También la duración de la respuesta a día +56 fue superior en el brazo de ruxolitinib 39,6% vs. 21,9% en el brazo control, *odds ratio* 2.38, IC 95% 1,43-3,94,  $p < 0,001$ , permitiendo el descenso del ruxolitinib en los pacientes respondedores. En base a los resultados de estos dos estudios la FDA aprobó el uso de ruxolitinib en paciente >12 años con EICHa refractaria a corticoides.

### Respuestas en EICH crónico

En nuestro estudio, la respuesta global en estos pacientes fue del 57,1%, con una tasa de RC del 3,5 %. Aunque podría considerarse que la tasa de RC fue baja, es de destacar que nuestro estudio partió de una población severamente afectada, con 50% de pacientes con grado moderado y el 50% restante severo. Y más importante, que dicha población había recibido numerosas líneas de tratamiento previas. De hecho, el 55% habían recibido tres o más líneas o tratamiento previo. Cuando analizamos la respuesta alcanzada por órganos, cabe mencionar que la tasa de respuesta global para los casos de EICHc con afectación cutánea de características escleróticas fue del 56%, muy llamativa teniendo en cuenta las limitadas opciones terapéuticas de estos pacientes<sup>112</sup>. De manera similar también resultó sorprendente la tasa de respuestas observada en los pacientes con afectación pulmonar, con un 61%. Finalmente, en pacientes con EICH digestivo la respuesta global fue del 56%.

En comparación con el estudio de R. Zeiser y col., en el caso de la EICHc, la respuesta global fue del 85% (35/41) y de RC del 7,3% (3/41). También se pudo reducir la dosis de corticoides en el 57,1% (32/56) de los pacientes y la supervivencia global a 6 meses fue del 97%. En nuestro estudio, la tasa de respuesta global y RC para la EICHc fueron menores, no pudiendo atribuirse a diferencias en las características de los pacientes. En consecuencia, las tasas de respuestas fueron importantes en pacientes muy tratados, tanto en nuestro estudio como en el estudio de Zeiser y col.

El REACH3, ensayo clínico de fase III randomizado en proporción 1:1 que evaluó el uso de ruxolitinib frente a la mejor terapia disponible en pacientes con EICHc refractaria, incluyó en el grupo control terapias como ibrutinib y fotoaféreis extracorpórea. La respuesta global medida en la semana 24 fue del 49,7% en el grupo de ruxolitinib vs. 25,6% en el grupo control, consiguiendo unas tasas de RC del 6,7% y 3% respectivamente.

En definitiva, nuestros datos anticiparon los resultados de los ensayos clínicos prospectivos. Por tanto, el ruxolitinib ha demostrado superioridad en el tratamiento de la EICH aguda y crónica, en comparación a las mejores opciones terapéuticas disponibles.

Hay que señalar que el ibrutinib, un inhibidor del BTK, fue aprobado en Estados Unidos y Canadá como segunda línea de tratamiento en la EICHc<sup>113</sup>, si bien las respuestas reportadas son limitadas. Además, su eficacia no ha podido ser demostrada en un ensayo clínico fase III aleatorizado, en el que se asignaron 95 pacientes a la rama ibrutinib/prednisona y 98 a la rama placebo/prednisona al no encontrar diferencias estadísticamente significativas en el *endpoint* primario ( $p = 0,09$ ). Dichos datos fueron comunicados en el congreso virtual de la *European Hematology Association* en junio de 2021.

#### Perfil de seguridad

En nuestro estudio el perfil de seguridad fue aceptable. De la población analizada, el 32.9% (26/79) de pacientes presentó algún tipo de toxicidad, siendo las citopenias los eventos adversos más frecuentes con el 17,7% (14/79). Éstas consistieron fundamentalmente en trombopenia, anemia o combinación de ambas. Dichos eventos adversos fueron corroborados en todos los ensayos REACH. El REACH1 describió como eventos adversos más frecuentes la trombopenia (61%), anemia (61%), y neutropenia (56%), y el REACH3 confirmó también como principales eventos adversos la trombopenia (15,2% vs. 10,1%) y la anemia (12,7% vs. 7,6%) para los grupos de tratamiento y control, respectivamente. Teniendo en cuenta que el ruxolitinib es un inhibidor de la vía JAK-STAT, que es una vía esencial de la hematopoyesis, no es de extrañar que dichos eventos adversos fueran las toxicidades más frecuentemente observadas no sólo en nuestro estudio, sino también en los ensayos prospectivos e incluso en otros estudios previos para mielofibrosis<sup>114</sup>. Afortunadamente la mayoría de ellos fueron reversibles y pudieron manejarse de forma sintomática. En el manejo sintomático se incluyó la transfusión de hemoderivados (eritrocitos y plaquetas), así como el uso de factores de crecimiento. Sólo en un bajo porcentaje de los casos fue necesario realizar una reducción de dosis del fármaco como medida efectiva para paliar las citopenias.

### Infecciones virales

Con respecto a la reactivación del CMV se observó tanto en la EICH aguda (52,2%) como en la crónica (19,6%). Al compararlos con la incidencia previa al inicio del tratamiento, encontramos que ésta fue similar o incluso mayor, sugiriendo que el tratamiento con ruxolitinib podría no aumentar el riesgo de reactivación del CMV. Los datos del REACH 2 y 3 presentaron datos de incidencia de reactivación de CMV menores. En el caso de la EICHa fue del 25,7% vs. el 20,7%; mientras que el caso de la EICHc la incidencia fue del 5,5% vs. 8,2% para los grupos de tratamiento y control, respectivamente. Finalmente, el tratamiento de las reactivaciones pudo realizarse sin dificultad mediante el manejo sintomático.

### Recaída

Otro aspecto que se analizó fue el riesgo de recaídas, dado que cabría pensar que una mayor inmunosupresión podría conducir a un posible aumento del riesgo de recaída de la neoplasia maligna subyacente<sup>101,105</sup>. En nuestro estudio, no observamos ninguna recaída entre los pacientes que respondieron a ruxolitinib. La única recaída observada en nuestra serie fue en un paciente que no respondió a ruxolitinib. En general, la frecuencia de recaída fue muy baja (1,2%) y esto también se constató en los ensayos prospectivos<sup>46</sup>.

## 6.2 PARTE II: Modelo preclínico

Basándonos en el hecho de que ruxolitinib favorece la proporción de Treg:Tcon en varios estudios, proponemos que el uso combinado de Treg y ruxolitinib podría ayudar a lograr efectos terapéuticos con un número menor de Treg, lo que también permitiría la reducción gradual del tratamiento inmunosupresor en la EICH. Hemos realizado un estudio *in vitro* y un modelo de ratón para evaluar esta hipótesis.

### 6.2.1 Modelo *in vitro*

#### 6.2.1.1 Cultivos celulares

Utilizando cultivos *in vitro* de células mononucleadas, hemos demostrado que tras la activación con antiCD3 / CD28, sin tratamiento con ruxolitinib, surge una población de células CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup> en las primeras etapas del cultivo, que disminuye de forma drástica con el tiempo. Sin embargo, la adición de ruxolitinib retrasa la aparición de esta población. Un análisis más detallado de esta población revela que con el tratamiento con ruxolitinib aumenta el porcentaje de células Helios positivas. La proteína Helios es un factor de transcripción de la familia de Ikaros, y su expresión en linfocitos Treg se ha asociado con una mayor capacidad supresora<sup>115,116</sup>. La expresión de Helios se ha asociado con el origen tímico de las T reguladoras, aunque existe cierta controversia con respecto a este aspecto, y parece que Helios puede expresarse en Treg de origen periférico en función del tipo de estimulación que reciban<sup>92</sup>. Razonamos que, en ausencia de ruxolitinib, la hiperactivación del cultivo conduce a la aparición de Tregs inducidos a partir de los Tcons activados. Por otro lado, la presencia de ruxolitinib, favorece la expansión de las células nTregs Helios+ presentes en el cultivo. Si bien como se ha mencionado la expresión de Helios es un marcador que puede expresarse tanto en células Treg tímicas como en Tregs inducidas<sup>90,91</sup>, en nuestro estudio utilizamos activación con anti-CD3 y anti-CD28 en placas que expresan Helios en Tregs tímicas pero no en inducidas<sup>92</sup>. Esta idea también está respaldada por la correlación inversa de la expresión de PD1 y Helios en estos cultivos, lo que podría indicar que la fracción de células CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>high</sup> Helios- se origina a partir del agotamiento de las Tcon, ya que PD1 es un marcador de agotamiento que se expresa en células Tcon activadas para producir la modulación de la respuesta inmune. PD1 también se expresa en otra subpoblación de linfocitos Treg que no expresan FoxP3<sup>117</sup>. Curiosamente, en las células mononucleadas no activadas, no existe una correlación negativa entre la expresión de Helios y PD1 en las

