

PROTOCOLO

TÍTULO:

Modelo de interacción célula NK-célula tumoral en el neuroblastoma de alto riesgo: 2019-2023

Código de protocolo: NK - HRNBL / 2019

Versión: 1

Fecha: 29 – noviembre -2019

EudraCT: No disponible

PROMOTOR: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

INVESTIGADOR PRINCIPAL/COORDINADOR:

Mar Bermúdez Cortés / José L Fuster Soler

CONFIDENCIAL

Este documento contiene información confidencial que no debe ser divulgada o publicada a otras personas distintas de los investigadores clínicos, miembros de los Comités de Ética de Investigación Clínica de los centros hospitalarios participantes y Autoridades Sanitarias Español

1. RESUMEN

El estudio "Modelo de interacción célula NK-célula tumoral en el neuroblastoma de alto riesgo: 2019-2023", cuyo promotor es el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y cuya investigadora principal es Mar Bermúdez Cortés, se propone investigar prospectivamente la interacción entre las células *natural killer* (NK) de los pacientes pediátricos diagnosticados de neuroblastoma de alto riesgo y las células tumorales, con el objetivo de identificar los factores relacionados con la respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-GD2 (dinutuximab). Se trata de un estudio prospectivo, abierto y observacional en el que se incluirán pacientes pediátricos con diagnóstico de neuroblastoma de alto riesgo que reciban tratamientos estandarizados que incluyan el empleo de anticuerpos monoclonales anti-GD2. Se analizarán variables demográficas, clínicas, biológicas y variables relacionadas con la respuesta al tratamiento. Se aplicarán técnicas estadísticas aceptadas para la comparación de variables ("t" de student, "U" de Mann-Whitney, " χ^2 ") y se aplicará el método de Kaplan-Meyer para generar curvas de supervivencia que se compararán mediante el test log-rank.

2. ÍNDICE

	Página
INFORMACIÓN GENERAL	4
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVO Y FINALIDAD DEL ESTUDIO	6
DISEÑO DEL ESTUDIO	8
POBLACIÓN DEL ESTUDIO	10
TRATAMIENTO DE LOS SUJETOS	11
VARIABLES DEL ESTUDIO	12
SEGUIMIENTO DE LOS SUJETOS	15
VALORACIÓN DE LA SEGURIDAD	16
ESTADÍSTICA	16
ÉTICA	19
CONSENTIMIENTO INFORMADO	19
ACCESO DIRECTO A LOS DATOS/DOCUMENTOS FUENTE	20
MANEJO DE LOS DATOS Y ARCHIVO DE LOS REGISTROS	20
PROTECCIÓN DE LOS DATOS	21
FINANCIACIÓN Y SEGUROS	21
POLÍTICA DE PUBLICACIÓN	21
BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXOS	22

3. LISTA DE SIGLAS Y DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

BPC	Buena práctica clínica
CRD	Cuaderno de recogida de datos
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígenos leucocitarios humanos)
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i> (receptores de células NK)
NK	<i>Natural killer</i> (asesinas naturales)

4. INFORMACIÓN GENERAL

4.1. Identificación del estudio

Título: "Modelo de interacción célula NK-célula tumoral en el neuroblastoma de alto riesgo: 2019-2023".

Acronimo (si procede): "NK - HRNBL / 2019".

Versión: 1

Fecha: 29 de noviembre de 2019

Nº Eudra CT: No disponible

4.2. Tipo de estudio

Estudio prospectivo, abierto y observacional.

4.3. Promotor

Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Sección de Oncohematología pediátrica)

Ctra. Madrid - Cartagena, s/n, El Palmar 120, Murcia, España

Teléfonos: 968 36 90 82 / 968 36 92 97 / 667743290

Correo electrónico: mariam.bermudez2@carm.es; josel.fuster@carm.es; alfredo.minguela@carm.es

4.4. Investigadores.

. Investigadora principal responsable de la realización del estudio: Mar Bermúdez Cortés, médico adjunto de la sección de oncohematología pediátrica del hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (mariam.bermudez2@carm.es).

. Investigadores principales de otros centros: Aún por determinar.

. Otros investigadores del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca:

- José Luis Fuster Soler, jefe de la Sección de Oncohematología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (josel.fuster@carm.es)

- Alfredo Minguela Puras. Jefe Sección del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (alfredo.minguela@carm.es)

- Mercedes Plaza Fornieles, médico adjunto de la Sección de Oncohematología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (mercedes.plaza@carm.es)

4.5. Médicos responsables de las decisiones médicas

Se trata de un estudio observacional en el que los investigadores no intervienen en el tratamiento de los pacientes.

4.6. Nombre y direcciones de los laboratorios clínicos y los departamentos médicos o técnicos u otras instituciones implicadas en el ensayo.

