

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 087**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11818739 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2606120**

54 Título: **Células facilitadoras humanas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

30.11.2010 US 957011
17.08.2010 US 374460 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
MedCenter 3, 201 E. Jefferson Street, Suite 215
Louisville, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**ILDSTAD, SUZANNE y
ELLIOTT, MARY JANE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 561 087 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células facilitadoras humanas y usos de las mismas.

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere a células facilitadoras humanas, y el uso de dichas células en protocolos terapéuticos.

10 ANTECEDENTES

Se han descrito células facilitadoras (FC) de ratón. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.772.994. Las FC no son células madre, pero mejoran significativamente el injerto inicial y a largo plazo de las células madre. Por ejemplo, el trasplante de células madre en solitario únicamente prolonga la supervivencia de un paciente de trasplante, mientras que la presencia de FC da como resultado un injerto de HSC sostenido y a largo plazo. Véase, también, Kaufman y col., 2005, J. Exp. Med., 201: 373-83). El documento US2005/118142 A1 se refiere a composiciones celulares que facilitan el injerto de células madre. El documento US2004/228845 A1 se refiere al uso de células facilitadoras CD8+/TCR-.

20 RESUMEN

La invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a células facilitadoras humanas (hFC), métodos para aislar las hFC, y métodos para usar las hFC para facilitar la reconstitución de un sistema hematopoyético dañado o destruido con células madre, así como para inducir una tolerancia específica de donante para el trasplante de células madre, tejidos y órganos sólidos.

En un aspecto, se proporciona una composición celular. Dicha composición celular puede incluir al menos aproximadamente un 30 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %) de células facilitadoras humanas (hFC), donde las hFC comprenden células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} y células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright}.

En algunas realizaciones, las células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} son predominantemente CD3 epsilon+/CD 19-. En algunas realizaciones, las células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright} son predominantemente CD3 epsilon+/CD19+. En algunos casos, las hFC incluyen células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/TCR+ delta gamma/CD3 epsilon+/CD19+. En algunas realizaciones, las hFC incluyen células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/B220+/CD11c+/CD11b-. En algunos casos, aproximadamente el 48 % de las hFC son CD8+/TCR- alfa beta/CD3 epsilon+, aproximadamente el 33 % de las hFC son CD8+/TCR- alfa beta/CD19+, aproximadamente el 44 % de las hFC son CD11c+, aproximadamente el 40 % de las hFC son CD11b+, aproximadamente el 42 % de las hFC son Foxp3, y aproximadamente el 30 % de las hFC son HLA-DR. En algunos casos, aproximadamente el 25 % de las hFC son CD8+/TCR- alfa beta/IFN-gamma y aproximadamente el 31 % de las hFC son CD8+/TCR- alfa beta/CXCR4.

En un aspecto, se proporciona una composición celular terapéutica. Tal composición celular terapéutica puede incluir células madre hematopoyéticas (HSC) humanas, donde las HSC tienen un fenotipo de CD34+; células facilitadoras humanas (hFC), donde las hFC comprenden células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} y células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright}, y linfocitos T TCR+ alfa beta humanos, donde los linfocitos T TCR+ alfa beta están presentes en una cantidad que es superior a la que se considerará terapéutica. En algunas realizaciones, la composición celular terapéutica sirve para su administración a un receptor. Además, en algunas realizaciones, los linfocitos T TCR+ alfa beta están presentes en una cantidad entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y aproximadamente $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor. En algunas realizaciones, el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y aproximadamente $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor. En algunas realizaciones, el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre aproximadamente $3,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,2 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor.

En un aspecto, se proporciona un método para preparar una composición celular terapéutica para su administración a un receptor. Tal método incluye típicamente proporcionar una fuente donante de células madre hematopoyéticas (HSC); empobrecer los linfocitos T TCR+ alfa beta de la fuente donante para producir una fuente donante empobrecida; ajustar el número de linfocitos T TCR+ alfa beta en la fuente donante empobrecida a más de 1×10^5 linfocitos T TCR+ alfa beta por kg de peso corporal del receptor, produciendo así una composición celular terapéutica para su administración a un receptor. En algunas realizaciones, la fuente de HSC es la médula ósea, el timo, y la sangre periférica. En ciertas realizaciones, los linfocitos T se empobrecen usando uno o más anticuerpos. En algunas realizaciones, el uno o más anticuerpos se conjugan con perlas magnéticas. Es una característica de la

divulgación que las hFC descritas en el presente documento mejoran la capacidad de injerto de las HSC en comparación con las HSC injertadas en ausencia de las hFC.

5 En un aspecto, se desvela la composición para su uso en un método para hacer el sistema inmune de un receptor quimérico con el sistema inmune de un donante. Tal método incluye típicamente administrar la composición celular terapéutica que se ha descrito anteriormente al receptor, en el que el receptor se ha acondicionado.

10 En algunas realizaciones, el condicionamiento del receptor incluye una dosis de irradiación corporal total (ICT), donde la irradiación corporal total no excede 300 cGy. En algunas realizaciones, la composición celular terapéutica se administra al receptor por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el sistema inmune del receptor se considera que es quimérico con el sistema inmune del donante cuando el sistema inmune del receptor es al menos aproximadamente un 1 % de origen donante.

15 En algunas realizaciones, el receptor tiene una enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad puede ser una enfermedad autoinmune, leucemia, una hemoglobinopatía, un trastorno metabólico hereditario, o una enfermedad que necesita un trasplante de órgano. Las enfermedades autoinmunes representativas incluyen diabetes, esclerosis múltiple, y lupus eritematoso sistémico. En algunas realizaciones, la enfermedad es una infección por un virus de inmunodeficiencia o hepatitis. En algunas realizaciones, la enfermedad puede ser una neoplasia hematopoyética, anemia, hemoglobinopatías, o una deficiencia enzimática. En algunas realizaciones, el órgano trasplantado es el corazón, la piel, el hígado, un pulmón, el corazón y un pulmón, un riñón, el páncreas, o un órgano endocrino (por ejemplo, una glándula tiroides, una glándula paratiroides, un timo, una corteza suprarrenal, o médula suprarrenal).

25 En un aspecto, se proporciona una composición celular que incluye al menos aproximadamente un 30 % de células facilitadoras humanas (hFC) que tienen un fenotipo de CD8+/TCR-/CD56^{dim/neg}. Tal composición celular puede incluir adicionalmente células madre hematopoyéticas (HSC), donde las HSC tienen un fenotipo de CD34+, donde las HSC son MHC compatibles con las hFC. En otro aspecto, se proporciona una composición celular que incluye células madre hematopoyéticas (HSC) humanas, donde las HSC tienen un fenotipo de CD34+; y las células facilitadoras humanas (hFC), donde las hFC tienen un fenotipo de CD8+/TCR-/CD56^{dim/neg}. En un caso, el fenotipo de hFC CD56^{dim/neg} es CD56^{dim}.