células Treg CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>high</sup>. Este resultado podría explicar las aparentes discrepancias encontradas en otros estudios anteriores. Así, Spoerl y col.<sup>34</sup> reportan que el ruxolitinib aumenta la frecuencia células Tregs en bazo, colon e hígado en un modelo murino bajo tratamiento con ruxolitinib con respecto al grupo vehículo. Para demostrar que el aumento de la frecuencia de Tregs en el bazo de los ratones se debía directamente al efecto de la droga, se incubaron células T CD4<sup>+</sup> con células dendríticas alogénicas y se añadió ruxolitinib a concentraciones crecientes. El tratamiento con ruxolitinib indujo un aumento significativo en el porcentaje de Treg, pero curiosamente, el mayor aumento de linfocitos Treg en el cultivo se observó a las concentraciones más bajas de ruxolitinib analizadas, lo que podría indicar un diferente umbral de sensibilidad de las Treg y las Tcon al ruxolitinib. En otro estudio, Parampalli y col.<sup>101</sup> emplean muestras procedentes de 9 pacientes con enfermedades mieloproliferativas bajo tratamiento con ruxolitinib y analizan las poblaciones de células T, incluyendo las Tregs. En una primera aproximación *in vivo* observan que el número de células Tregs circulantes en sangre periférica (definido por la expresión de FoxP3) está reducido en dichos pacientes, al igual que otras subpoblaciones de células T. Por ello, realizan estudios *in vitro* para estudiar la capacidad de diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> *naïve* en presencia de ruxolitinib en distintos subtipos celulares. Para evaluar la diferenciación a Tregs polarizan dichas células con TGF- $\beta$  e IL-2, y observan una fuerte inhibición de la generación de Tregs inducidas *in vitro* en relación al mismo experimento realizado en controles. Este hecho podría indicar que el ruxolitinib afecta a la generación de linfocitos Treg *de novo* a partir de linfocitos Tcon. Consideramos que estas diferencias pueden obedecer a una cuestión dinámica, pues en nuestro estudio observamos mayores cantidades de FoxP3 al segundo día de cultivo en los pocillos sin ruxolitinib, pero con la evolución del cultivo esta tendencia se invierte y aparecen mayores cantidades de FoxP3 a los 5 y 8 días en los pocillos tratados con ruxolitinib. Además, ambos estudios han utilizado células dendríticas y polarización con TGF- $\beta$  respectivamente, en lugar de activación con anti-CD3 y anti-CD28, lo cual podría afectar de forma distinta a las células Treg tímicas y a la diferenciación a Treg.

Con los datos obtenidos en los tres estudios, podemos concluir que el ruxolitinib parece inhibir la diferenciación de Tcon hacia Treg. Sin embargo, concentraciones bajas de ruxolitinib, inhiben la proliferación de linfocitos Tcon sin afectar a la expansión de Treg ya determinados. A mayores concentraciones de ruxolitinib, este efecto diferencial parece perderse, y los Treg podrían afectarse en la misma medida que los Tcon.

En cuanto a otros marcadores importantes para la funcionalidad de los linfocitos Treg, encontramos que el ruxolitinib aumenta la expresión de CD39, que también está implicado en la inmunomodulación a través de la producción extracelular de adenosina. CD39 y CD73 son dos ectoenzimas que se secretan al exterior de la célula. CD39 (ectonucleosido trifosfato dihidrolasa-1) cataliza la conversión de ATP y UTP a AMP y UMP. Posteriormente, CD73 una ecto-5'-nucleosidasa, produce la liberación de la adenosina en el espacio pericelular de la célula Treg. Las células Tcon expresan el receptor de la adenosina A2A, que produce un efecto inmunomodulador en las células T activadas<sup>56</sup>. Las células CD39+ presentan una mayor estabilidad en la expresión de FoxP3 así como una mayor capacidad supresora que las células Treg CD39-<sup>96</sup>.

Por otro lado, el antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 o CTLA4 por sus siglas en inglés es otra molécula de punto de control inmunológico importante, cuya expresión se induce en linfocitos Tcon en respuesta a la activación, y que compite con la moléculas de coestimulación CD28 por la unión a CD80/CD86 expresado en las células presentadoras de antígenos<sup>118</sup>. En el caso de las Treg se ha descrito como uno de los factores principales por los que se produce la supresión de la respuesta inmune. El CTLA4 expresado por las Tregs permite la formación de la sinapsis inmune entre los Tregs y la célula presentadora de antígeno, lo que deriva en el secuestro de CD80 y CD86 en esta última y su disminución por un mecanismo de trogocitosis<sup>119</sup>. En nuestros experimentos, CTLA4 parece estar regulada a la baja por ruxolitinib, aunque se recupera a lo largo del cultivo con en las muestras tratadas con concentraciones más altas de ruxolitinib. El hecho de que ruxolitinib reduzca la expresión de CTLA4 podría suponer un impacto negativo sobre la capacidad supresora mediante este mecanismo.

Otra molécula interesante en la biología de los Treg es CD45RA. El antígeno CD45, expresado en todas las células inmunes, es una proteína de membrana expresada en todas las células hematopoyéticas con un dominio tirosina fosfatasa intracelular, y un dominio extracelular que puede presentar distintas isoformas<sup>120</sup>. En el caso de los linfocitos T, la isoforma CD45RA está asociada a un fenotipo *naïve*, mientras que la isoforma CD45RO se expresa en linfocitos de memoria<sup>121</sup>. El grupo de Mathias Edinger, en Ratisbona, describió que sólo los linfocitos Treg CD45RA mantenían el fenotipo regulador de manera estable cuando se expanden en cultivo<sup>97</sup>. Por ese motivo quisimos estudiar que ocurría con este marcador en nuestros cultivos. Lo que observamos sin embargo es una

drástica caída de este marcador a lo largo del cultivo en todas las condiciones estudiadas. Esto probablemente esté reflejando que todos los linfocitos *naïve* presentes en el cultivo, al ser activados adquieren un fenotipo de memoria.

Otro aspecto que se valoró fue la capacidad migratoria de las células Treg hacia los órganos diana de la EICHc. Se ha demostrado recientemente que existe un acúmulo preferente de células Tregs sobre células T efectoras en los órganos afectados, y que éste puede estar motivado por diferencias en las señales del entorno. De hecho, hay diversos estudios que han analizado el acúmulo de las Tregs en el contexto inflamatorio. Duffner y col.<sup>122</sup>, establecen en su modelo murino que existe una migración de las células T del donante a los órganos diana de la EICH, como el intestino, y que ésta depende de la expresión de Cxcr3 y contribuye significativamente al daño de la EICH y a la mortalidad general. Wysocki y col.<sup>123</sup>, demuestran en su modelo murino que las células Tregs que carecen de expresión de Ccr5 fueron menos efectivas en la prevención de la letalidad de EICHa. Por su parte, otros estudios también han sugerido el rol de Ccr9 en la migración al tracto gastrointestinal<sup>124,125</sup> mediante la detección de esta molécula en un modelo de tratamiento EICHa con ácido retinoico en contexto de afectación gastrointestinal. Dado que la migración de las células Tregs hacia los órganos diana es un aspecto que podría influir en la eficacia del tratamiento con dichas células, se estudió su capacidad mediante los marcadores de migración al tubo digestivo Cxcr3, Ccr5 y Ccr9 tanto en células Treg como en células Tcon. Los resultados mostraron que las células CD4+ FoxP3<sup>high</sup> expresan mayores niveles de dichos marcadores que las células FoxP3<sup>low</sup>, y el tratamiento con ruxolitinib afectó a esta expresión de manera menos drástica en los Treg que en los Tcon. Ello sugiere que las células Treg podrían conservar mejor sus propiedades migratorias al nicho digestivo bajo tratamiento con ruxolitinib, en comparación con las Tcon, favoreciendo un mayor ratio de las primeras con respecto a las segundas en este órgano. Sería necesario comprobar esta hipótesis mediante ensayos de migración *in vitro* o *in vivo*.

La señalización del receptor de IL-2 es esencial para el desarrollo de los linfocitos Treg. Los linfocitos Treg son estrictamente dependientes de la IL-2 producida por otros linfocitos, ya que la expresión de IL-2 está reprimida en este tipo celular<sup>126</sup>. La unión de IL-2 al receptor de alta afinidad de IL-2 activa la vía JAK/STAT. Jak1 y Jak3 se unen al receptor de IL-2 y fosforilan a Stat5A/B. Stat5 fosforilado a su vez controla la expresión

de FoxP3 y otros factores, lo que hace esta vía esencial para el desarrollo de los linfocitos Treg<sup>127</sup>, como se demuestra con la delección de Stat5 en ratones, que elimina la diferenciación a linfocitos Treg<sup>128</sup>. No ocurre así con la delección de Stat3, otra molécula de la vía de JAK/STAT que en este caso se encuentra aguas abajo del receptor de IL-6, cuya señal se transmite principalmente vía Jak1, y en menor medida Jak2<sup>129</sup>.

Se ha descrito previamente que el ruxolitinib reduce la fosforilación de Stat5<sup>101</sup> y de Stat3<sup>34</sup> en los linfocitos T. Sin embargo, no se ha abordado el efecto del ruxolitinib en cuanto a fosforilación de Stat3 y Stat5 sobre las células Tregs. En nuestras condiciones experimentales, ruxolitinib abolió de manera similar la fosforilación de Stat5 y Stat3 en las células CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>high</sup> que en las células CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>low</sup> y CD8. Esto también ocurrió en las células Helios<sup>+</sup> y Helios<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Sin embargo, dicho resultado no descarta que en otras condiciones más fisiológicas la fosforilación de Stat5 pueda verse afectada de manera diferente en Tregs en comparación con Tcon. Por otro lado, la fosforilación de Stat5 es importante para la generación de Tregs, a través de su papel en la regulación transcripcional de FoxP3<sup>130</sup>, pero podría ser prescindible para su función una vez que las Tregs ya estén determinadas. La realización de un estudio con mutantes de delección condicional o el silenciamiento de Stat5 en linfocitos Treg ya determinados podrían ayudar a arrojar luz sobre el papel de la fosforilación de Stat5 en la capacidad supresora de los Treg.