- . Laboratorio de Inmunología del hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid – Cartagena, s/n, El Palmar 120, Murcia, España.
- . Servicio de Inmunología del hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid – Cartagena, s/n, El Palmar 120, Murcia, España.
- . Sección de Oncohematología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid – Cartagena, s/n, El Palmar 120, Murcia, España

5. JUSTIFICACIÓN

Los tumores neuroblásticos son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes en la infancia y son los responsables de un 10% de la mortalidad por cáncer en niños. Los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo tienen sólo un 40% de posibilidades de sobrevivir a los 5 años tras el diagnóstico con estrategias convencionales de tratamiento. (1) La asociación de la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-GD2 mejoró el pronóstico de estos pacientes de forma significativa y, en combinación con la terapia diferenciadora con isotretinoína, se considera actualmente la terapia estándar de mantenimiento. (2, 3) A pesar de ello, el tratamiento con anticuerpos anti-GD2 es costoso, tiene efectos tóxicos y muchos pacientes siguen sufriendo recaídas. Por tanto, no todos los pacientes obtienen el mismo beneficio de la inmunoterapia. (2, 4) La variabilidad en la presentación clínica del neuroblastoma y la respuesta a la inmunoterapia pueden reflejar, al menos en parte, las diferencias entre individuos de la función inmune. (5) Estudios preclínicos sugieren que el mecanismo más importante del efecto antitumoral de la inmunoterapia en el neuroblastoma de alto riesgo se encuentra relacionado con la citotoxicidad dependiente de anticuerpos desarrollada por las células asesinas naturales (*natural killer*, NK). (6) Algunos estudios demuestran que disponer de una población de células NK "no licenciadas" o "no educadas" (células que carecen

de al menos un receptor KIR inhibitorio) mejora la actividad antitumoral cuando el ligando correspondiente se expresa en el microambiente tumoral. (7-10) Otros estudios revelan que los pacientes con neuroblastoma que carecen al menos de algún ligando específico para su receptor KIR inhibitorio obtienen mejores resultados del tratamiento que los que han heredado todos los ligandos para los receptores inhibitorios. (11-14) Sin embargo, en un extenso estudio del grupo colaborativo americano *Children's Oncology Group* (COG), no se encontró asociación entre la presencia o ausencia de ligandos específicos y la supervivencia global y libre de evento. (4) Todas estas hipótesis asumen que las células tumorales expresarían los ligandos heredados y todos estos estudios se basan únicamente en los resultados de los genotipos de los pacientes y no en la expresión de los ligandos en la célula tumoral. (4, 14) Por tanto, parece justificado el estudio de la expresión de los receptores en las células NK y la expresión de sus ligandos en la célula tumoral, independientemente de los resultados de los estudios de genotipo.

En el presente estudio nos proponemos, mediante un estudio multicéntrico nacional español, contribuir al conocimiento del papel de la actividad antitumoral mediada por las células NK en el neuroblastoma de alto riesgo. Este estudio no se propone investigar la utilidad o toxicidad de ningún fármaco y no supone ningún riesgo o beneficio adicional al tratamiento estándar de los pacientes. El estudio se desarrollará de acuerdo con el protocolo de Buena Práctica Clínica (BPC) y los requisitos legales pertinentes.

La población de estudio estará compuesta por los pacientes pediátricos con diagnóstico de neuroblastoma de alto riesgo que reciban un esquema de tratamiento que contemple la administración de dinutuximab (o un anticuerpo monoclonal anti-GD2 alternativo a dinutuxumab) en los hospitales participantes en el presente estudio desde la apertura del mismo hasta el 31/12/2023, que hayan consentido previamente su participación en el estudio y la cesión de sus datos al registro del estudio o recomendación terapéutica vigente en el momento del diagnóstico.

Las referencias de la literatura que proporcionan la justificación para el estudio se incluyen en el apartado 21 de bibliografía (página 21)

6. OBJETIVO Y FINALIDAD DEL ESTUDIO

La introducción de la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-GD2 mejoró el pronóstico de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo. Se trata de un tratamiento costoso, con efectos tóxicos y no todos los pacientes obtienen el mismo

beneficio de la inmunoterapia. Los estudios preclínicos sugieren que el mecanismo más importante del efecto antitumoral de la inmunoterapia en el neuroblastoma de alto riesgo se relaciona con la citotoxicidad dependiente de anticuerpos desarrollada por las células NK. Los estudios clínicos publicados se han basado en los genotipos de los pacientes y ofrecen resultados dispares en relación con la asociación de la presencia o ausencia de ligandos específicos de los receptores de las células NK y los resultados del tratamiento. Parece por tanto justificado el estudio de la expresión de los receptores en las células NK y la expresión de sus ligandos en las células tumorales. En el presente estudio nos proponemos, mediante un estudio multicéntrico nacional español, contribuir al conocimiento del papel de la actividad antitumoral mediada por las células NK en el neuroblastoma de alto riesgo estudiando no solo el perfil genético de los pacientes, sino también la expresión de receptores y ligandos y la actividad citolítica *in vitro* mediante ensayos de citotoxicidad.