30 De acuerdo con esta divulgación, las hFC pueden tener adicionalmente un fenotipo de CD3+/CD16+/CD19+/CD52+. Además, las hFC pueden tener un fenotipo, sin limitación, de CXCR4, CD 123, HLADR, NKp30, NKp44, NKp46, CD11c y CD162, y las hFC pueden caracterizarse adicionalmente por la presencia de marcadores, tales como, sin limitación, CD11a, CD11b, CD62L y FoxP3. Típicamente, las hFC descritas en el presente documento mejoran la capacidad de injerto de las HSC en comparación con las HSC injertadas en ausencia de las hFC. Las composiciones celulares como se describen en el presente documento, pueden incluir al menos aproximadamente un 50 % (por ejemplo, un 75 %, o un 90 %) de las hFC. Típicamente, el fenotipo de las células se determina por tinción de anticuerpos o citometría de flujo.

35 En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que incluye una composición celular como se describe en el presente documento. En otro aspecto, se desvela la composición para su uso en los métodos de tratamiento de un ser humano que padece una enfermedad. Dichos métodos incluyen generalmente administrar una composición farmacéutica que incluye una composición celular como se describe en el presente documento a un ser humano. Aún en otro aspecto, se proporcionan el trasplante de células donantes, tejidos u órganos en un receptor humano. Dichos métodos incluyen generalmente administrar una composición farmacéutica que incluye una composición celular como se describe en el presente documento, al receptor humano.

40 Dichos métodos pueden incluir adicionalmente acondicionar, parcialmente, la ser humano por exposición a irradiación corporal total, un agente inmunosupresor, un agente de citorreducción, o combinaciones de los mismos antes de la administración de la composición farmacéutica. En una realización, la irradiación corporal total es de 200 cGy. Una composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, puede administrarse por vía intravenosa.

45 En una realización, la enfermedad es una enfermedad autoinmune, tal como diabetes, esclerosis múltiple, o lupus eritematoso sistémico. En otra realización, la enfermedad es una infección por un virus de inmunodeficiencia o hepatitis. En otra realización más, la enfermedad se selecciona entre una neoplasia hematopoyética, anemia, hemoglobinopatías, y una deficiencia enzimática.

50 Los tejidos u órganos donantes representativos incluyen, sin limitación, corazón, piel, hígado, pulmón, corazón y pulmón, riñón, páncreas, o un órgano endocrino, tal como una glándula tiroides, una glándula paratiroides, un timo, una corteza suprarrenal, o médula suprarrenal. Las células donantes pueden ser células de islotes pancreáticos, neuronas o miocitos.

55 En otro aspecto más, se proporcionan métodos para obtener una composición celular que incluye al menos aproximadamente del 0,5 % al 8,0 % de hFC. Tal método incluye generalmente proporcionar una composición

celular hematopoyética; y para eliminar las células de la composición de células hematopoyéticas que tienen un fenotipo de TCR- alfa beta y TCR- gamma delta. Dichos métodos pueden incluir adicionalmente seleccionar células que tienen un fenotipo de CD8+; seleccionar células que tienen un fenotipo de CD56^{dim/neg}, y seleccionar células que tienen un fenotipo de CD3+/CD16+/CD19+/CD52+. Además, dichos métodos pueden incluir adicionalmente seleccionar células que tienen un fenotipo de CXCR4, CD 123, HLADR, NKp30, NKp44, NKp46, CD11c y CD162, y dichos métodos pueden incluir aún adicionalmente seleccionar células que tienen un fenotipo de, sin limitación, CD11a, CD11b, CD62L y FoxP3. Una composición celular producida por dichos métodos también puede incluir células madre hematopoyéticas CD34+ (HSC).

Las células pueden eliminarse y/o seleccionarse usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con una perla magnética). Además, o como alternativa, la composición de células hematopoyéticas puede separarse por centrifugación por gradiente de densidad para obtener células en la fracción celular mononuclear. En una realización, la composición de células hematopoyéticas se pone en contacto con un factor de crecimiento. La composición de células hematopoyéticas puede obtenerse de médula ósea, timo, sangre periférica, hígado fetal, o el saco vitelino embrionario. En una realización, la composición celular incluye al menos aproximadamente el 50 % de hFC (por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 % de hFC).

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta tecnología. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de los presentes métodos y composiciones, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 son gráficos que muestran análisis fenotípicos representativos de hFC. La figura 2 es un gráfico que muestra las sub-poblaciones CD56^{dim/neg} y CD56^{bright} en las hFC CD8+/TCR- alfa beta. La figura 3A es un gráfico que muestra análisis fenotípicos representativos de la sub-población de hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg}, y la figura 3B es un gráfico que muestra análisis fenotípicos representativos de la sub-población de hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright}. La figura 4 muestra la estrategia de separación para la clasificación y enumeración de las HSC humanas. La figura 5 muestra la estrategia de separación para clasificar y enumerar las hFC humanas. La figura 6A es un gráfico que muestra los resultados de la monitorización inmunológica en respuesta a varios estimuladores 1 mes después del trasplante en el paciente ACF de trasplante N° 3, y la figura 6B es un gráfico que muestra el recuento absoluto de neutrófilos (ANC) en el paciente ACF de trasplante N° 4. La figura 7A es un gráfico que muestra el quimerismo del paciente ACF de trasplante N° 3, y la figura 7B es un gráfico que muestra la fuente de hemoglobina del mismo paciente de trasplante. La figura 8 son gráficos que muestran el quimerismo (Panel A), la fuente de hemoglobina (Panel B), y los recuentos de reticulocitos (Panel C) para el paciente ACF de trasplante N° 4. La figura 9 son gráficos que muestran la cantidad de ANC y glóbulos blancos (WBC) (Panel A), el recuento plaquetario (Panel B), y el porcentaje de quimerismo (Panel C) en un paciente después de un trasplante de órgano sólido. La figura 10A es un gráfico que muestra el recuento plaquetario, y la figura 10B es un gráfico que muestra el porcentaje de quimerismo en el Paciente N° 2 después de un trasplante de órgano sólido. La figura 11 son gráficos que muestran el ANC (Panel A), la recuperación de linfocitos B, células CD4 +, y células CD8+ (Panel B), y el recuento plaquetario (Panel C) después de un trasplante de órgano sólido en el Paciente N° 12. La figura 12 es un esquema que muestra un acondicionamiento no mieloablativo general y un régimen de inmunosupresión después del trasplante como se ilustra en el presente documento. La figura 13 son gráficos que muestran el quimerismo (Panel A), quimerismo multilínea (Panel B), la respuesta a varios estimuladores (Panel C), los niveles de creatinina (Panel D), el recuento plaquetario (Panel E), y el recuento de glóbulos blancos y el ANC (Panel F) en el Sujeto de trasplante de riñón de donante vivo N° 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se proporcionan hFC humanas (hFC) que facilitan el injerto de células madre inicial y que se requieren para un injerto de HSC sostenido. También se proporcionan métodos de purificación de dichas hFC de médula ósea u otras fuentes fisiológicas de células hematopoyéticas. Se proporcionan una diversidad de procedimientos de separación, que generalmente se basan en la presencia o ausencia de marcadores específicos como se desvela en el presente

documento.