#### 6.2.1.2 Ensayo de supresión

Dados los resultados obtenidos hasta el momento, donde comprobamos que el ruxolitinib afecta a algunas de las moléculas implicadas en la funcionalidad de los Treg, de manera negativa, como el caso de la expresión de CTLA4 o la fosforilación de Stat5, mientras que en otras el efecto es el contrario, como es el caso de Helios o CD39, consideramos importante realizar ensayos funcionales que permitieran discernir el efecto global del ruxolitinib sobre los Tregs. Por ello, desarrollamos ensayos de supresión usando cultivos mixtos de linfocitos Treg y Tcon activados con anti-CD3 y anti-CD28, en presencia de ruxolitinib. Nuestros ensayos de supresión *in vitro* indican que la capacidad supresora no se reduce con el tratamiento con ruxolitinib, e incluso podría aumentar, produciendo más que un efecto aditivo. Este resultado, junto con el hecho de que ruxolitinib favorece la proporción de Treg:Tcon tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiere un efecto sinérgico para el tratamiento de la EICH en modelos *in vivo*.

### 6.2.2 Modelo murino

Algunos estudios preclínicos han demostrado el papel de las células Treg en la biología de la EICH. Cohen y col.<sup>74</sup> inoculan  $10 \times 10^6$  células T totales junto con  $5 \times 10^6$  células Treg, y observan que la adición de células Treg en el momento de la infusión retrasa e incluso previene la aparición de EICH en el grupo de tratamiento con respecto al grupo control. En otros estudios, como el de Hannon y col.<sup>76</sup>, utilizan también un modelo murino con dosis menores de linfocitos Treg obtenidos de 6 voluntarios humanos en un modelo xenogénico. De forma análoga, realizan 6 experimentos independientes con 6 grupos de ratones a los que infunden en fresco  $2 \times 10^6$  células mononucleadas,  $2 \times 10^6$  células mononucleadas más  $1 \times 10^6$  linfocitos Treg, y otro grupo con  $1 \times 10^6$  linfocitos Treg. Cada grupo presentó dosis y ratios diferentes tanto de células mononucleadas como de células Treg. La infusión de la doble combinación retrasó la aparición de EICH y mejoró la supervivencia en 5 de los 6 grupos de ratones.

La infusión de linfocitos Treg reguladores expandidos también ha sido evaluada en modelos preclínicos. Taylor y col.<sup>75</sup> describen que las células Treg tienen una capacidad modesta para regular la activación de células CD4+ alorreactivas *in vivo* debido a su baja frecuencia en sangre periférica. Por ello emplean la infusión de linfocitos Treg expandidos *in vitro*. El experimento consistió en trasplantar 3 grupos de ratones con  $2 \times 10^6$  células T *naïve*, que posteriormente fueron aleatorizados en tres grupos: uno control, otro al que se le añadieron  $2 \times 10^6$  células T CD4+ CD25-, y un tercer grupo al cual se le añadió  $2 \times 10^6$  células T CD4+ CD25+. La supervivencia fue claramente superior en el grupo de ratones tratados con una infusión adicional de Treg. Como contraargumento, señalan que presentaron problemas en el método de expansión de dichas células, y sugieren que los distintos métodos de expansión empleados podrían resultar en distintas subpoblaciones celulares con diferente potencial supresor/efector. En definitiva, los modelos preclínicos muestran la efectividad de la infusión de las células Treg para reducir la EICH y la mortalidad asociada a la misma. Aunque los estudios existentes han probado la infusión de células Tregs aisladas o junto con la infusión de células Tcon, ninguno hasta el momento había estudiado la combinación de células Tregs con otras drogas para tratar de mejorar las respuestas obtenidas y explorar posibles efectos sinérgicos.

Por otro lado, se han descrito modelos murinos que abogan por el uso de ruxolitinib en el contexto de la EICH. Spoerl y col. reportan en su modelo murino el descenso en la

severidad de la EICHa y mejoría de la supervivencia en el grupo de ratones tratados con ruxolitinib<sup>34</sup>. En un análisis más detallado, argumentan que la inhibición de la vía JAK resulta en una reducción en la proliferación de linfocitos T efectores, la supresión en la producción de citoquinas proinflamatorias, y el aumento en el número circulante de células Treg favoreciendo la tolerancia inmunológica. Siguiendo el mismo argumento, otros autores demuestran también que el uso de inhibidores de la vía JAK1/2 reduce la EICH y preserva el EICL<sup>35,36</sup>. Carniti explora el efecto del ruxolitinib sobre las vías JAK1/2 en un modelo murino de ratones BALB/c trasplantados a los que posteriormente se inocularon células tumorales a dosis de 0,5 y 2 x10<sup>6</sup>, respectivamente. En su estudio demuestran que la inhibición de dichas vías resultó en una mejora en la supervivencia global y en el *score* de EICHa en los órganos afectados, además de preservar el EICL.

En nuestro estudio utilizamos un modelo murino para confirmar el potencial terapéutico de la combinación de ruxolitinib y Treg en el tratamiento de la EICH. Nuestro modelo refleja el curso de la enfermedad en el entorno clínico, con una fase aguda con afectación intestinal, pérdida de peso y alta mortalidad en las primeras etapas seguida de una recuperación y posterior desarrollo de una fase crónica en el que además de los anteriores, aparecen síntomas como la fibrosis cutánea o la afectación ocular, más característicos de la EICH crónica<sup>102</sup>. A diferencia de la mayoría de los estudios preclínicos con ruxolitinib o Tregs mencionados anteriormente, no hemos iniciado el tratamiento de forma simultánea al trasplante de médula ósea y esplenocitos, sino una vez pasada la fase aguda en nuestro modelo y cuando la fase crónica ha comenzado a mostrar signos clínicos, por tanto, un modelo de tratamiento, no de “profilaxis”. El hecho de que la EICH ya esté en progresión en el momento de iniciar el tratamiento dificulta el modelo y la obtención de resultados positivos y, por tanto, en nuestra opinión, hace que los hallazgos de nuestro estudio sean más relevantes. Además, hemos utilizado dosis reducidas de ruxolitinib (30 mg/kg de peso corporal por día, en comparación con la dosis estándar de 60 mg/kg) y una relación Treg:esplenocitos 1:6, en lugar de una proporción de 1:1 o 1:2 utilizada en la mayoría de los estudios. Hemos utilizado estas dosis más bajas para detectar el posible efecto aditivo o sinérgico de ambos tratamientos, y para demostrar que una reducción de ambos tratamientos en el entorno combinado podría ser beneficiosa para los pacientes, disminuyendo los efectos secundarios de cada tratamiento por sí solo y facilitando la obtención de suficiente Tregs. Con estos parámetros, hemos podido determinar que el tratamiento combinado en la EICH con ruxolitinib y Tregs, comenzando con la

enfermedad que ya está en progresión, puede superar a los tratamientos individuales, logrando una supervivencia significativamente más alta, mejores puntuaciones clínicas y una menor pérdida de peso, sin afectar al efecto injerto contra leucemia.

Otro aspecto que se valoró fue la persistencia de las células Treg una vez infundidas, simulando las mismas condiciones de la enfermedad por EICH. Ello fue posible gracias al empleo de ratones GFP. En nuestro modelo, hemos podido detectar las Treg GFP+ infundidas hasta 70 semanas (16 meses) después de la infusión en la médula ósea de los ratones tratados con Treg, lo que demuestra su persistencia a largo plazo.

Un aspecto fundamental en este tipo de modelos es la demostración de que la eficacia del procedimiento evaluado en cuanto al tratamiento de la EICH no afecta el EICL. Ya existen publicaciones previas que describen que ni el ruxolitinib ni el tratamiento con células Treg por separado interfieren en el EICL<sup>36,77</sup>. En base a estos resultados, algunos investigadores argumentan que las células Treg inhiben la proliferación, pero no la activación de las Tcon. Era pues importante comprobar que la combinación de ambos tratamientos no tenía un efecto negativo sobre el EICL. Por ello en nuestro modelo llevamos a cabo un experimento infundiendo células leucémicas A20 marcadas con luciferasa en ratones BALB/c junto con esplenocitos de donantes C57Bl/6. En aquellos ratones que no recibieron esplenocitos se produjo una proliferación de células tumorales, mientras que en aquellos ratones que sí recibieron esplenocitos no se produjo proliferación de las mismas, eliminándose prácticamente la señal a los 14 días de la infusión de los esplenocitos, independientemente de la administración o no de ruxolitinib y/o Treg. Esto indica que el tratamiento combinado no está produciendo un detrimento en la capacidad del implante de eliminar las células tumorales.

En resumen, el modelo murino muestra una mayor efectividad del tratamiento combinado con ruxolitinib y Treg en del tratamiento de la EICH que cada uno por separado y se traduce en una mejora significativa de la supervivencia. Demostramos la persistencia a largo plazo de las Treg infundidas con el tratamiento combinado, y que la infusión de Treg en fresco en combinación con el tratamiento con ruxolitinib preserva el EICL.

### 6.3 PARTE III: Ensayo clínico con linfocitos Treg y ruxolitinib

Diversos estudios ponen de manifiesto déficits cuantitativos o cualitativos de los Treg en pacientes con EICH<sup>68,71</sup>. Las células Treg son críticas para el mantenimiento de la homeostasis inmune y la tolerancia postrasplante. Aunque los factores que contribuyen a la reducción en los recuentos de células Treg no están completamente elucidados, dichos estudios apuntan hacia la recomposición del *pool* circulante de dicha población celular como una estrategia terapéutica innovadora<sup>54</sup>. Entre las ventajas que se anticipan se encuentra la inducción a largo plazo de inmunotolerancia que obviaría la necesidad del uso de drogas inmunosupresoras y su potencial para la reparación tisular<sup>131</sup>.

Diversas estrategias para aumentar el número circulante de células Treg y su función han sido exploradas de estudios preclínicos y están mostrando un creciente potencial en la clínica. A continuación se muestra una tabla con los principales ensayos clínicos activos actualmente (fuente: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) (Tablas 6.1 y 6.2).