6.1. Objetivo principal.

1. Determinar en el paciente el perfil genético y la expresión de moléculas que regulan la función de las células NK (receptores KIR) y la de sus ligandos HLA-I, así como la expresión de moléculas co-activadoras (DNAM-1) y co-inhibidoras (TIGIT y NKG2A) en células T y NK.

6.2. Objetivos secundarios.

1. Cuando sea posible obtener células tumorales viables en suspensión mediante disgregación mecánica/enzimática de un fragmento del tumor o por infiltración en médula ósea, se analizará:
 - a. La expresión de ligandos para la interacción con las células NK: HLA-I, HLA-C, MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112.
 - b. La expresión de marcadores inmunofenotípicos: CD10, CD34, CD36, CD56, CD81, CD99, CD271 Epcam, y Myogenina.
 - c. La expresión de ligandos *anti-check points*: CD80, CD86 y PDL1.
 - d. La expresión de moléculas activadoras e inhibidoras en células T y NK infiltrantes para compararla con la de sangre periférica.
 - e. La actividad citolítica antitumoral de las células NK de sangre periférica frente a las células tumorales (ensayo de citotoxicidad).

2. Relacionar los datos experimentales con la respuesta al tratamiento y la evolución clínica de los pacientes.

7. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional en el que los investigadores no intervienen en el tratamiento de los pacientes.

Las variables que se evaluarán son:

1. Variables demográficas y datos clínicos: edad, estadio de la enfermedad, respuesta al tratamiento, fecha de finalización del tratamiento, fecha de recaída, fecha de fallecimiento o fecha de último contacto.
2. Variables biológicas: categoría histológica del neuroblastoma, grado de diferenciación tumoral, amplificación NMYC, aberración 11q, ploidía, perfil genético de receptores KIR, de los ligandos HLA-I de los pacientes, expresión de los ligandos de los receptores NK y otros marcadores en células T y NK en sangre periférica, en linfocitos T y NK infiltrantes y en las células tumorales y actividad citolítica antitumoral de las células NK de sangre periférica frente a las células tumorales.

La duración de la participación de los pacientes en este estudio incluye la fase de tratamiento y un periodo de seguimiento hasta la fecha de cierre de la recogida de datos estimada a lo largo del año 2024 (la fecha de finalización del estudio podría aplazarse en función del ritmo de reclutamiento y los resultados de los análisis preliminares).

Los criterios de finalización de la participación de los pacientes en el estudio son: retirada del consentimiento o incumplimiento retroactivo de los criterios de inclusión/exclusión.

El estudio se desarrollará a lo largo de los siguientes periodos:

1. Diagnóstico y recogida de muestras desde el 1/01/2020 hasta el 31/12/2023. Durante esta fase se analizarán las variables biológicas en muestras de sangre, de médula ósea y del tumor primario de los pacientes.

2. Análisis estadístico de los resultados y correlación con los datos clínicos. Desde el 1/01/2020 hasta la fecha de cierre de la recogida de datos a lo largo del año 2024 (la fecha de finalización del estudio podría aplazarse en función del ritmo de reclutamiento y los resultados de los análisis preliminares).
3. Elaboración y publicación de los resultados y conclusiones a lo largo del año 2024.

Tabla 1. Esquema del estudio

Tareas	3 años											
	Cuatrimestres											
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
Reclutamiento de pacientes	x	x	x	x	x	x						
Evaluación de la enfermedad	x	x	x	x	x	x						
Análisis de las variables biológicas	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Seguimiento clínico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	
Análisis de datos y elaboración manuscritos								x	x	x	x	x

Una vez que el individuo haya firmado el documento de consentimiento informado del estudio y se haya verificado que cumple todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se considerará que es elegible para ser incluido en el estudio. Se le asignará a cada paciente un código numérico individual de manera consecutiva a medida que se incluyan en el ensayo. Los datos recogidos de cada paciente se almacenarán en una hoja de recogida de datos bajo dicho código de identificación. Los investigadores responsables de cada centro participante conservarán un listado confidencial que servirá para relacionar los códigos de identificación de los pacientes con sus datos personales. Esta lista será accesible sólo al investigador(a) principal y personal autorizado. Los archivos personales de los pacientes podrán ser revisados por personal autorizado (monitores, auditores e inspectores del estudio).

Se definen como "datos fuente" los documentos originales y archivos de los pacientes y pueden ser revisados por monitores para su verificación. De acuerdo con la normas de BPC, el investigador principal permitirá el acceso a los datos fuente a monitores y auditores del estudio, a cualquier otras persona autorizada por el promotor y a representantes de las autoridades competentes.

Por tratarse de un estudio observacional no se contempla ningún procedimiento de aleatorización.

El reclutamiento de los pacientes en cada centro será de tipo competitivo.

Técnicas de enmascaramiento

Se trata de un estudio abierto observacional en el que no se contemplan técnicas de enmascaramiento.

8. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Definición de la población en estudio

La población de estudio estará compuesta por todos los pacientes pediátricos (edad < 18 años) con diagnóstico de neuroblastoma de alto riesgo que reciban un esquema de tratamiento que contemple la administración de dinutuximab (o un anticuerpo monoclonal anti-GD2 alternativo a dinutuximab) en los hospitales participantes en el presente estudio desde la apertura del mismo hasta el 31/12/2023, que hayan consentido previamente su participación en el estudio y la cesión de sus datos al registro del estudio o protocolo de recomendación terapéutica vigente en el momento del diagnóstico. Se define como neuroblastoma de alto riesgo los neuroblastomas en estadio INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) 2, 3, 4 o 4s con amplificación *NMYC* y los neuroblastoma de estadios 4 sin amplificación *NMYC* y edad \geq 12 meses.

Criterios de inclusión.

1. Edad < 18 años en el momento del diagnóstico del neuroblastoma.
2. Diagnóstico de neuroblastoma de alto riesgo: neuroblastoma en estadio 2, 3, 4 o 4s de la clasificación INSS con amplificación *NMYC* y los neuroblastoma de estadios 4 sin amplificación *NMYC* y edad \geq 12 meses.
3. Pacientes incluidos en protocolos de tratamiento que incluyan la administración de anticuerpos monoclonales anti-GD2.
4. Firma voluntaria del representante o tutor legal del consentimiento informado antes de la primera intervención del estudio. En el caso de menores maduros (mayores de 12 años), además del consentimiento firmado por el tutor legal, se obtendrá el asentimiento del menor.

Criterios de exclusión.

1. Incumplimiento de los criterios de inclusión.
2. Pacientes que sean considerados por el investigador responsable en cada centro como no aptos para el estudio (situación socio-familiar que imposibilite la correcta participación en el estudio o imposibilidad para comprender la información sobre el estudio).

Abandono y sustitución de pacientes.

Los sujetos pueden retirarse en cualquier momento, con o sin motivos, y sin perjuicio para ellos. El sujeto participante en el estudio puede revocar su consentimiento en cualquier momento sin expresión de causa y sin que por ello se derive para el sujeto participante responsabilidad ni perjuicio alguno. Los individuos que abandonen el estudio no se someterán a un seguimiento adicional ni serán sustituidos. El investigador puede retirar a un sujeto del estudio si considera que este ya no puede cumplir con la totalidad de los requisitos del mismo o si alguno de los procedimientos se considera posiblemente nocivo para él. Los datos que ya se hayan recogido sobre los sujetos retirados se conservarán y usarán para el análisis, pero no se recogerán datos nuevos después de la retirada.

Criterios de retirada

Serán retirados del estudio a aquellos pacientes que cumplan alguno de estos criterios:

- Presencia de acontecimiento adverso que a criterio del investigador implique la retirada del paciente
- Desviación del protocolo que afecte a la interpretación de los resultados del estudio y a su validez científica.
- Decisión facultativa.
- Renuncia del individuo a continuar en el estudio.
- Pérdida de seguimiento.

9. TRATAMIENTO DE LOS SUJETOS

Se trata de un estudio observacional que no interviene en el tratamiento de los pacientes. Los pacientes recibirán tratamiento protocolizados basados en guías de

recomendación terapéuticas activas o ensayos clínicos alternativos al presente estudio. Dichas guías deben contemplar la administración de anticuerpos monoclonales anti-GD2 como parte del tratamiento. Los procedimientos para monitorizar el cumplimiento de dichos tratamiento deben ir especificados en las guías de tratamiento o ensayo clínico aplicado en cada caso.

Al tratarse de un estudio observacional, no se contempla ningún procedimiento de suministro o gestión de medicación/producto en investigación.

Tratamientos previos y concomitantes.

Cualquier tratamiento farmacológico que se realice durante el periodo experimental deberá ser registrado en el CRD. El investigador principal del estudio juzgará la idoneidad de la continuidad del participante en el mismo. Explícitamente no se permitirá la toma de medicamentos u otros tratamientos que puedan modificar los efectos biológicos de los productos en investigación.

Medicación de rescate.

Dado las características del estudio, no se contempla el uso de medicación de rescate.

Evaluación del cumplimiento.

Al tratarse de un estudio observacional, no se contempla ningún procedimiento de evaluación de cumplimiento.

10. VARIABLES DEL ESTUDIO

Variables demográficas y datos clínicos: edad, estadio de la enfermedad, respuesta al tratamiento, fecha de finalización del tratamiento, fecha de recaída, fecha de fallecimiento o fecha de último contacto.

Variables biológicas: categoría histológica del neuroblastoma, grado de diferenciación tumoral, amplificación NMYC, aberración 11q, ploidía, perfil genético de receptores KIR, de los ligandos HLA-I de los pacientes, expresión de los ligandos de los receptores NK y otros marcadores en células T y NK en sangre periférica, en linfocitos T y NK infiltrantes y en las células tumorales y actividad citolítica antitumoral de las células NK de sangre periférica frente a las células tumorales.

Metodología

Todo el trabajo experimental se llevará a cabo en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia siguiendo la metodología que se describe a continuación por objetivos.