Células facilitadoras humanas (hFC), Composiciones Celulares que Contienen hFC, y Métodos de Preparación

5 Se han identificado células facilitadoras humanas (hFC) y se describen en el presente documento. Las hFC se caracterizan generalmente como CD8+ y TCR- alfa beta. Las hFC también pueden ser TCR- gamma delta o TCR+ gamma delta (es decir, no se requiere la ausencia de células TCR gamma delta). Las hFC CD8+/TCR- alfa beta pueden caracterizarse por la presencia de células que expresan los siguientes marcadores: CD3 epsilon (expresado en aproximadamente el 48 % de las hFC), CD 19 (expresado en aproximadamente el 33 % de las hFC), CD11c (expresado en aproximadamente el 44 % de las hFC), CD11b (expresado en aproximadamente el 40 % de las hFC), Foxp3 (expresado en aproximadamente el 42 % de las hFC), HLA-DR (expresado en aproximadamente el 30 % de las hFC), y CD123 (expresado en aproximadamente el 8 % de las hFC) (figura 1A). Las hFC también pueden caracterizarse por la presencia de células que expresan IFN-gamma (aproximadamente el 25 % de las hFC) y CXCR4 (aproximadamente el 31 % de las hFC) (figura 1B). Además, aproximadamente el 65 % de las hFC parecen células dendríticas plasmocitoides tolerogénicas (B220+/CD11c+/CD11b-), y las hFC son capaces de inducir células T_{reg} específicas de antígeno. Adicionalmente, las hFC pueden caracterizarse por la presencia, en niveles inferiores, de marcadores, tales como, sin limitación, CD 16, CD52, NKp30, NKp44, NKp46, CD 162, CD11a y CD62L.

20 Dentro de la población de hFC CD8+/TCR- alfa beta, hay dos subpoblaciones: CD8⁺/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} (aproximadamente el 55 % de las hFC) y CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright} (aproximadamente el 45 % de las hFC) (figura 2). Como se entiende por los expertos en esta técnica, las células CD56^{dim/neg} se refieren a una población de células que expresan una cantidad relativamente pequeña de CD56 (CD56^{dim}) y células que no expresan CD56 (CD56^{neg}); mientras que las células CD56^{bright} se refieren a células que expresan una cantidad relativamente grande de CD56 (CD56^{bright}).

25 Dentro de la subpoblación CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} de las hFC, la mayoría de las células expresan CD3 epsilon (aproximadamente el 80 %), aproximadamente un tercio de las células expresan HLA-DR (aproximadamente el 30 %), y un porcentaje inferior de células expresa CD11c (aproximadamente 17 %), CD19 (aproximadamente el 16 %), CD11b (aproximadamente el 14 %), y CD123 (aproximadamente el 11 %) (figura 3A). Por lo tanto, la mayor parte de las células dentro de la subpoblación de hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} son CD3 epsilon+/CD 19-. Dentro de la subpoblación CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright} de hFC, aproximadamente el 65 % de las células expresan CD11c, aproximadamente el 67 % de las células expresan CD11b, y aproximadamente el 40 % de las células expresan HLA-DR, mientras que CD3 epsilon, CD19 y CD123 se expresan en niveles muy inferiores (aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 25 %, y aproximadamente el 10 %, respectivamente) en esta subpoblación (figura 3B). Por lo tanto, la mayoría de las células dentro de la subpoblación de hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright} son CD3 epsilon-/CD 19+.

40 Las hFC pueden obtenerse a partir de médula ósea, o cualquier otra fuente fisiológica de células hematopoyéticas, tales como, sin limitación, el bazo, el timo, la sangre, el saco vitelino embrionario, o hígado fetal. En una realización, las hFC se obtienen a partir de sangre periférica movilizada (en presencia de, por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En otra realización, las hFC se obtienen de médula ósea vertebral.

45 Una vez que se obtienen las células hematopoyéticas, las hFC pueden enriquecerse, purificarse (o purificarse sustancialmente) mediante diversos métodos que usan típicamente anticuerpos que se unen específicamente a marcadores para seleccionar las células que poseen (o carece) de los marcadores particulares. Las técnicas de separación celular incluye, por ejemplo, clasificación celular usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) y fluorocromos específicos; separaciones de biotina-avidina o biotina-estreptavidina usando biotina conjugada con anticuerpos específicos de marcador de la superficie celular y avidina o estreptavidina unida a un soporte sólido (por ejemplo, matriz de columna de afinidad o una superficie de plástico); separaciones magnéticas usando perlas magnéticas revestidas con anticuerpo; o separaciones destructivas, tales como anticuerpo y componente o anticuerpo unido a citotoxinas o isótopos radioactivos. Los métodos para preparar anticuerpos que pueden usarse en las separaciones celulares se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.013.519.

55 La separación usando anticuerpos dirigidos a marcadores específicos puede basarse en selecciones negativas o positivas. En las separaciones basadas en selección negativa, se usan anticuerpos que son específicos para marcadores que están presentes en las células no deseadas (no hFC) y que no están presentes en las células deseadas (hFC). Las células (no deseadas) unidas por el anticuerpo se eliminan o se lisan y las células no unidas se conservan. En las separaciones basadas en selección positiva, se usan anticuerpos que son específicos para marcadores que están presentes en las células deseadas (hFC). Las células unidas por el anticuerpo se conservan. Se entenderá que pueden usarse separaciones de selección positiva y negativa conjunta o secuencialmente. Se entenderá que la presente divulgación incluye cualquier técnica de separación que puede usarse para enriquecer o purificar las hFC descritas en el presente documento.

65

Una técnica bien conocida para la separación basada en anticuerpos es la clasificación celular usando, por ejemplo, FACS. En resumen, una mezcla suspendida de células hematopoyéticas se centrifugan y se resuspenden en medio. Se añaden anticuerpos que se conjugan con fluorocromos para permitir la unión de los anticuerpos a los marcadores de superficie celular específicos. Después, la mezcla celular se lava y se procesa a través de una FACS, que separa las células basándose en su fluorescencia, que se dicta por la unión del marcador a anticuerpo específico. Pueden usarse técnicas de separación distintas de la clasificación celular adicionalmente o como alternativa, para obtener hFC. Tal método es separación basada en biotina-avidina (o estreptavidina) usando cromatografía de afinidad. Típicamente, tal técnica se realiza incubando células hematopoyéticas con anticuerpos acoplados a biotina que se unen a marcadores específicos seguida del paso de las células a través de una columna de avidina. Los complejos de biotina-anticuerpo-células se unen a la columna a través de la interacción biotina-avidina, mientras que las células no complejadas pasan a través. Las células unidas a columna pueden liberarse por perturbación u otros métodos conocidos. La especificidad del sistema de biotina-avidina es idónea para una separación rápida.