Los estudios que evalúan el uso de las células Treg para tratamiento de EICH descritos por Trzonkowski<sup>54,132</sup>, así como los siguientes estudios fase I/Ib, realizados en el ámbito de la profilaxis de la EICH demuestran la factibilidad y seguridad de la terapia adoptiva con células Treg. Los primeros estudios para profilaxis de EICH fueron los reportados por los grupos de la Universidad de Minesotta<sup>81</sup> y Di Ianni<sup>79</sup>. En el primero, se evaluó la seguridad de infundir Treg de cordón umbilical expandidos *ex vivo* con anti-CD3 y anti-CD28, e IL-2 a 23 pacientes sometidos a doble trasplante de cordón umbilical. Los pacientes recibieron una dosis de 0,1-30x10<sup>5</sup> células Treg/kg después del trasplante. No se observaron toxicidades post-infusión. En comparación con 108 controles históricos tratados de forma idéntica sin infusión de Treg de cordón, hubo una menor incidencia de EICH aguda de grado II-IV (43% frente a 61%, p=0,05) sin efectos nocivos sobre la infección, la recaída o la mortalidad temprana. El segundo grupo, liderado por Di Ianni, estudió el efecto de la infusión de células Treg en el contexto del trasplante haploidéntico como profilaxis de EICH en 28 pacientes. Cuatro días después de la infusión de los Treg, se realizó la infusión de células CD34+ seleccionadas acompañada de células Tcon del donante. No se observó toxicidad con la infusión de hasta 4x10<sup>6</sup> células enriquecidas en Treg/kg, a pesar de la infusión posterior de hasta 2x10<sup>6</sup> células Tcon/kg.

Estudio/Centro	Fase	Reclut./ planeado	Trasplante/IS	Indicación	Producto celular/Dosis	Resultados
NCT01634217/ Universidad de Minnesota, EE.UU.	I	16/16	HLAid MMF/Siro, n=2 MMF/Csa, n=14	Profilaxis EICH	iTregs expandidas SP Escalada de dosis: 3-300 x10 <sup>6</sup> /kg	1ª cohorte: 100% grado 3 EICHa 2ª cohorte: 20% grado ≥2 EICHa
NCT02423915/ MD Anderson, EE.UU.	I	5/5	Doble CU, n=2 DNE SP, n= 3 MMF/Siro	Profilaxis EICH	Treg fucosiladas de CU 1-10 x10 <sup>6</sup> /kg	100% ≥ grado 2 EICHa
NCT01660607/ Stanford, EE.UU.	I/II	12/24	DNE/DE Sin IS, n= 5 Tac/Siro, n= 7	Profilaxis EICH	Tregs y Tcons en fresco Tregs: 1-3 x10 <sup>6</sup> /kg Tcons: 1 x10 <sup>5</sup> /kg- 3 x10 <sup>7</sup> /kg	1ª cohorte: 40% ≥ grado 2 EICHa 2ª cohorte: sin EICH
NCT01795573/ Moffitt Cancer Center, EE.UU.	I	38/48	DE IS no especificada	Profilaxis EICH	Tregs expandidas con células dendríticas del donante Dosis no especificada	No reportado
2012-002685- 12/ Ratisbona, Alemania	I	9/9	No especificado	Profilaxis EICH	Tregs en fresco Hasta 5 x10 <sup>6</sup> /kg	Seguro; no diseñado para eficacia
01/08 Perugia, Italia	I	28/28	Haploidéntico Sin IS	Profilaxis EICH	Tregs y Tcons en fresco Tregs: 2-4 x10 <sup>6</sup> /kg Tcons: 0.5-2 x10 <sup>6</sup> /kg	15% ≥ grado 2 EICHa 5% recaída
NCT00602693/ Universidad de Minnesota, EE.UU.	I	11/11	Doble CU MMF/Siro	Profilaxis EICH	Tregs expandidas de CU 3-300 x10 <sup>6</sup> /kg	9% ≥ grado 2 EICHa 5% recaída
NCT04678401/ Dana Farber Cancer Institute, EE.UU.	I	NA/10	Haploidéntico Sin IS	Profilaxis EICH	Tregs enriquecidas Dosis no especificada	Sin resultados

**Tabla 6.1.** Principales ensayos clínicos disponibles que emplean los linfocitos Tregs en la EICH en profilaxis. Abreviaturas: Reclut.= Reclutamiento, HLAid = HLA idéntico, EICHa = Enfermedad injerto contra huésped aguda, CU = Cordón umbilical, Siro = sirolimus, DNE = donante no emparentado, SP = sangre periférica, IS = inmunosupresión, DE = Donante emparentado, Tcons = células T convencionales, MMF = Micofenolato, CF = Ciclofosfamida.

Estudio/Centro	Fase	Reclut./ planeado	Trasplante/ IS	Indicación	Producto celular/Dosis	Resultados
NCT01903473/ Universidad de Lieja, Bélgica	II	NA/35	Cualquiera	EICHc	Tregs en fresco + Siro + IL-2 0.5 x10 <sup>6</sup> /kg	Sin resultados
NCT01937468/ Dana Farber Cancer Institute, EE.UU.	I	NA/25	Cualquiera	EICHc	Tregs en fresco SP Dosis no especificada	Sin resultados
NCT02385019/ Portugal	I/II	NA/22	Cualquiera	EICHc	Tregs en fresco SP 0.5-3 x10 <sup>6</sup> /kg	Sin resultados
NCT01911039/ Stanford, EE.UU.	I	NA/20	Cualquiera	EICHc	Tregs no especificadas 0.1-1.5 x10 <sup>6</sup> /kg	Sin resultados
NCT02749084/ Bologna, Italia	I/II	NA/20	Cualquiera	EICHc	Tregs SP de múltiples donantes 17-6.6 x10 <sup>6</sup> /kg/ mensual x3	Sin resultados
EK206082008/ H. Carl Gustav Carus, Alemania	I	5/5	Cualquiera	EICHc	Tregs expandidas SP 0.5-4.4 x10 <sup>6</sup> /kg	Respuesta, n=2 Enf. Estable, n=3
NCT03683498/ H. Virgen del Rocío, España	I	16/16	Cualquiera	EICHc	Tregs en fresco SP	Sin resultados
NKEBN/ 458-310/2008 Universidad de Gdansk, Polonia	I	2/2	DE	EICHa EICHc	Tregs expandidas EICHa: 3 x10 <sup>6</sup> /kg EICHc: 1 x10 <sup>5</sup> /kg	EICHa: mejoras transitorias EICHc: Reducción IS
NCT01453140/ John Theurer Cancer Center, EE.UU.	I/II	3/15	Cualquiera	EICHa	Tregs expandidas SP con CF + Siro +/- azacitidina Dosis no especificada	Sin resultados

**Tabla 6.2.** Principales ensayos clínicos disponibles que emplean los linfocitos Tregs en la EICH para tratamiento. Abreviaturas: Reclut.= Reclutamiento, HLAid = HLA idéntico, EICHa = Enfermedad injerto contra huésped aguda, CU = Cordón umbilical, Siro = sirolimus, DNE = donante no emparentado, SP = sangre periférica, IS = inmunosupresión, DE = Donante emparentado, Tcons = células T convencionales, Enf. = Enfermedad.

Sólo dos pacientes desarrollaron EICH aguda y ningún paciente desarrolló EICH crónica. Además, la recuperación inmunitaria de los pacientes fue rápida, con un aumento precoz en las subpoblaciones de células T y su repertorio.

En el contexto del uso de la terapia adoptiva de Treg como tratamiento de la EICH, los ensayos disponibles son escasos y los resultados están, en muchos casos, pendientes de publicación. El primer ensayo clínico descrito para tratamiento de la EICH se realizó utilizando Tregs expandidas *ex vivo*. En este estudio se incluyeron 2 pacientes, uno con EICHc en el que se describió un alivio sintomático, y otro que obtuvo una mejoría transitoria de la EICHa<sup>133</sup>. En otro estudio, liderado por Theil y col.<sup>134</sup>, la terapia adoptiva con Tregs expandidos *ex vivo* permitió alcanzar algún tipo de respuesta en 2 de 5 pacientes con EICHc. Los otros 3 pacientes mostraron enfermedad estable tras un periodo de seguimiento de hasta 21 meses.

De forma general, estos estudios han demostrado que la terapia adoptiva con células Treg es posible y segura y podría ser eficaz en el contexto de la EICH. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones se han centrado en la prevención en lugar del tratamiento de la EICH, en la expansión *ex vivo* y en el contexto del trasplante haploidéntico, y en buena parte de ellos, en el uso de Tregs obtenidas a partir de cordón umbilical. En el momento en el que iniciamos nuestro estudio existía, por tanto, una carencia de estudios prospectivos centrados en el tratamiento de EICH crónica con Treg obtenidos *ex vivo* mediante selección inmunomagnética a partir de sangre periférica. Por todo ello, propusimos estudiar específicamente este método de selección en pacientes con EICHc refractario, y además realizarlo en combinación con tratamiento con ruxolitinib, planteando un posible potencial efecto sinérgico, teniendo en cuenta que en el escenario actual el ruxolitinib se iba consolidando como la opción más habitual de tratamiento tras fallo a corticoides y, por tanto, los pacientes susceptibles de recibir Treg estarían expuestos a este fármaco. La combinación de ruxolitinib y los linfocitos Treg podría actuar de manera sinérgica inhibiendo la activación linfocitaria y preservando/aumentando los linfocitos Treg circulantes, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y el desarrollo de la EICHc. Nuestro ensayo clínico explora por primera vez la combinación de ruxolitinib y linfocitos Treg en el ámbito clínico como tratamiento de la EICHc.