Objetivo 1. Determinar en el paciente el perfil genético y la expresión de moléculas que re-regulan la función de las células NK (receptores KIR) y la de sus ligandos HLA-I, así como la expresión de moléculas co-activadoras (DNAM-1) y co-inhibidoras (TIGIT y NKG2A) en células T y NK.

Las doctoras Gimeno y Moya son expertas en estudios de inmunogenética y los doctores Minguela y Campillo en el estudio de inmunofenotipo. Con el apoyo de una bióloga financiada por el proyecto desarrollarán la metodología necesaria para completar este objetivo.

La genotipificación HLA-A, -B, -C y KIR se hará en muestras de ADN extraídas con el kit QIAmp DNA Blood Mini (QIAGEN, GmbH, Alemania) utilizando PCR oligonucleótido específico de secuencia (PCR-SSO) y tecnología Luminex® de Lifecodes HLA-SSO y KIR-SSO (Immucor Transplant Diagnostic, Inc. Stamford, CT, EE. UU). El genotipado de HLA-C permitirá distinguir entre los alelos HLA-CAsn80 (grupo C1) y HLA-CLys80 (grupo C2). Los genotipos HLA-A y -B nos permitirán distinguir los alelos portadores del motivo Bw4 según las secuencias de aminoácidos en las posiciones 77-83 en el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada HLA de clase I, así como la metionina/treonina (M/T) dimorfismo en la posición -21 de la secuencia líder de alotipos HLA-B. El genotipado KIR permitirá la identificación de receptores KIR-inhibidores (2DL1-L3 / 2DL5 y 3DL1-L3) y KIR-activadores (2DS1-S5 y 3DS1), así como KIR2DL4, que tiene tanto potencial inhibidor como activador. No será posible distinguir entre KIR2DL5A y KIR2DL5B. Los genotipos KIR se clasificarán en genotipos A y B.

El estudio de la expresión de receptores KIR se realizará mediante citometría de flujo multiparamétrica en muestras de sangre periférica utilizando un citómetro digital de 14 detectores y 3 láseres para marcar conjuntamente los antígenos CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD158a (KIR2DL1), CD158a/h (KIR2DL1/S1), CD158b2 (KIR2DL3), CD158b1b2j (KIR2DL2/L3/S2), KIR3DL1, CD226, TIGIT y NKG2A en linfocitos T y células NK.

Objetivo 2. Cuando sea posible obtener células tumorales viables en suspensión mediante disgregación mecánica/enzimática de un fragmento del tumor o por

infiltración en médula ósea, se analizará: a) la expresión de ligandos para la interacción con las células NK: HLA-I, HLA-C, MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112; b) la expresión de marcadores inmunofenotípicos: CD10, CD34, CD36, CD56, CD81, CD99, CD271 Epcam, y Myogenina; c) la expresión de ligandos anti-check points: CD80, CD86 y PDL1; d) la expresión de moléculas activadoras e inhibidoras en células T y NK infiltrantes para compararla con la de sangre periférica.

Esta metodología será desarrollada por los doctores Minguela y Campillo con la colaboración de una bióloga financiada por el proyecto. El estudio de la expresión de los ligandos KIR en la célula tumoral se realizará un células obtenidas por disgregación enzimática/mecánica de tejido tumoral (GentleMAC, Miltenyi) o de células infiltrantes de médula ósea, y se realizará mediante citometría de flujo para HLA clase-I (monoclonal W632), HLA-C (monoclonal DT9, cedido por el Prof. Brackenridge) y MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112 (mediante anticuerpos monoclonales adquiridos de RDSytem y Biologend). Además, los tumores serán sometidos a inmunofenotipo CD34, CD36, CD45, CD56, CD81, CD99, CD271, Epcam y Myogenina, y al estudio de expresión de ligandos anti-check points (CD80, CD86 y PD-1L).

Las células T y NK se estudiarán de manera similar a las células T y NK de sangre periférica.

Objetivo 3. La actividad citolítica antitumoral de las células NK de sangre periférica frente a las células tumorales (ensayo de citotoxicidad).

Los doctores Gimeno y Minguela son expertos en cultivos celulares y estudios de la respuesta de células NK *in vitro* y con el apoyo de una bióloga financiada por el proyecto desarrollarán la metodología necesaria para completar este objetivo. La caracterización funcional de las diferentes subclases de células NK KIR⁺ de acuerdo a la expresión de los receptores KIR2DL1 y/o KIR2DS1, KIR2DL2/S2 y KIR2DL3 se realizará mediante un ensayo de citotoxicidad con citometría de flujo en presencia de CFSE/7-AAD, utilizando como células diana células criopreservadas del tumor al diagnóstico y la línea K562. La capacidad citotóxica de las células NK KIR⁺ también se valorará mediante el ensayo de movilización de vesículas a través de la expresión de CD107a en superficie utilizando citometría de flujo. Las células NK KIR⁺ efectoras se utilizarán frescas y activadas con IL-2 (100U/ml) + PHA (1.5ng/ml) purificadas de SP mediante EasySep® Human NK Cell Enrichment Kit (Stem cell).