La clasificación celular y las técnicas de biotina-avidina proporcionan medios altamente específicos para la separación celular. Si se desea, pueden utilizarse separaciones menos específicas para eliminar las porciones de no hFC de la fuente de células hematopoyéticas. Por ejemplo, pueden usarse separaciones de perlas magnéticas para eliminar inicialmente poblaciones celulares hematopoyéticas diferenciadas no facilitadoras incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T, linfocitos B, células aniquilantes naturales (NK) y macrófagos (MAC), así como poblaciones celulares menores que incluyen megacariocitos, mastocitos, eosinófilos y basófilos. Además, las células pueden separarse usando separación por gradiente de densidad. En resumen, las células hematopoyéticas pueden situarse en un gradiente densidad preparado con, por ejemplo, medio Ficoll o Percoll o Eurocollins. La separación puede realizarse entonces por centrifugación o automáticamente, por ejemplo, con un separador Cobel & Cell '2991 (Cobev, Lakewood, CO). Pueden ser deseables procedimientos de separación adicionales dependiendo de la fuente de la mezcla de células hematopoyéticas y su contenido. Por ejemplo, si se usa sangre como fuente de células hematopoyéticas, puede ser deseable lisar los glóbulos rojos antes de la separación de cualquier fracción.

Aunque se desvelan separaciones basadas en marcadores específicos, se entenderá que la presente divulgación incluye cualquier técnica de separación que dé como resultado una composición celular que esté enriquecida para hFC, ya sea esa separación una separación negativa, una separación positiva, o una combinación de separaciones negativa y positiva, y ya use esa separación clasificación celular o alguna otra técnica, tal como, por ejemplo, tratamiento de anticuerpo más complemento, separaciones en columna, adsorción, tecnología de biotina-avidina, centrifugación por gradiente de densidad, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. La mayor parte de las fuentes de células hematopoyéticas contienen de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 8 % (por ejemplo, típicamente aproximadamente el 1 %) de hFC. Las separaciones tales como las desveladas en el presente documento, pueden producir composiciones celulares que están enriquecidas por hFC (es decir, incluyen un mayor número de hFC que el que se encuentra en la naturaleza en fuentes celulares hematopoyéticas fisiológicas). Por ejemplo, se proporcionan composiciones celulares en las que al menos aproximadamente el 5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 % o más) de las células son hFC como se describe en el presente documento. Estas composiciones se denominan como "enriquecidas" por hFC. En otro ejemplo, se proporcionan composiciones celulares en las que al menos aproximadamente el 30 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, 40 %, 50 % o más) de las células son hFC como se describe en el presente documento. Las composiciones se denominan como "purificadas" por hFC. Un procesamiento adicional, por selección positiva o negativa o ambas, puede producir composiciones celulares en las que al menos aproximadamente el 60 % de las células (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99%) son hFC como se describe en el presente documento.

Se describen en el presente documento métodos ejemplares para obtener composiciones celulares que incluyen hFC. Los expertos en la técnica entenderán que los ejemplos descritos en el presente documento pueden modificarse de varias maneras para obtener aún hFC o para obtener diferentes cantidades de hFC. En los siguientes ejemplos, la médula ósea es la fuente de células madre hematopoyéticas. La médula ósea puede cosecharse (por ejemplo, de un donante) mediante diversos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la médula ósea puede cosecharse de los huesos largos (por ejemplo, fémur o tibia), pero también puede obtenerse de otras cavidades óseas o la columna vertebral.

En un método ejemplar, pueden eliminarse las células no hFC y no HSC de la médula ósea usando una o más selecciones negativas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los linfocitos T, también conocidos como células productoras de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), pueden eliminarse específicamente de la composición celular usando anticuerpos dirigidos hacia marcadores específicos de linfocitos T, tal como TCR+ alfa beta. En ciertas realizaciones, puede usarse un anticuerpo dirigido hacia TCR+ delta gamma para eliminar un subconjunto adicional de linfocitos T. La composición celular resultante se enriquece con hFC y HSC, y también contendrá otras células progenitoras inmaduras tales como células progenitoras linfoides y mieloides inmaduras.

En otro método ejemplar, las hFC pueden obtenerse de la médula ósea usando una o más selecciones positivas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las hFC pueden purificarse por clasificación celular (por ejemplo, usando FACS) con uno o más de los marcadores descritos en el presente documento (por ejemplo, CD8+, CD19,

CD56).

En ciertos casos (por ejemplo, no terapéuticos), puede ser deseable eliminar las HSC de la composición celular. Las HSC pueden eliminarse de la médula ósea usando, por ejemplo, anticuerpos que se unen a CD34+ y, opcionalmente, a CD45+. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.061.620 o el sistema de separación celular de laboratorio por LC, kit CD34 (CellPro, Inc., Bothell, WA).

Métodos de Uso de las hFC y Composiciones Celulares que Contienen hFC

La capacidad de las hFC de mejorar el injerto de células de médula ósea donantes en un receptor indica que las hFC son útiles para facilitar diversos protocolos de terapia. El uso de una composición celular que está enriquecida con hFC (por ejemplo, contiene aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 12 % de hFC) mejora significativamente un injerto duradero y elimina la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Aunque no se une por ningún mecanismo particular, se cree que, una vez administradas, las hFC alojan diversos sitios de células hematopoyéticas en el cuerpo del receptor, incluyendo cavidad ósea, bazo, hígado fetal o adulto, y timo. Las hFC se han sembrado en los sitios apropiados, se implantan, y comienzan estableciendo un sistema inmune quimérico. Es posible que tanto las células madre como las hFC se complejen juntas para sembrar el sitio apropiado para el injerto.

También se describen en el presente documento métodos para administrar una composición celular terapéutica que comprende hFC a un receptor. Una composición celular terapéutica como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que incluye hFC y HSC. Tal composición puede producirse usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo selecciones positiva y/o negativa). Una composición celular terapéutica para su administración a un receptor puede incluir un total de entre aproximadamente 1×10^8 células y 3×10^8 células por kilogramo de pesos de dosificación del receptor. En una composición celular terapéutica, el número de HSC puede estar entre aproximadamente 1×10^5 y 18×10^6 HSC por kg del peso de dosificación del receptor, y puede administrarse un intervalo similar de hFC. El número exacto de células que se usa, sin embargo, dependerá de muchos factores, incluyendo el número de células en la fuente original de células madre hematopoyéticas, el número de células (por ejemplo, hFC y/o HSC) presenten después del procesamiento (por ejemplo, enriquecimiento y/o purificación), así como la condición de la salud del receptor.

Como se describe en el presente documento, la obtención de las hFC implica típicamente empobrecer los linfocitos T TCR+ alfa beta, ya que estos son considerados células productoras de EICH. Sin embargo, terapéuticamente, se ha descubierto que la presencia de linfocitos T TCR+ alfa beta es beneficiosa en la composición celular de las HSC y hFC. Como se muestra en la sección de Ejemplos en el presente documento, una composición celular que incluye linfocitos T TCR+ alfa beta a un nivel que es mayor al considerado generalmente como terapéutico promueve sorprendentemente el quimerismo y el injerto. Se acepta generalmente que aproximadamente 1×10^5 linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor se considera una cantidad letal de linfocitos T. Sin embargo, en los métodos descritos en el presente documento, se administraron de forma rutinaria a los receptores cantidades mayores que esa sin efectos adversos. Específicamente, pueden incluirse en una composición celular terapéutica cantidades entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta (por ejemplo, entre aproximadamente $2,5 \times 10^6$ y $4,5 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor; entre aproximadamente $3,0 \times 10^6$ y $4,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor; aproximadamente $3,0 \times 10^6$ y $4,2 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor; aproximadamente $3,2 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor; o aproximadamente $3,8 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor).