En nuestro estudio el perfil de seguridad fue aceptable no alcanzándose toxicidad limitante de dosis incluso en las dosis más altas. La mayoría de eventos adversos fueron de grado  $\leq 2$  y pudieron ser manejados sin dificultad. Un total de 4 de 14 pacientes presentaron eventos adversos grado  $\geq 3$ , y en ningún caso se relacionó con el tratamiento

administrado. Un paciente presentó una necrosis avascular en contexto de altas dosis de corticoides, y 3 pacientes presentaron procesos infecciosos, en un intervalo de tiempo de más de 4 meses desde la infusión. En este contexto, nuestros datos de seguridad coinciden con la mayoría de estudios disponibles que han empleado las células Treg en la EICH, observándose una baja toxicidad post-infusión y un perfil de seguridad muy aceptable. Tampoco la frecuencia de infecciones post-infusión se ha visto alterada comparada con otros estudios en el postrasplante alogénico que no han empleado células Treg. Así, la literatura reporta una incidencia de infecciones bacterianas que oscila entre el 20-50%<sup>135</sup>, y de neumonía entre el 15-25% de los pacientes<sup>136</sup> por lo que, en nuestro ensayo, tampoco se observó aumento de las mismas con respecto a lo previamente reportado.

Con respecto al aislamiento y pureza de las células Treg, éstas suponen un desafío importante dado que la proporción de linfocitos Treg en sangre periférica se encuentra en torno al 5-10% de los linfocitos T CD4+. Por este es necesario recurrir a técnicas específicas de selección celular. Cabría pensar que esto pudiera suponer una limitación en sí misma, pues para llevar a cabo dichos procesos de purificación se precisa de personal altamente cualificado. En nuestro ensayo clínico, se elaboraron con éxito un total de 14 de 15 productos obtenidos de aféresis para su uso como tratamiento de la EICHc. Sólo un producto no fue infundido por exceso de linfocitos CD8+ tras la purificación, si bien este no era un criterio de liberación del estudio. En cuanto a la dosis celular diana de cada cohorte se consiguió en 9 de 14 pacientes. De los 5 que no alcanzaron estrictamente la dosis completa, 3 se aproximaron con una variación máxima del 10%, y los otros 2 consiguieron una dosis en torno al 50% de la dosis objetivo. De ellos, 4 pertenecían a la cohorte de mayor dosis ( $2 \times 10^6/\text{kg}$ ), y sólo 1 a la segunda cohorte ( $1 \times 10^6/\text{kg}$ ). Por este motivo, los 2 pacientes cuya dosis se halló en torno al 50% fueron reasignados a la cohorte 2 para su análisis, acorde a una dosis final más cercana a  $1 \times 10^6/\text{kg}$ . Entre los principales factores que consideramos que podrían haber influido en el éxito de la recolección de un número suficiente de Treg, destacamos en primer lugar la dosis Treg de partida del producto de aféresis, en segundo lugar la dosis objetivo, y en tercer lugar otras variables como el mayor peso del receptor o la recuperación de Treg tras el proceso de selección. No obstante, nuestros datos sugieren que la dosis mayor de linfocitos Treg infundidos,  $2 \times 10^6/\text{kg}$ , podría ser suficiente para el tratamiento de la EICHc y asienta la base para la realización de ensayos clínicos que exploren más profundamente la eficacia clínica con esta dosis. Como alternativa a la selección celular, otros grupos están investigando

métodos de expansión *ex vivo* de linfocitos Treg obtenidos de sangre periférica o cordón umbilical<sup>81,82,137</sup>. Incluso aunque con dichas técnicas de expansión pudiera obtenerse un número de células superior, a menudo dichos estudios se han encontrado con limitaciones en cuanto a número conseguido y pureza del producto obtenido<sup>58</sup>. Quizá próximamente, cuando la generación de linfocitos Treg haya sido optimizada o las aproximaciones *in vivo* sean más eficaces, el número de linfocitos Treg infundidos no sea considerado tan relevante como su relativa eficacia y/o persistencia en sangre periférica.

En nuestro estudio el tratamiento con la doble terapia permitió el descenso de la inmunosupresión en los 14 pacientes, llegando incluso al descenso paralelo de varios fármacos en hasta 12 de 14 pacientes, lo cual supone un objetivo en sí mismo en el tratamiento de pacientes severamente afectados por la EICHc y expuestos a diversos inmunosupresores. Esto fue posible gracias a la mejoría en la gradación NIH global observada en 10 de 14 pacientes infundidos, con una tasa de respuesta global del 71,4%. Hay que mencionar que en nuestro estudio, el tiempo medio desde la infusión hasta la máxima respuesta fue de 6 meses con mejorías progresivas a lo largo de todo el año de seguimiento, y que además dichas respuestas fueron duraderas en el tiempo. Los resultados de otros ensayos clínicos que han empleado la infusión de células Tregs como tratamiento de la EICHc aún están por reportar. Los datos disponibles hasta la fecha son los resultados de Trzonkowski y cols<sup>133</sup>, que describen una mejoría de síntomas en un paciente tratado con EICHc; y Theil<sup>134</sup>, que describe respuestas clínicas en 2 de 5 pacientes con EICHc. En comparación con otras aproximaciones que han planteado un aumento *in vivo* del número de células Treg circulantes sin llegar a la selección o expansión de células Treg, destacan el liderado Koreth y col<sup>59</sup>., que arrojan respuestas del 50% en una población de 23 pacientes a los que se administraron bajas dosis de IL-2 diarias durante 2 meses.

En cuanto a la afectación y respuesta por órganos, la afectación en piel, la esclerodermia, la afectación articular y ocular fueron los órganos más frecuentemente afectados. Al analizar las respuestas, se objetivó un mayor porcentaje de respuesta en aquellos pacientes con afectación oral, en piel y articular, con hasta un 83%, 58,3% y 41% de respuestas respectivamente. En la mayoría de las ocasiones estas respuestas también se acompañaron de una mejor puntuación en la escala subjetiva de síntomas de EICHc o escala de Lee. En

cuanto a la respuesta articular, se evaluó a través de la escala JOINT/PROM. Hasta 10 de 12 pacientes presentaron mejoría en dicha escala, con respuestas variadas en la profundidad de entre 1 y 8 puntos en el *score* PROM total. Este hallazgo es significativo, pues la afectación articular es considerado hoy por hoy una de las manifestaciones de EICHc más complicadas de tratar. Además, dos de los tres pacientes que empeoraron, lo hicieron en solo 1 punto del *score* PROM sin llegar a empeorar el *score* NIH, lo cual indica estabilidad pero no progresión<sup>103</sup>.

El análisis por subgrupos permitió la identificación de los posibles factores relacionados con el grado de respuesta alcanzado tras finalizar el seguimiento. Si bien no hubo diferencias significativas en la respuesta en cuanto al tipo de tratamiento inmunosupresor ( $p = 0,16$ ), líneas de tratamiento previas para la EICHc ( $p = 0,38$ ) o la dosis de Tregs recibida ( $p = 0,88$ ), sí que la hubo en cuanto al grado de EICHc previo a la infusión ( $p = 0,005$ ), encontrando respuestas significativamente mejores en aquellos pacientes con EICHc moderada con respecto a los que presentaban EICHc severa. Esto sugiere que el tratamiento precoz de los pacientes con EICHc es clave para tratar de revertir los cambios fibróticos y escleróticos de las formas más severas, mucho más difíciles de revertir en el tiempo.

Otro aspecto que se analizó fue el riesgo de recaídas, dado que cabría pensar que una mayor inmunosupresión podría conducir a un posible aumento del riesgo de recaída de la neoplasia maligna subyacente tal y como también apuntábamos en el estudio retrospectivo con ruxolitinib<sup>105,138</sup>. No se constató ningún caso de recaída postrasplante de la enfermedad de base, aunque uno de los pacientes presentó inmunofijaciones positivas en el proteinograma con estudio medular negativo. Es más, como apuntábamos anteriormente fue posible el descenso de la inmunosupresión en todos los pacientes. A este respecto se han descrito otras aproximaciones recientes, como el uso de lenalidomida postrasplante. Si bien dicho fármaco se ha mostrado efectivo en el tratamiento de los pacientes con mieloma múltiple postrasplante, no es efectivo para reducir la incidencia de EICH ni los eventos adversos hematológicos derivadas de su uso<sup>139</sup>. Comparado con otros estudios que avalan el uso de linfocitos Treg, nuestros resultados coinciden con la baja incidencia de recaída observada<sup>80</sup>. Tampoco encontramos un detrimento en cuanto a la supervivencia, documentándose un fallecimiento en toda la serie, lo cual asemeja de

manera similar la incidencia normal de supervivencia postrasplante sin encontrarse mayor mortalidad<sup>2</sup>.

La aféresis al donante fue segura, sin notificarse ninguna incidencia relacionada con el proceso de donación. El hecho de que la aféresis de linfocitos pudiera llevarse a cabo por vía periférica supone una ventaja con respecto a otros métodos de obtención, como el cordón umbilical, ya que representa una forma de más fácil acceso y no requiere la petición de unidades a centros o bancos de tejidos. El tiempo de selección o producción, que comprende desde la aféresis hasta la infusión del producto elaborado varió entre las 48 y 72 h. Este plazo de tiempo es corto comparado con otras terapias, como la infusión de células TCAR donde el tiempo de producción se sitúa en 2-4 semanas, por lo que la probabilidad de que los pacientes progresen en sus manifestaciones de EICHc son prácticamente nulas, siendo por tanto un tratamiento que puede conseguirse en relativamente poco tiempo. Si bien es cierto que el uso de donantes no emparentados y su evaluación requiere un tiempo algo mayor, esto también ocurre con el empleo de las células TCAR, en las cuáles la preparación previa a la aféresis demora la misma de forma adicional un plazo de 2-4 semanas hasta la dicha aféresis<sup>140</sup>.