Valoración de seguridad

Al tratarse de un estudio observacional, no contempla la aplicación de parámetros de seguridad.

11. SEGUIMIENTO DE LOS SUJETOS

El seguimiento se realizará de forma protocolizada en base a las guías de recomendación terapéuticas activas o ensayos clínicos alternativos que se apliquen en cada caso. El presente estudio no interviene en el proceso de seguimiento de los pacientes pero registrará los acontecimientos relevantes relativos a la evolución clínica: fecha de diagnóstico, fecha de recaída si procede, fecha de fallecimiento si procede o fecha de último contacto.

Cronograma de recogida y procesamiento de muestras

	A procesar por el Servicio de Inmunología	A procesar por el Biobanco
Diagnóstico inicial	2 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA para extracción de DNA y realizar genotipado KIR y HLA, así como estudio de expresión de receptores KIR en células T y NK (citometría multiparamétrica)	3 ml de sangre periférica sin anticoagulantes para conservar suero para poder medir factores solubles
Cirugía	2 ml de médula ósea para estudio de inmunofenotipo y expresión de ligandos KIR en los casos con infiltración metastásica del tumor Muestra en fresco de tumor tras la resección para estudio de inmunofenotipo y expresión de ligandos KIR (citometría multiparamétrica)	Muestra en fresco de tumor para criopreservar células tumorales a utilizar en los ensayos funcionales y para conservar muestras de DNA, RNA y pellet celular
6 meses tras finalizar tratamiento	2 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA para estudio de expresión de receptores KIR en células T y NK mediante citometría multiparamétrica.	10-20 ml de sangre periférica anticoagulada con heparina para estudiar la actividad citolítica y antitumoral de las células NK frente a las células tumorales del paciente.

12. VALORACIÓN DE LA SEGURIDAD

Al tratarse de un estudio observacional, no contempla la aplicación de parámetros de seguridad. La especificación de los parámetros de seguridad, los métodos y el calendario para la evaluación, registro y análisis de los parámetros de seguridad, los procedimientos para obtener los informes de los acontecimientos adversos y enfermedades intercurrentes y para el registro y comunicación de los mismos y de las reacciones adversas a los medicamentos que se investigan y el tipo y la duración del seguimiento de los sujetos después de los acontecimientos adversos, se establecerán en las guías de recomendación terapéutica o ensayo clínico aplicado a cada caso.

13. ESTADÍSTICA

Las variables categóricas (cualitativas) serán expresadas mediante porcentajes y serán comparadas mediante tablas de contingencia y la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). Se podría aplicar una corrección conservadora (corrección de Yates) a la prueba de chi-cuadrado en los casos en los que la tabla de contingencia muestre al menos una casilla con valor esperado < 5 . La intensidad de la relación entre las variables nominales se cuantificará mediante el contraste de la Phi y la V de Cramer. Se establecerá un nivel de significación de $p < 0,05$ para todos los contrastes de hipótesis.

Las variables cuantitativas serán testadas para distribución normal utilizando un método gráfico y el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas con distribución normal se expresarán mediante media \pm desviación estándar (DE) y las que sigan distribución no normal se expresarán mediante mediana y rango intercuartílico (RIC). Para las comparaciones de las variables continuas con distribución normal se utilizará la t de Student para muestras independientes previa prueba de Levene para testar homocedasticidad (test de homogeneidad de varianzas). Para las comparaciones de las variables cuantitativas de distribución no normal se utilizará la prueba de U de Mann y Whitney. Se establecerá un nivel de significación de $p < 0,05$ para todos los contrastes de hipótesis.

La supervivencia global se define como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del neuroblastoma y la muerte por cualquier causa. La supervivencia libre de evento se define como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del neuroblastoma y la recaída, no respuesta (se tomará como fecha de evento la fecha del diagnóstico) o la muerte por cualquier causa. La incidencia acumulada de recaída se define como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del neuroblastoma y la recaída. Para analizar la

supervivencia global y libre de evento se generarán curvas de supervivencia aplicando el método de Kaplan-Meier. Para analizar la incidencia acumulada de recaída se generarán curvas de incidencia acumulada aplicando el método de Kalbfleisch-Prentice (o el método de Fine & Gray) considerando como riesgo competitivo el fallecimiento en ausencia de recaída. Se aplicará el test Log-Rank para examinar las diferencias ente las curvas de supervivencia global y libre de evento. Se aplicará el test de Fine & Gray para comparar curvas de incidencia acumulada de recaída.

Se prevé reclutar una mediana de 3 pacientes por centro cada año y en torno a 30 pacientes durante el transcurso de todo el estudio.