Por consiguiente, dependiendo de los procedimientos y métodos usados para obtener la composición celular terapéutica de HSC y hFC, puede ser necesario ajustar el número de linfocitos T TCR+ alfa beta en la composición. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, pueden añadirse linfocitos T TCR+ alfa beta de nuevo a la composición de HSC y hFC de linfocitos T empobrecidos para obtener el número deseado. En otras realizaciones, la etapa de empobrecimiento puede modificarse de manera que se empobrezca únicamente la cantidad deseada de linfocitos T, dejando de este modo la cantidad deseada de linfocitos T en la composición. Para conseguir la cantidad deseada de linfocitos T en una composición celular terapéutica, puede determinarse el número linfocitos T, por ejemplo, antes del empobrecimiento (por ejemplo, el material de partida) o después de la etapa de empobrecimiento. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar el número de células (por ejemplo, linfocitos T) en una muestra (por ejemplo, FACS).

Las composiciones celulares terapéuticas generalmente se administran por vía intravenosa, pero pueden usarse otros modos de administración, tal como inyección ósea directa. Las composiciones celulares terapéuticas descritas en el presente documento, incluso en presencia de niveles superiores a los terapéuticos de linfocitos T TCR+ alfa beta, dan como resultado un quimerismo duradero. Como se usa en el presente documento, el quimerismo duradero se refiere a un sistema inmune de un receptor que es al menos aproximadamente el 1 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o más (por ejemplo, 100 %)) original del donante durante más de 6 meses después del trasplante (por ejemplo, 1 año o más después del trasplante). Además, puede conseguirse un quimerismo duradero usando la composición celular terapéutica descrita

en el presente documento incluso en receptores que no son HLA compatibles con su donante o que son únicamente parcialmente compatibles con su donante. Por consiguiente, las composiciones celulares terapéuticas descritas en el presente documento permiten un trasplante entre un donante y un receptor que son singénicos entre sí y deben permitir el trasplante entre un donante y un receptor que son alogénicos entre sí.

5 Tradicionalmente, los métodos para establecer un sistema inmune quimérico requerían destruir el sistema inmune del receptor, lo que da como resultado la ablación de las HSC del receptor. Esto puede realizarse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, irradiar al receptor con niveles seleccionados de irradiación corporal total, administrar toxinas específicas o agentes quimioterapéuticos al receptor, 10 administrar al receptor anticuerpos monoclonales específicos o anticuerpos monoclonales unidos a toxinas o isótopos radioactivos, o combinaciones de los mismos. Particularmente, la administración de las hFC que se describen en el presente documento (por ejemplo, en la composición celular terapéutica) a un receptor reduce significativamente la cantidad de acondicionamiento requerido de un receptor para un injerto exitoso, y también reduce significativamente la cantidad de inmunosupresión requerida tras el trasplante. Por ejemplo, la destrucción 15 del sistema inmune de un receptor a menudo implica irradiar letalmente al receptor con 950 centigray (cGy) de irradiación corporal total (ICT), mientras que los procedimientos descritos en el presente documento utilizan un régimen de acondicionamiento de tan poco como 25 cGy a 200 cGy de ICT.

20 La capacidad de establecer un quimerismo con éxito permite una supervivencia significativamente mejorada tras el trasplante. La presente divulgación proporciona métodos para trasplantar un componente fisiológico donante, tal como, por ejemplo, órganos, tejido o células. El uso de las hFC en los métodos desvelados en el presente documento da como resultado un receptor que tiene un sistema inmunoquimérico, que es completamente inmunotolerante a un órgano, tejido o células donantes trasplantados, pero rechaza de manera componente injertos de terceros. El órgano, tejido o células donantes trasplantados son capaces de realizar sus funciones respectivas en 25 el receptor. Por ejemplo, las células de islotes trasplantadas pueden proporcionar un tratamiento eficaz para la diabetes. Además, se ha demostrado una aceptación permanente de injertos de tejidos endocrinos (tiroides, paratiroides, corteza suprarrenal, médula suprarrenal, islotes), así como riñón, hígado, corazón y tejidos compuestos, tales como cara, manos y otras extremidades. Se entenderá que un sistema inmune quimérico mixto puede producirse en un receptor antes, durante o después del trasplante de un órgano, tejido o células, pero típicamente se produce antes o al mismo tiempo que el trasplante. 30

El uso de hFC en el establecimiento de un sistema inmune quimérico puede expandir significativamente el alcance de las enfermedades que pueden tratarse usando el trasplante de médula ósea. Más allá del trasplante (por ejemplo, corazón, riñón, hígado, islotes pancreáticos, y mano o cara), la capacidad para establecer un sistema 35 hematopoyético quimérico exitoso en un receptor puede usarse para tratar otras enfermedades o trastornos que no se tratan actualmente mediante trasplante de médula ósea debido a la morbilidad y mortalidad asociadas a GHVD. Las enfermedades autoinmunes implican el ataque de un órgano o tejido por el propio sistema inmune. Sin embargo, cuando se establece un sistema inmune quimérico, el cuerpo puede volver a aprender lo que es extraño y lo que es propio. El establecimiento de un sistema inmune quimérico usando las hFC descritas en el presente documento puede reducir o detener el ataque inmune que causa la afección. Las enfermedades autoinmunes que pueden 40 tratarse usando las hFC descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis o colitis de Crohn.

También puede ser posible tratar la enfermedad de Alzheimer usando las composiciones celulares descritas en el 45 presente documento. Las composiciones celulares desveladas en el presente documento también pueden usarse para tratar hemoglobinopatías tales como, por ejemplo, anemia de células falciformes, esferocitosis o talasemia, así como trastornos metabólicos, tales como enfermedad de Hunter, enfermedad de Hurler, enfermedad granulomatosa crónica, leucodistrofia y defectos enzimáticos. Además, las composiciones celulares descritas en el presente documento pueden usarse para tratar leucemias u otros trastornos de la infancia raros (por ejemplo, deficiencia de 50 ADA, anemia aplásica o SCID), o las composiciones celulares descritas en el presente documento pueden usarse en la reparación regenerativa (por ejemplo, degeneración macular, infarto de miocardio, o regeneración de islotes).

De acuerdo con la presente divulgación, pueden emplearse técnicas de biología molecular, biología celular, 55 microbiología y bioquímica convencionales dentro de la capacidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Los métodos y composiciones se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de los métodos y composiciones que se describen en las reivindicaciones.