En cuanto a la identificación de parámetros biológicos con valor pronóstico, encontramos que el ratio Treg:Tcon fue incrementándose a lo largo del tiempo en 11 de los 14 pacientes analizados; este ratio fue superior en la tercera cohorte de dosis con respecto a las otras dos. Coincidiendo, por tanto, con nuestro modelo preclínico, observamos que el ruxolitinib no afecta los recuentos de los linfocitos Treg *in vivo*, a pesar de las altas dosis de tratamiento inmunosupresor y diferentes agentes empleados en la población analizada. Además, dicho incremento coincidió con el aumento progresivo de las respuestas clínicas a lo largo del año de seguimiento y con la reducción de los corticoides. Otros parámetros biológicos medidos no presentaron tendencias relevantes. En cuanto al análisis de las distintas subpoblaciones de linfocitos Treg, tampoco se encontraron otros cambios estadísticamente significativos, incluyendo el ratio de células de memoria central/efectoras, expresión de Ki67 o el origen tímico medido mediante la expresión de CD31. Lo mismo sucedió con el análisis de otras poblaciones celulares como los linfocitos T convencionales o los linfocitos B. Estos datos sugieren que quizá el

tratamiento con la doble terapia no afectaría a la homeostasis general de otras poblaciones sanguíneas, aunque se necesitarían más estudios que confirmaran estos hallazgos.

En lo que respecta a los resultados descritos en este estudio en comparación con otras estrategias terapéuticas evaluadas recientemente en diversos ensayos clínicos, es interesante señalar que la tasa de respuestas globales del 71,4% se compara favorablemente con la descrita en estudios como el ROCKstar (NCT03640481), en el que se analiza la eficacia de belumosudil en pacientes con EICHc tras 2-5 líneas de tratamiento obteniendo respuestas globales del 73% (68% respuestas parciales, 5% respuestas completas)<sup>141</sup>, y que llevó a su aprobación recientemente por la FDA<sup>27</sup>. Otras novedades terapéuticas empleadas en pacientes con EICHc refractaria a  $\geq 2$  líneas de tratamiento han incluido el uso de ofatumumab en combinación con prednisona, consiguiendo respuestas globales en torno al 62,5%<sup>142</sup>; axatilimab, describiendo respuestas del 68%, glasdegib con respuestas de 60%, y abatacept, con respuestas del 49% (estos últimos, resultados publicados en el congreso ASH de 2021). Por tanto, los resultados de eficacia de nuestro estudio arrojan respuestas nada despreciables con respecto a otros estudios clínicos en marcha.

En resumen, en la última década hemos avanzado en el conocimiento de la biología de las células Tregs y su mecanismo de inducción a la tolerancia en el postrasplante alogénico. Los estudios preclínicos y ensayos clínicos han permitido esclarecer el potencial de la terapia celular basada en el uso de células Tregs como una terapia alternativa al uso de drogas inmunosupresoras. Sin embargo, aunque los primeros resultados de los ensayos clínicos han confirmado la factibilidad y seguridad de su uso, dicha terapia aún no ha entrado en la práctica clínica debido a algunos obstáculos remanentes como la obtención del número adecuado de células Tregs para su uso a escala clínica o la necesidad de ajustar el resto de tratamientos inmunosupresores que esté recibiendo el paciente para evitar potenciales antagonismos, como sucede con los inhibidores de la calcineurina. Con este estudio hemos pretendido arrojar luz a algunas de estas cuestiones aún no resueltas y avanzar en la optimización del tratamiento de pacientes con EICHc, con una nueva estrategia terapéutica que incluye también a los inhibidores del JAK1/2 como posible terapia concomitante para potenciar las respuestas obtenidas, permitiendo acotar el número de células Treg a infundir así como reducir el resto de fármacos inmunosupresores que podrían ejercer efectos deletéreos hacia las

Tregs. Todo ello elaborado desde el ámbito científico y basado en un modelo preclínico que ha dado soporte fundamental a nuestro modelo clínico.

# **CONCLUSIONES**



## 7 Conclusiones

1: El estudio retrospectivo realizado en el contexto del GETH demuestra que el tratamiento con ruxolitinib tiene un perfil de eficacia y seguridad aceptable en el tratamiento de la EICH aguda y crónica.

2: En este estudio, no se han hallado características clínicas y/o biológicas concretas que puedan predecir respuesta al tratamiento.

3: En estudios *in vitro*, el ruxolitinib incrementa el ratio nTreg:Tcon a lo largo del tiempo.

4: La capacidad supresora de las células Treg no se ve afectada en por el tratamiento con ruxolitinib *in vitro*.

5: En un modelo murino de EICH, el tratamiento combinado con ruxolitinib y células T reguladoras mejoró la supervivencia y los síntomas clínicos de la enfermedad, superando a cada uno de los tratamientos por separado y sin afectar al efecto contra leucemia del trasplante.

6: La selección de linfocitos T reguladores mediante separación inmunomagnética es factible, obteniéndose productos ajustados a los criterios de liberación en todos los casos menos uno, y consiguiéndose la dosis objetivo en el 85,7% de los casos.

7: La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg fue segura con un perfil de toxicidad aceptable en todas las dosis estudiadas, no alcanzándose la toxicidad limitante de dosis al menos hasta la dosis más alta evaluada en este estudio, de 2 millones de Treg por kg de peso.

8: La terapia combinada con ruxolitinib y linfocitos Treg permite obtener unas tasas de respuestas globales del 71%, permitiendo además la reducción de la inmunosupresión sistémica, sin incrementar el riesgo de recaída. Se precisa un mayor número de pacientes para extraer conclusiones definitivas en relación con la eficacia del procedimiento.

9: La frecuencia de infecciones post-infusión potencialmente mortales es similar a la de otros estudios empleados en el postrasplante alogénico.

10: La terapia combinada con infusión de linfocitos Treg y ruxolitinib favorece el ratio Treg:Tcon *in vivo* a lo largo del tiempo, observándose de forma paralela una mejora en las respuestas clínicas.



# **BIBLIOGRAFÍA**



**8 Bibliografía**

1. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute Graft-Versus-Host Disease. In: *The EBMT Handbook*. Springer International Publishing; 2019:323-330. doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_43
2. Wolff D, Lawitschka A. Chronic Graft-Versus-Host Disease. doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_44
3. Bruce R B. Advances in GVHD biology and Tx. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):443-458. doi:10.1038/nri3212.Advances
4. Jiang H, Fu D, Bidgoli A, Paczesny S. T Cell Subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.761448
5. MacDonald KPA, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: Biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21. doi:10.1182/blood-2016-06-686618
6. Martinez-Cibrian N, Zeiser R, Perez-Simon JA. Graft-versus-host disease prophylaxis: Pathophysiology-based review on current approaches and future directions. *Blood Rev*. 2020;48(December 2020):100792. doi:10.1016/j.blre.2020.100792
7. Introna M, Golay J. Tolerance to Bone Marrow Transplantation: Do Mesenchymal Stromal Cells Still Have a Future for Acute or Chronic GvHD? *Front Immunol*. 2020;11(December):1-18. doi:10.3389/fimmu.2020.609063
8. Enric Carreras, Carlo Dufour MM. *The EBMT Handbook*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5>
9. Baird K, Cooke K, Schultz KR. Chronic Graft-Versus-Host Disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am*. 2010;57(1):297-322. doi:10.1016/j.pcl.2009.11.003
10. Zeiser R, Teshima T. Nonclassical manifestations of acute GVHD. *Blood*. 2021;138(22):2165-2172. doi:10.1182/blood.2021012431
11. Holler E, Greinix H, Zeiser R. Acute Graft-Versus-Host Disease.

doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_43

12. Harris AC, Young R, Devine S, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):4-10. doi:10.1016/j.bbmt.2015.09.001
13. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(3):389-401.e1. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001
14. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, et al. Measuring Therapeutic Response in Chronic Graft-versus-Host Disease. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):984-999. doi:10.1016/j.bbmt.2015.02.025
15. Lee SJ, Cook EF, Soiffer R, Antin JH. Development and Validation of a Scale to Measure Symptoms of Chronic Graft-versus-Host Disease. 2002;452:444-452.
16. Lau A, Chang CH, Tai J, et al. Quality of life Translation and validation of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Bone Marrow Transplant (FACT-BMT) Version 4 quality of life instrument into traditional Chinese. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:41-49. doi:10.1038/sj/bmt/1703313
17. Penack O, Marchetti M, Ruutu T, et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol*. 2020;7(2):e157-e167. doi:10.1016/S2352-3026(19)30256-X
18. Hoda D, Pidala J, Salgado-Vila N, et al. Sirolimus for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(8):1347-1351. doi:10.1038/bmt.2009.343
19. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, et al. First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow*