Tabla 1. Esquema del estudio

Tareas	3 años											
	Cuatrimestres											
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
Reclutamiento de pacientes	x	x	x	x	x	x						
Evaluación de la enfermedad	x	x	x	x	x	x						
Análisis de las variables biológicas	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Seguimiento clínico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	
Análisis de datos y elaboración manuscritos								x	x	x	x	x

Manejo de datos

Todos los datos relevantes de los sujetos del ensayo se transcribirán con bolígrafo al Cuaderno de Recogida de Datos. Los CRD deben ser rellenados de forma completa y legible para facilitar el posterior procesamiento estadístico. Una vez finalizado el ensayo, se evaluarán todos los datos recogidos en los CRD para la redacción del informe final.

Toda la documentación referente al estudio permanecerá almacenada en el Archivo del Investigador, en el centro participante, bajo custodia del Investigador Principal hasta la finalización del mismo. Una vez finalizado el estudio, la documentación se indexará y pasará al archivo general del centro, cumpliéndose las recomendaciones establecidas con respecto a las Normas de Buena Práctica Clínica.

El investigador principal se ocupará de que los códigos de identificación de los sujetos se conserven durante al menos quince años después de concluido o interrumpido el ensayo.

El promotor o el propietario de los datos conservarán toda la restante documentación relativa al ensayo durante el tiempo que exige la legislación.

Se asegurará, en todo caso, la confidencialidad de los datos y documentos contenidos en el archivo.

Los datos de todos los CRD serán introducidos en una base de datos creada a tal fin y dotada de márgenes de seguridad y normas de coherencia interna. Esta base de datos estará equipada con un sistema de doble entrada y filtros que prevengan y detecten cualquier tipo de inconsistencia o error en la misma.

La información será validada mediante controles internos de consistencia, estudiando los valores perdidos o "*missing*". Los datos serán verificados y corregidos hasta que la base de datos esté completamente validada. Una vez la base de datos sea depurada, las variables se recodificarán generando nuevas variables (reagrupamientos, sumatorios, etc.).

Tamaño muestral

En este estudio no se plantea el impacto de una intervención terapéutica en la población a estudio. Se trata de un estudio observacional para una enfermedad poco frecuente en el que se analizarán múltiples variables cuyo impacto en el curso clínico de los pacientes no se ha analizado previamente por lo que no se ha establecido un tamaño muestral.

Análisis estadístico

Análisis descriptivo

Los datos demográficos y otras características basales de los sujetos del ensayo se describirán mediante índices estadísticos descriptivos, para el global de los pacientes y para cada uno de los grupos de pacientes en estudio.

Las variables continuas se describirán utilizando medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar). Mientras que las variables categóricas se describirán a través de tablas de frecuencia absoluta y relativa.

Las pruebas estadísticas se realizarán dependiendo de la naturaleza de las variables. La comparación de variables categóricas se realizará mediante el test de Chi-Square y la comparación de variables continuas mediante el test t-Student.

14. ÉTICA

Este estudio se realizará en hospitales españoles de acuerdo con la legislación española vigente que regula la realización de ensayos clínicos, para lo que cual se establece este protocolo como documento de referencia para la revisión por parte de los Comités Éticos y de la Agencia Española del Medicamento así como para la toma de decisiones prácticas en el manejo de los pacientes incluidos por parte de los investigadores participantes.

El estudio sólo comenzará tras haber obtenido por escrito la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica.

Con la excepción de aquellas situaciones de emergencia, no se permitirán cambios o desviaciones del protocolo sin la aprobación documentada. El CEIC deberá ser informado de los posibles cambios y aprobará por escrito cualquier cambio o desviación que pueda aumentar los riesgos del sujeto y/o pueda afectar adversamente los derechos del voluntario o la validez de la investigación. Esta estipulación no se aplica a aquellos cambios que se realicen para reducir las molestias o evitar riesgos a los sujetos y a los cambios que afecten a los aspectos administrativos del estudio.

La realización de este estudio respetará en todo momento las normas de Buenas Prácticas Clínicas y la normativa y recomendaciones que figuran en la Declaración de Helsinki y que están recogidas en la legislación vigente sobre la práctica de ensayos clínicos.

15. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Antes de que se lleve a cabo alguna prueba o procedimiento específicos del estudio, se pedirá a los pacientes (o testigo o representante legal) que cumplan los criterios de participación, que firmen el documento de consentimiento informado aprobado por el

Comité Ético. Deberá dárseles tiempo suficiente para que revisen el documento de consentimiento informado y para que se responda a sus preguntas antes de firmar.

Cada individuo será informado de forma oral y por escrito de la metodología del estudio así como de los posibles efectos indeseables que pueden aparecer como consecuencia de las distintas determinaciones que se realizarán. De la misma forma serán informados de la voluntariedad del estudio tanto en lo referido a su participación como en lo referido al abandono en cualquier momento del mismo.