Ejemplos

60 Sección A - Ensayos de Células Formadoras de Colonias

Ejemplo 1 - Purificación de HSC y hFC

Se aislaron HSC y hFC de médula ósea vertebral humana (VBM) o sangre periférica movilizada (MPB) por 65 clasificación de células estériles vivas multiparámetro (FACSVantage SE: Becton Dickinson). En resumen, la VBM o

MPB se tiñó con anticuerpos monoclonales marcados directamente (mAbs) a concentraciones de saturación durante 30 min. HSC: CD34+/CD45+; y hFC: CD8+/TCR-/CD56^{dim/neg}. Ambas poblaciones celulares se clasificaron y se analizaron para comprobar la pureza. Únicamente se aceptaron niveles de pureza de 85 % o superior.

5 Ejemplo 2 - Clasificación y enumeración de HSC y hFC

Las HSC se clasificaron y se enumeraron basándose en el protocolo ISHAGE. Véase, Sutherland y col., 1996, "The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry", J. Hematotherapy, 5: 213-26. En resumen, los parámetros de combinación de CD45-FITC/CD34-PE proporcionaron una reflexión clínicamente relevante del compartimento de células madre/progenitoras de sangre periférica. El Gráfico 1 se formateó con Dispersión Frontal (FSC; eje x) frente a Dispersión Lateral (SSC; eje y), y se dibujó una región (R1) alrededor de las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos excluyendo los restos. A partir de R1, el Gráfico 2 se formateó con CD45 FITC frente a Dispersión Lateral, y R1 se dibujó de manera que se excluyeran los eventos CD45-. A partir de R2, el Gráfico 3 se formateó con CD34 PE frente a Dispersión Lateral, y R3 se dibujó únicamente alrededor de la población CD34+. A partir de R3, el Gráfico 4 se formateó con CD45-FITC frente a SSC de células CD34+. Las células que formaron un agrupamiento con una SSC baja característica y una fluorescencia CD45 de baja a intermedia se separaron y designaron R4. Se excluyeron los eventos teñidos no específicos de esta región. A partir de R4, el Gráfico 5 se formateó con FSC (eje x) frente a SSC (eje y). En el Gráfico 5 apareció un agrupamiento de eventos que cumplen todos los criterios de fluorescencia y dispersión de la luz de las células madre/progenitoras CD34+.

La figura 4 muestra la estrategia de separación para la clasificación y enumeración de HSC humanas usando el protocolo ISHAGE. La figura 5 muestra la estrategia de separación para la clasificación y enumeración de hFC humanas.

25 Ejemplo 3 - Ensayo de células formadoras de colonias con hFC

Tras la clasificación celular, las HSC (CD45+/CD34+) en solitario o las HSC y hFC (CD45+/CD34+ más CD8+/TCR-/CD56^{dim/neg}) o HSC + linfocitos T como control se pusieron en placas inmediatamente en metilcelulosa (0 h) o se incubaron previamente durante 18 h en medio de cultivo celular antes de colocar en placas en metilcelulosa. Todas las muestras celulares se cultivaron por cuadruplicado. Después de 14 días de cultivo a 37 °C y CO₂ al 5 %, las colonias que contenían más de 50 células se puntuaron.

Sin la incubación previa no hubo ninguna diferencia significativa en las colonias generadas por HSC en solitario frente a HSC más hFC. Sorprendentemente, cuando las HSC se incubaron junto con hFC durante 18 h antes de la colocación en el ensayo CFC, las hFC mejoraron significativamente ($p < 0,005$) la formación de colonias en comparación con HSC en solitario y las HSC se incubaron junto con linfocitos T CD8+. Estos resultados indican que las hFC humanas, como las hFC de ratón, ejercen un efecto protector sobre las HSC y promueven la generación de progenitores multipotentes más primitivos *in vitro*.

40 Ejemplo 4 - Ensayo de células formadoras de colonias con una subpoblación de hFC

Ensayo de Cultivo Formador de Colonias (CFC): Se cultivaron 15.000 HSC con o sin 30.000 hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} durante 0 h o 18 h en medio de cultivo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C. Después del cultivo, las células se resuspendieron en metilcelulosa y se usaron en un ensayo CFC. Las colonias se contaron el día 14.

Resumen y Resultados: Para evaluar la función de las hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} *in vitro*, las HSC se incubaron con hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} durante 18 h y después se cultivaron en metilcelulosa durante 14 días en un ensayo de células formadoras de colonias. HSC más hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} generaron significativamente más colonias en comparación con las HSC en solitario ($p = 0,0038$), demostrando que las hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} tienen un efecto directo sobre la clonogenicidad de las HSC.

Sección B - Caracterización de hFC Humanas *In Vivo*

55 Ejemplo 1 - Quimerismo e Injerto en un Modelo de Ratón

Se ha mostrado previamente que las hFC CD8⁺/TCR⁻ mejoran el injerto de HSC purificadas en receptores de ratón alogénicos y singénicos (Fugier y col., 2005, J. Exp. Med., 201(3): 373-383). Además, se ha mostrado en ratones que las hFC mejoran la clonogenicidad y promueven la generación de progenitores de HSC multipotentes más primitivos *in vitro* (Rezzoug y col., 2008, J. Immunology, 180(1): 49-57).

Un objetivo fue conseguir quimerismo de HSC humanas en un modelo de ratón. En resumen, las HSC humanas CD34⁺, CD45⁺ se clasificaron a partir de sangre periférica movilizada con G-CSF, y se trasplantaron 100.000 HSC humanas clasificadas en ratones de cadena ^{null}γ NOD/SCID/receptor IL2 (IL2R) condicionados con 325 cGy de ICT. Se recogió sangre completa de ratones trasplantados un mes después del trasplante, y se realizó una tipificación

PBL usando anticuerpos específicos para linfocitos T, linfocitos B, células aniquilantes naturales, células dendríticas y monocitos humanos. Los resultados mostraron que se consiguió una media del 3,2 % de quimerismo de HSC humanas tras el trasplante con 100.000 hHSC.

5 Después, se realizaron experimentos en los que se trasplantaron 100.000 hHSC en solitario o 100.000 hHSC + 300.000 hFC en ratones NOD/SCID/IL2R γ^{null} condicionados con 325 cGy de ICT. Se realizó una tipificación PBS multilínea 30 días después del trasplante como se ha descrito anteriormente.

10 Los resultados de estos experimentos demostraron que el grupo HSC + hFC produjo un mayor porcentaje de linfocitos T humanos (CD4, CD8, DC; véase la Tabla 1) y monocitos humanos (CD33; Tabla 2) en comparación con el grupo de HSC en solitario. El porcentaje de quimerismo donante en el gate linfóide y el gate mielóide se resumen en Tabla 3.