- Transplant.* 2012;18(8):1150-1163. doi:10.1016/j.bbmt.2012.04.005
20. Pidala J, Kim J, Perkins J, et al. Mycophenolate mofetil for the management of steroid-refractory acute graft vs host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(5):919-924. doi:10.1038/bmt.2009.252
  21. Nygaard M, Andersen NS, Moser CE, et al. Evaluation of infliximab as second-line treatment of acute graft versus host disease -validating response on day 7 and 28 as predictors of survival. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(7):844-851. doi:10.1038/s41409-018-0099-3
  22. Couriel D, Saliba R, Hicks K, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood.* 2004;104(3):649-654. doi:10.1182/blood-2003-12-4241
  23. Park JH, Lee HJ, Kim SR, et al. Etanercept for steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Intern Med.* 2014;29(5):630. doi:10.3904/kjim.2014.29.5.630
  24. García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, et al. Updated Experience with Inolimomab as Treatment for Corticosteroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(3):435-439. doi:10.1016/j.bbmt.2012.11.012
  25. Bay JO, Dhédin N, Goerner M, et al. Inolimomab in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Retrospective analysis and comparison with other interleukin-2 receptor antibodies. *Transplantation.* 2005;80(6):782-788. doi:10.1097/01.TP.0000173995.18826.DE
  26. Miklos D, Cutler CS, Arora M, et al. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood.* 2017;130(21):2243-2250. doi:10.1182/blood-2017-07-793786
  27. Ali F, Ilyas A. Belumosudil with ROCK-2 inhibition: chemical and therapeutic development to FDA approval for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Curr Res Transl Med.* 2022;70(3):103343. doi:10.1016/j.retram.2022.103343

28. Flowers MED, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(4):606-615. doi:10.1182/blood-2014-08-551994
29. Teshima T. JAK inhibitors: A home run for GVHD patients? *Blood*. 2014;123(24):3691-3693. doi:10.1182/blood-2014-04-570325
30. Schroeder MA, Choi J, Staser K, DiPersio JF. The Role of Janus Kinase Signaling in Graft-Versus-Host Disease and Graft Versus Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(6):1125-1134. doi:10.1016/j.bbmt.2017.12.797
31. Assal A, Mapara MY. Janus Kinase Inhibitors and Cell Therapy. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.740847
32. Braun LM, Zeiser R. Kinase Inhibition as Treatment for Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.760199
33. Zeiser R, Socié G. The development of ruxolitinib for glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *Blood Adv*. 2020;4(15):3789-3794. doi:10.1182/bloodadvances.2020002097
34. Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, et al. Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123(24):3832-3842. doi:10.1182/blood-2013-12-543736
35. Choi J, Cooper ML, Alahmari B, et al. Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect. *PLoS One*. 2014;9(10):2-7. doi:10.1371/journal.pone.0109799
36. Carniti C, Gimondi S, Vendramin A, et al. Pharmacologic inhibition of JAK1/JAK2 signaling reduces Experimental murine acute GVHD while preserving GVT effects. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3740-3749. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2758
37. Khoury HJ, Langston AA, Kota VK, et al. Ruxolitinib: a steroid sparing agent in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53:826-831. doi:10.1038/s41409-017-0081-5
38. Ferreira AM, Pontes da Silva CA, Pereira AD, et al. Ruxolitinib in steroid-refractory chronic graft-versus-host disease: experience of a single center. *Bone*

- Marrow Transplant*. 2018;53(4):503-506. doi:10.1038/s41409-017-0068-2
39. Maffini E, Giaccone L, Festuccia M, et al. Ruxolitinib in steroid refractory graft-vs.-host disease: a case report. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):67. doi:10.1186/s13045-016-0298-6
40. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015;29(10):2062-2068. doi:10.1038/leu.2015.212
41. Jagasia M, Zeiser R, Arbushites M, Delaite P, Gadbar B, Bubnoff N Von. Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GVHD: An introduction to the REACH trials. *Immunotherapy*. 2018;10(5):391-402. doi:10.2217/imt-2017-0156
42. Jagasia M, Perales M-A, Schroeder MA, et al. *Ruxolitinib for the Treatment of Steroid-Refractory Acute GVHD (REACH1): A Multicenter, Open-Label Phase 2 Trial*. Vol 135.; 2020. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/20/1739/1728299/bloodbld2020004823.pdf>
43. Levine JE, Logan B, Wu J, et al. Graft-versus-host disease treatment: Predictors of survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(12):1693-1699. doi:10.1016/j.bbmt.2010.05.019
44. Zeiser R, Ram R, Foley SR, et al. Study Design of a Phase 3, Randomized, Open-Label, Multicenter Study to Evaluate Ruxolitinib Over BAT in Patients with Corticosteroid-Refractory Chronic Graft vs Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (REACH-3). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(3):S208. doi:10.1016/j.bbmt.2017.12.176
45. Zeiser R, Polverelli N, Ram R, et al. Ruxolitinib (RUX) Vs Best Available Therapy (BAT) in Patients with Steroid-Refractory/Steroid-Dependent Chronic Graft-Vs-Host Disease (cGVHD): Primary Findings from the Phase 3, Randomized REACH3 Study. *Blood*. 2020;136(Supplement 1):22-24. doi:10.1182/blood-2020-137694
46. Zeiser R, Polverelli N, Ram R, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2021;385(3):228-238. doi:10.1056/NEJMoa2033122

47. Zeng G, Jin L, Ying Q, et al. Regulatory t cells in cancer immunotherapy: Basic research outcomes and clinical directions. *Cancer Manag Res.* 2020;12:10411-10421. doi:10.2147/CMAR.S265828
48. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201(5):723-735. doi:10.1084/jem.20041982
49. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. T regulatory lymphocytes: subpopulations, mechanism of action and importance in the control of autoimmunity. *Rev Colomb Reumatol.* 2011;18(3):203-220. doi:10.1016/S0121-8123(11)70054-8
50. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, Saka, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):981-985. doi:10.1126/science.1079490
51. Wan YY, Flavell RA. “Yin-Yang” functions of transforming growth factor- $\beta$  and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev.* 2007;220(1):199-213. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x
52. Hsieh CS, Lee HM, Lio CWJ. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):157-167. doi:10.1038/nri3155
53. Dhamne C, Chung Y, Alousi AM, Cooper LJN, Tran DQ. Peripheral and thymic Foxp3+ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front Immunol.* 2013;4(AUG):1-11. doi:10.3389/fimmu.2013.00253
54. Gliwiński M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Trzonkowski P. Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells. *BioDrugs.* 2017;31(4):335-347. doi:10.1007/s40259-017-0228-3
55. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity.* 2007;27(4):635-646. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014
56. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp*

- Med.* 2007;204(6):1257-1265. doi:10.1084/jem.20062512
57. Chávez Sánchez FR, Rojas-Lemus M, Fortoul van der Goes TI, et al. Revista de la Facultad de Medicina de la Unam. *Rev la Fac Med.* 2017;60(5):36-44.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422017000500036](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000500036)
  58. Elias S, Rudensky AY. Therapeutic use of regulatory T cells for graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2019;187(1):25-38. doi:10.1111/bjh.16157
  59. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2055-2066.  
doi:10.1056/nejmoa1108188
  60. Singh K, Stempora L, Harvey RD, et al. Superiority of rapamycin over tacrolimus in preserving nonhuman primate treg half-life and phenotype after adoptive transfer. *Am J Transplant.* 2014;14(12):2691-2703.  
doi:10.1111/ajt.12934
  61. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, et al. Massive ex Vivo Expansion of Human Natural Regulatory T Cells (Tregs) with Minimal Loss of in Vivo Functional Activity. *Sci Transl Med.* 2011;3(83):83ra41-83ra41.  
doi:10.1126/scitranslmed.3001809
  62. Okubo Y, Mera T, Wang L, Faustman DL. Homogeneous Expansion of Human T-Regulatory Cells Via Tumor Necrosis Factor Receptor 2. *Sci Rep.* 2013;3(1):3153. doi:10.1038/srep03153
  63. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, et al. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant.* 2011;11(6):1148-1157. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x
  64. Duramad O, Laysang A, Li J, Ishii Y, Namikawa R. Pharmacologic Expansion of Donor-Derived, Naturally Occurring CD4 +Foxp3 + Regulatory T Cells Reduces Acute Graft-versus-Host Disease Lethality Without Abrogating the Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(8):1154-1168. doi:10.1016/j.bbmt.2010.11.022
  65. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive

- T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
66. Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca LI, et al. Treatment with bortezomib of human CD4+ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population. *Haematologica.* 2009;94(7):975-983. doi:10.3324/haematol.2008.005017
67. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008;38(6):1654-1663. doi:10.1002/eji.200838105
68. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood.* 2016;127(5):646-657. doi:10.1182/blood-2015-10-672345
69. Ramlal R, Hildebrandt GC. Advances in the use of regulatory T-cells for the prevention and therapy of Graft-vs.-Host disease. *Biomedicines.* 2017;5(2):2-8. doi:10.3390/biomedicines5020023
70. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;106(8):2903-2911. doi:10.1182/blood-2005-03-1257
71. Xhaard A, Moins-Teisserenc H, Busson M, et al. Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(8):1089-1092. doi:10.1038/bmt.2014.105
72. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood.* 2006;108(4):1291-1297. doi:10.1182/blood-2006-02-003996
73. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4+CD25+ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med.* 2001;193(11):1311-1317. doi:10.1084/jem.193.11.1311
74. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp*

- Med.* 2002;196(3):401-406. doi:10.1084/jem.20020090
75. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4 +CD25 + immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 2002;99(10):3493-3499. doi:10.1182/blood.V99.10.3493
  76. Hannon M, Lechanteur C, Lucas S, et al. Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Transfusion.* 2014;54(2):353-363. doi:10.1111/trf.12279
  77. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003;9(9):1144-1150. doi:10.1038/nm915
  78. Meyer EH, Laport G, Xie BJ, et al. Transplantation of donor grafts with defined ratio of conventional and regulatory T cells in HLA-matched recipients. *JCI Insight.* 2019;4(10). doi:10.1172/jci.insight.127244
  79. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011;117(14):3921-3928. doi:10.1182/blood-2010-10-311894
  80. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood.* 2014;124(4):638-644. doi:10.1182/blood-2014-03-564401
  81. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: Safety profile and detection kinetics. *Blood.* 2011;117(3):1061-1070. doi:10.1182/blood-2010-07-293795
  82. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: Kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood.* 2016;127(8):1044-1051. doi:10.1182/blood-2015-06-653667
  83. Ganguly S, Ross DB, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Donor CD4+Foxp3+regulatory T cells are necessary for posttransplantation

- cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*. 2014;124(13):2131-2141. doi:10.1182/blood-2013-10-525873
84. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013;5(211):1-13. doi:10.1126/scitranslmed.3006960
85. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: 1. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 1996;88(8):3230-3239. doi:10.1182/blood.v88.8.3230.bloodjournal8883230
86. Anderson BE, McNiff J, Yan J, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2003;112(1):101-108. doi:10.1172/JCI17601
87. Al. PD et. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825-828.
88. Greinix HT, Loddenkemper C, Pavletic SZ, et al. Diagnosis and Staging of Chronic Graft-versus-Host Disease in the Clinical Practice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(2):167-175. doi:10.1016/j.bbmt.2010.07.017
89. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. Pathology working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(1):31-47. doi:10.1016/j.bbmt.2005.10.023
90. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol*. Published online 2021:1-10. doi:10.1002/eji.202149318
91. Sjaastad LE, Owen DL, Tracy SI, Farrar MA. Phenotypic and Functional Diversity in Regulatory T Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(September):1-19. doi:10.3389/fcell.2021.715901
92. Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, et al. Phenotypic and functional properties of Helios + regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7(3):1-10.

- doi:10.1371/journal.pone.0034547
93. Riella L V., Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2575-2587.  
doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x
  94. Tan CL, Kuchroo JR, Sage PT, et al. PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *J Exp Med.* 2021;218(1).  
doi:10.1084/JEM.20182232
  95. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1524-1528. doi:10.1073/pnas.0910341107
  96. Gu J, Ni X, Pan X, et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(6):521-528. doi:10.1038/cmi.2016.30
  97. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25 high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 2006;108(13):4260-4267. doi:10.1182/blood-2006-06-027409
  98. Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, et al. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut.* 2016;65(4):584-594. doi:10.1136/gutjnl-2014-306919
  99. Tan MCB, Goedegebuure PS, Belt BA, et al. Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *J Immunol.* 2009;182(3):1746-1755.  
doi:10.4049/jimmunol.182.3.1746
  100. Schreder A, Moschovakis GL, Halle S, et al. Differential Effects of Gut-Homing Molecules CC Chemokine Receptor 9 and Integrin- $\beta$ 7 during Acute Graft-versus-Host Disease of the Liver. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(12):2069-2078. doi:10.1016/j.bbmt.2015.08.038
  101. Parampalli Yajnanarayana S, Stübiger T, Cornez I, et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. *Br J*

- Haematol.* 2015;169(6):824-833. doi:10.1111/bjh.13373
102. Ramos TL, García-Guerrero E, Caballero-Velázquez T, et al. Delayed administration of ixazomib modifies the immune response and prevents chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2021;(March):1-10. doi:10.1038/s41409-021-01452-1
  103. Inamoto Y, Lee SJ, Onstad LE, et al. Refined National Institutes of Health response algorithm for chronic graft-versus-host disease in joints and fascia. *Blood Adv.* 2020;4(1):40-46. doi:10.1182/bloodadvances.2019000918
  104. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med.* 2001;79(11):631-640. doi:10.1007/s001090100271
  105. Heine A, Held SAE, Daecke SN, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood.* 2013;122(7):1192-1202. doi:10.1182/blood-2013-03-484642
  106. Hülsdünker J, Ottmüller KJ, Neeff HP, et al. Neutrophils provide cellular communication between ileum and mesenteric lymph nodes at graft-versus-host disease onset. *Blood.* 2018;131(16):1858-1869. doi:10.1182/blood-2017-10-812891
  107. Covington M, He X, Scuron M, et al. Preclinical characterization of itacitinib (INCB039110), a novel selective inhibitor of JAK1, for the treatment of inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol.* 2020;885:173505. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173505
  108. Courtois J, Ritacco C, Dubois S, et al. Itacitinib prevents xenogeneic GVHD in humanized mice. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(11):2672-2681. doi:10.1038/s41409-021-01363-1
  109. Schroeder MA, Jean Khoury H, Jagasia M, et al. A phase 1 trial of itacitinib, a selective JAK1 inhibitor, in patients with acute graft-versus-host disease. *Blood Adv.* 2020;4(8):1657-1669. doi:10.1182/bloodadvances.2019001043
  110. Choi J, Cooper ML, Staser K, et al. Baricitinib-induced blockade of interferon

- gamma receptor and interleukin-6 receptor for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2018;32(11):2483-2494.  
doi:10.1038/s41375-018-0123-z.Baricitinib-induced
111. Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1800-1810. doi:10.1056/NEJMoa1917635
  112. Hurabielle C, Sicre de Fontbrune F, Moins-Teisserenc H, et al. Efficacy and tolerance of ruxolitinib in refractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol*. 2017;177(5):42-49. doi:10.1111/bjd.15593
  113. Jaglowski SM, Blazar BR. How ibrutinib, a B-cell malignancy drug, became an FDA-approved second-line therapy for steroid-resistant chronic GVHD. *Blood Adv*. 2018;2(15):2012-2019. doi:10.1182/bloodadvances.2018013060
  114. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):55. doi:10.1186/s13045-017-0417-z
  115. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol*. 2021;0:1-10. doi:10.1002/EJI.202149318
  116. Thornton AM, Lu J, Korty PE, et al. Helios + and Helios – Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur J Immunol*. 2019;49(3):398-412. doi:10.1002/eji.201847935
  117. Salvany-Celades M, van der Zwan A, Benner M, et al. Three Types of Functional Regulatory T Cells Control T Cell Responses at the Human Maternal-Fetal Interface. *Cell Rep*. 2019;27(9):2537-2547.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.109
  118. Chikuma S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:99-126. doi:10.1007/82\_2017\_61
  119. Tekguc M, Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(30). doi:10.1073/PNAS.2023739118

120. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:107-137. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.21.120601.140946
121. Prince HE, York J, Jensen ER. Phenotypic comparison of the three populations of human lymphocytes defined by CD45RO and CD45RA expression. *Cell Immunol.* 1992;145(2):254-262. doi:10.1016/0008-8749(92)90329-N
122. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, et al. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol.* 2003;31(10):897-902. doi:10.1016/S0301-472X(03)00198-X
123. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;106(9):3300-3307. doi:10.1182/blood-2005-04-1632
124. Aoyama K, Saha A, Tolar J, et al. Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration. *Blood.* 2013;122(12):2125-2134. doi:10.1182/blood-2012-11-470252
125. Chen X, Dodge J, Komorowski R, Drobyski WR. A critical role for the retinoic acid signaling pathway in the pathophysiology of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2013;121(19):3970-3980. doi:10.1182/blood-2012-08-445130
126. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity.* 2010;33(2):153-165. doi:10.1016/J.IMMUNI.2010.08.004
127. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352>. 2018;36:411-433. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053352
128. Yao Z, Kanno Y, Kerényi M, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood.* 2007;109(10):4368-4375. doi:10.1182/blood-2006-11-055756
129. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation 1. *Biochem J.*

- 2003;374:1-20.
130. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 2006;108(5):1571-1579. doi:10.1182/blood-2006-02-004747
  131. Hefazi M, Bolivar-Wagers S, Blazar BR. Regulatory T Cell Therapy of Graft-versus-Host Disease: Advances and Challenges. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):9676. doi:10.3390/ijms22189676
  132. Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A. Ex vivo expansion of CD4 + CD25 + T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytom Part A*. 2009;75A(3):175-188. doi:10.1002/cyto.a.20659
  133. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol*. 2009;133(1):22-26. doi:10.1016/j.clim.2009.06.001
  134. Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015;17(4):473-486. doi:10.1016/j.jcyt.2014.11.005
  135. Mikulska M, Raiola AM, Galaverna F, et al. Pre-Engraftment Bloodstream Infections after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Impact of T Cell-Replete Transplantation from a Haploidentical Donor. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(1):109-118. doi:10.1016/j.bbmt.2017.08.024
  136. Balletto E, Mikulska M. Bacterial infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015;7(1). doi:10.4084/MJHID.2015.045
  137. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, et al. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant*. 2011;11(6):1148-1157. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x
  138. Escamilla Gómez V, García-Gutiérrez V, López Corral L, et al. Ruxolitinib in refractory acute and chronic graft-versus-host disease: a multicenter survey study.

- Bone Marrow Transplant.* 2020;55(3):641-648. doi:10.1038/s41409-019-0731-x
139. Zhong J, Zhang X, Liu M. The efficacy and safety of lenalidomide in the treatment of multiple myeloma patients after allo-hematopoietic stem-cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med.* 2021;10(7):7736-7746. doi:10.21037/apm-21-1598
140. Narkhede M, Mehta A, Ansell SM, Goyal G. CAR T-cell therapy in mature lymphoid malignancies: clinical opportunities and challenges. *Ann Transl Med.* 2021;9(12):1036-1036. doi:10.21037/atm-20-5546
141. Cutler C, Lee SJ, Arai S, et al. Belumosudil for chronic graft-versus-host disease after 2 or more prior lines of therapy: the ROCKstar Study. *Blood.* 2021;138(22):2278-2289. doi:10.1182/blood.2021012021
142. Lazaryan A, Lee S, Arora M, et al. A phase 2 multicenter trial of ofatumumab and prednisone as initial therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood Adv.* 2022;6(1):259-269. doi:10.1182/bloodadvances.2021005552