16. ACCESO DIRECTO A LOS DATOS/DOCUMENTOS FUENTE

Se consideran documentos fuente a todos los documentos, datos y registros originales. Todos los datos recogidos para la realización del estudio, tanto para la elaboración de la Historia Clínica del sujeto, como para el resto de documentos del estudio quedarán archivados en los centros participantes, en soporte papel o en formato digital, de acuerdo con los procedimientos de cada centro. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código numérico y solo el investigador principal/colaboradores podrá relacionar dichos datos con el paciente y con su historia clínica. El acceso a la información de los sujetos participantes quedará restringido al médico del estudio y miembros colaboradores del equipo autorizados. El investigador y el centro garantizarán el acceso directo a los datos o documentos fuente al personal autorizado por el promotor (monitor, auditor), a las autoridades sanitarias (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) y al Comité Ético de Investigación Clínica cuando lo precisen.

17. MANEJO DE LOS DATOS Y ARCHIVO DE LOS REGISTROS

Los datos de los pacientes se recogerán en un cuaderno de recogida de datos (CRD). El investigador principal o un sub-investigador del centro deben asegurarse de la exactitud y la integridad de los datos registrados y poner su firma en los CRDs correspondientes.

Cuando la base de datos se haya considerado completa y exacta se cerrará bloqueando la base de datos.

El archivo de todos los documentos relevantes en relación al estudio se realizará según los requisitos del ICH-GCP, la directiva de la Comisión 2005/28/EC de 8 de Abril de 2005, y según las leyes nacionales pertinentes.

18. PROTECCIÓN DE LOS DATOS

Los datos serán incluidos en una base de datos que deberá cumplir con el Reglamento 679/2016, de 27 de abril, Reglamento General de Protección de Datos y Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Asimismo, la transmisión de dichos datos se hará con las medidas de seguridad adecuadas en cumplimiento de dicho reglamento. Durante la documentación y el análisis, los pacientes estarán solamente identificados por su código individual de paciente, mientras todos los nombres de los sujetos serán mantenidos en secreto por el investigador.

Los investigadores están obligados a guardar todos los datos del estudio y de la información confidencial y a usar estos datos solo en el contexto con las personas involucradas en la realización del ensayo. El material del estudio o la información generada en este ensayo no debe estar disponible a terceras partes, excepto por los representantes oficiales del promotor o las autoridades reguladoras.

19. FINANCIACIÓN Y SEGUROS

FINANCIACIÓN: Asociación Pablo Ugarte.

SEGUROS: Se trata de estudio observacional sin riesgos inherentes ni perjuicios para el paciente por lo que no se ha contemplado la contratación de un seguro o garantía financiera.

20. POLÍTICA DE PUBLICACIÓN

Los resultados de este estudio serán publicados con independencia de los resultados obtenidos. La autoría de las publicaciones tendrá en consideración en número de casos aportados al estudio y la participación en el análisis de los resultados.

21. BIBLIOGRAFÍA

1. Bosse KR, Maris JM. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer* 2016;122(1):20-33 doi 10.1002/cncr.29706.
2. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;363(14):1324-34 doi 10.1056/NEJMoa0911123.

3. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res* 2018;372(2):195-2009. Doi:10.1007/s00441-018-2821-2.
4. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, Kim K, Mendonça EA, Song Y, Hess D, Reville PK, London WB, Naranjo A, Hank JA, Diccianni MB, Reisfeld RA, Gillies SD, Matthay KK, Cohn SL, Hogarty MD, Maris JM, Park JR, Ozkaynak MF, Gilman AL, Yu AL, Sondel PM. Neuroblastoma Patients' KIR and KIR-Ligand Genotypes Influence Clinical Outcome for Dinutuximab-based Immunotherapy: A Report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan 1;24(1):189-196. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1767. Epub 2017 Oct 2.
5. Koehn TA, Trimble LL, Alderson KL, Erbe AK, McDowell KA, Grzywacz B, Hank JA, Sondel PM. Increasing the clinical efficacy of NK and antibody-mediated cancer immunotherapy: potential predictors of successful clinical outcome based on observations in high-risk neuroblastoma. *Front Pharmacol*. 2012 May 16;3:91. doi: 10.3389/fphar.2012.00091. eCollection 2012. PMID:22623917
6. Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, Michon J, et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol* 2005;42(11):1311-19. PMID: 15950727
7. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 2006;214:143-54 doi 10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x.
8. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol* 2009;101:27-79 doi 10.1016/S0065-2776(08)01002-X.
9. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005;436(7051):709-13 doi 10.1038/nature03847.
10. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2015;6:368. doi 10.3389/fimmu.2015.00368.
11. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, et al. Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer research* 2010;70(23):9554-61 doi 10.1158/0008-5472.CAN-10-2211.
12. Cheung NK, Cheung IY, Kushner BH, Ostrovnaya I, Chamberlain E, Kramer K, et al. Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol* 2012;30(26):3264-70. doi 10.1200/JCO.2011.41.3807.
13. Venstrom JM, Zheng J, Noor N, Danis KE, Yeh AW, Cheung IY, et al. KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(23):7330-4 doi 10.1158/1078-0432.CCR-09-1720.
14. Tarek N, Le Luduec JB, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *The Journal of clinical investigation* 2012;122(9):3260-70 doi 10.1172/JCI62749.

15. ANEXOS

- Hoja de información al paciente y consentimiento informado (con versión y fecha)