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos T, células NK, linfocitos B y CD humanas en el gate linfóide

Grupo	Ratón	Linfocitos T				NK	Linfocitos B	CD
		CD8	CD4	CD3	$\alpha\beta/\delta\gamma$ TCR	CD56	CD19	CD11c
HSC en solitario	A	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
	B	0	0	0,1	0,3	0,2	0	0
	C	0	0	0	0,1	0	0	0
HSC+hFC	D	0,1	0,5	0,4	0,5	0,1	0,1	0,1
	E	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1
	F	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

15

Tabla 2. Porcentaje de CD humanas y monocitos en el gate mielóide

Grupo	Ratón	CD11c	CD33
HSC en solitario	A	4,8	9,2
	B	0,6	5
	C	0	0
HSC+hFC	D	3,2	6,6
	E	4,1	8,1
	F	8,2	14,9

Tabla 3. Porcentaje de células hematopoyéticas humanas

Grupo	Ratón	Linfóide	Mielóide
		CD45	CD45
HSC en solitario	A	1,5	9,2
	B	1,5	5,8
	C	0,3	0,3
HSC+hFC	D	1,1	8,2
	E	0,8	9,4
	F	1,2	15,9

20 Ejemplo 2 - Injerto de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} en un modelo de ratón

Animales: Se adquirieron ratones *knockout* (NSG) de cadena gamma diabéticos no obesos (NOD)/SCID/receptor de interleucina-2 (IL-2r) macho de cinco a seis semanas en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

25 Purificación de HSC y hFC: Las HSC y FC se clasificaron a partir de sangre periférica movilizada con G-CSF por clasificación de células estériles vivas multiparámetro (FACSVantage SE y FACSARIA; Becton Dickinson, Mountain View, CA).

30 Fenotipo de hFC CD8+/TCR- alfa beta humanas: Se tiñeron PBMC movilizadas con movilizadas con G-CSF con anticuerpos monoclonales anti-humanos alfa CD8, TCR alfa beta, TCR delta gamma, CD56, epsilon CD3, CD19, CD11c, CD11b, HLA-DR, Foxp3, INF-gamma, TGF-beta, CXCR4 y SDF-1, y se analizaron por LSR usando Cell Quest Software (Becton Dickinson).

35 Trasplante de HSC y FC: En el modelo xenogénico de HSC + FC humanas, se trasplantaron 100.000 HSC humanas con o sin 300.000 hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} clasificadas en receptores ratones NOD/SCID/IL-2r gamma^{null} condicionados con 325 cGy de ICT.

Evaluación de quimerismo: El injerto de células donantes se evaluó en linfocitos de sangre periférica, células de médula ósea y esplenocitos usando citometría de flujo de 7 colores.

40 Resumen: Para evaluar si las hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} humanas mejoran el injerto de HSC humanas *in*

vivo, se trasplantaron 100.000 HSC en solitario o más 300.000 hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/net} en ratones receptores NOD/SCID/IL2rg^{null} (NSG) condicionados con 325 cGy de irradiación corporal total. 30 días después del trasplante, se injertaron 8 de 21 (38%) receptores de HSC en solitario. Por el contrario, el 81 % de los receptores (n = 16) que recibieron HSC más hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/net} se injertaron, y el quimerismo de linfocitos donante y monocitos donantes en sangre periférica fue del 0,53 % ± 0,16 % y 3,93 % ± 1,28 %, respectivamente.

6 meses después del trasplante, los receptores NSG de HSC en solitario perdieron quimerismo donante en sangre periférica y se detectaron pocas o ninguna célula donante en el bazo y la médula ósea. Por el contrario, los receptores NSG de HSC + hFC CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/net} mostraron un quimerismo donante duradero en sangre periférica y mostraron niveles significativamente superiores de quimerismo donante en el bazo (aproximadamente tres veces más linfocitos donantes y aproximadamente dos veces más monocitos donantes) y la médula ósea (aproximadamente diez veces más linfocitos donantes y aproximadamente cuatro veces más monocitos donantes) en comparación con los receptores de HSC en solitario.

Sección C - Tratamiento de Anemia de Células Falciformes (ACF) en Seres Humanos

Ejemplo 1 - El experimento preliminar de anemia de células falciformes (ACF)

Dos pacientes con anemia de células falciformes (ACF) se trataron previamente en un experimento piloto para intentar establecer un quimerismo mixto. Ambos pacientes con ACF tenían un alto riesgo de complicaciones debido a su enfermedad. Se evaluó si una combinación de 200 cGy de ICT con fludarabina, MMF y CyA podría establecer un injerto en pacientes con ACF. Sin embargo, únicamente se consiguió un injerto transitorio. El acondicionamiento se toleró bien, y no se produjo ninguna reacción adversa grave; sin embargo, reapareció la hematopoyesis endógena.

Para superar la transfusión/barrera de sensibilización, se hicieron mejoras en el protocolo. Por ejemplo, al régimen de acondicionamiento clínico se le añadió Campath, que es un anticuerpo monoclonal anti-CD52 humanizado que es un agente lítico potente para linfocitos T maduros, linfocitos B y células NK. Se administraron dos ciclos de Campath (mes -2 y mes -1) con el razonamiento de que el primer ciclo empobrecerá los linfocitos B maduros y causará una proliferación homeostática de linfocitos B con memoria para reemplazar los linfocitos B empobrecidos, y el segundo ciclo empobrecerá los linfocitos B con memoria proliferantes. Se planteó la hipótesis de que la amplia especificidad linfoide de Campath proporcionará un potente enfoque hacia los linfocitos T y B diana en el receptor que median la alorreactividad inducida por una terapia de transfusión.

En un ejemplo, se administraron cuatro dosis de 10 mg/día de Campath-1H el día -53 a -50, y se administraron otras cuatro dosis de 7 mg/día de Campath-1H el día -24 a -21. Se administraron 30 mg/m² de Fludarabina el día -5 a -3, y se administraron 200 cGy de irradiación corporal total en día -1 junto con micofenolato mofetilo y ciclosporina, que se continuó hasta un injerto duradero. Se trasplantaron FC + HSC el día 0.

Dos sujetos con ACF se han trasplantado con éxito bajo el protocolo revisado. Ambos sujetos han mantenido el injerto 27 y 24 meses posteriores al trasplante y son asintomáticos e independientes de transfusión. Se demostró que puede establecerse un quimerismo mixto con una toxicidad mínima en receptores sensibilizados a través de un acondicionamiento del receptor parcial seguido del trasplante de HSC y hFC para reducir el riesgo de EICH mientras que se conserva el injerto. El enfoque de acondicionamiento de intensidad reducida descrito en el presente documento es seguro, se tolera bien y, junto con el injerto de HSC + hFC, es suficiente para inducir un quimerismo mixto estable y una producción de RBC predominantemente normal en pacientes transfundidos. La inmunocompetencia para responder a PHA, *Candida*, y aloantígeno regresó 1 mes después del trasplante (figura 6A; un índice de estimulación de >3 es positivo (línea horizontal en el gráfico)). El nadir se produjo entre el día 9 y el día 24 para ambos pacientes (recuento absoluto de neutrófilos [ANC] <1.000) (figura 6B).

Ejemplo 2 - Paciente ACF N° 3 - Trasplantado en noviembre de 2005

ACF N° 3 (fecha de nacimiento 11-2-98) es una mujer afroamericana que experimentó múltiples crisis de dolor y episodios de síndrome torácico agudo. Se mantuvo en la terapia de transfusión. Su hermana con HLA idéntico con rasgo drepanocítico sirvió como su donante. La paciente se acondicionó con cuatro dosis de Campath-1H (30 mg/día) que comenzaron el día -53, y una segunda roda de cuatro dosis de Campath-1H (30 mg/día) que comenzó el día -24. Recibió 3 dosis de fludarabina (30 mg/m² IV) que comenzaron el día -4, y después 200 cGy de ICT el día 0.

Después del trasplante, se trató con ciclosporina (1,5 mg/kg/dos veces al día) y MMF durante 22 meses. La inmunosupresión se redujo posteriormente y se interrumpió por completo. La paciente recibió 14,1 x 10⁶ células CD34+/kg de peso corporal, 43,5 x 10⁶ células TCR alfa beta/kg de peso corporal y 5,4 x 10⁶ hFC/kg de peso corporal. Mostró un quimerismo de células donantes del 5 % el Día 17 y un quimerismo de células donantes del 78 % el día 32. No mostró ningún síntoma y no necesitó transfusiones posteriores al trasplante. El día 727 posterior al trasplante, mostró un quimerismo de células donantes del 21 % (figura 7A), y no mostró evidencia de EICH.

Aunque su quimerismo donante total fue aproximadamente del 30 %, estuvo produciendo RBC de rasgo derivado del donante casi del 100 % (figura 7B). 1259 días después del trasplante, produjo RBC donantes del 100 % y tuvo un quimerismo T, B y mielóide que variaba entre el 10-30 %. Aún se mostró independiente de transfusión y no tuvo ninguna complicación derivada de su ACF.

5 Durante el procedimiento de procesamiento para ACF N° 3, se experimentó cierta dificultad en la recuperación de la fracción correcta en el procedimiento de separación celular (Percoll) debido a la densidad de las células de médula con rasgo ACF. Dado que el par donante/receptor eran HLA compatibles, se tomó la decisión de abortar el proceso y no empobrecer el producto. Por lo tanto, la paciente recibió médula ósea completa. Sin embargo, la eficacia del acondicionamiento se estableció en este candidato.

Ejemplo 3 - Paciente ACF N° 4 - Trasplantado en marzo de 2006

15 ACF N° 4 (fecha de nacimiento 23/5/96) es un hombre nigeriano que padeció múltiples crisis de color y dos síndromes torácicos agudos antes de comenzar el intercambio de glóbulos rojos en 1999. El hermano con HLA idéntico del paciente que tenía un rasgo drepanocítico sirvió como su donante. El paciente recibió el mismo acondicionamiento no mieloablativo que ACF N° 3. Su dosis de HSC + hFC fue de $5,24 \times 10^6$ /kg de células CD34, $0,55 \times 10^6$ /kg de células $\alpha\beta$ -TCR y $0,35 \times 10^6$ /kg de hFC. Toleró el acondicionamiento muy bien y se injertó y se mostró quimérico (células donantes al 88 %) en un mes basándose en FISH. Su quimerismo donante fue del 28 % como el día 697 (figura 8A). El quimerismo de linfocitos T donantes fue del 34 % el día 501. El paciente ha permanecido asintomático desde su trasplante y produce RBC predominantemente normales (figura 8B). El recuento de reticulocitos para el paciente ACF N° 4 ha variado entre el 0,5 % y el 1 %, lo que está dentro de intervalos normales (figura 8C).

Ejemplo 4 - Resumen

25 Esta sección describe el trasplante con éxito de dos fuertemente transfundidos con ACF usando médica con HLA idéntico de hermanos donantes. Ambos pacientes tuvieron un trasplante con éxito usando acondicionamiento no mieloablativo de intensidad reducida y permanecieron libres de enfermedad durante >2 años. En la inclusión, eran dependientes de transfusión y tenían un riesgo muy elevado de sufrir crisis dolorosas y otras complicaciones. Ambos pacientes se retiraron con éxito de la inmunosupresión.

Sección D - Tratamiento de Anemia de Células Falciformes en Seres Humanos

35 Cinco individuos con un elevado riesgo de morbilidad y mortalidad por su talasemia se incluyeron en el protocolo de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión que se indican a continuación.

Ejemplo 1 - Criterios de inclusión

40 Los siguientes criterios se establecieron para identificar individuos con talasemia que tienen una alta morbilidad predicha y están en riesgo de mortalidad temprana: pacientes con alfa o beta talasemia mayor; o pacientes con otras hemoglobinopatías complejas y dependientes de transfusión. Los individuos también deben cumplir todos los siguientes criterios de inclusión generales: los individuos han de tener un donante emparentado (idéntico o incompatible para 1, 2 o 3 loci HLA-A, -B o -DR); los individuos deben tener una función cardiopulmonar adecuada según se documenta por ecocardiograma o exploración con radionúclido (fracción menor >26 % o fracción de eyección >40 % o >80 % del valor normal según la edad); los individuos han de tener una función pulmonar adecuada documentada por FEV1 de ≥ 50 % de lo predicho según la edad y/o DLCO (corregido según hemoglobina) ≥ 50 % de lo predicho según la edad para pacientes >10 años (si el paciente no puede realizar PFT, se requiere un oxímetro de pulso restante >85 % en el aire de la habitación o la depuración por parte del neumólogo pediátrico o adulto); los individuos deben tener una función hepática adecuada como se demuestra por la albúmina sérica >3,0 mg/dl, y SGPT o SGOT <5 veces el límite superior del normal; y los individuos deben tener una función renal adecuada como se demuestra por una creatinina en suero <2 mg/dl. Si la creatinina en suero es >2 mg/dl, entonces una prueba de depuración de creatinina o GFR por medicina nuclear debe documentar GFR de ≥ 50 ml/min/1,73 m². No hay ningún límite de edad para este protocolo.

Ejemplo 2 - Criterios de exclusión

60 Los individuos se excluyeron de este ensayo si cumplen cualquiera de los siguientes criterios: el individuo carece de donantes emparentados; el individuo tiene una infección no controlada o enfermedades concomitantes graves, y puede no tolerar un trasplante de intensidad reducida; el individuo muestra un deterioro grave del rendimiento funcional como se refleja por una puntuación Karnofsky (paciente >16 años) o Lansky (niños <16 años) de <70 %; el individuo muestra insuficiencia renal (GFR <50 ml/min/1,73 m²); el individuo tiene un resultado de la prueba del anticuerpo del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) positivo; la persona está embarazada como se indica por una prueba de HCG en suero positiva; la única donante del individuo está embarazada en el momento del trasplante previsto; la persona está en edad fértil y no pone en práctica una anticoncepción adecuada; el individuo ha estado

expuesto a terapia de radiación previa que impedirá la ICT; el individuo es testigo de Jehová; el individuo tiene hipersplenismo no controlado; o el individuo muestra aloinmunización grave con incapacidad de garantizar un suministro adecuado de donantes de PRBC.

5 Ejemplo 3 - Evaluación del receptor

Se realiza un historial y examen físico completos del individuo. Se obtiene la estimación del estado de Lansky o Karnofsky pre-HSCT. El historial incluye: edad del diagnóstico, crecimiento y desarrollo general, frecuencia y número de transfusiones, cualquier crisis aplásica, tratamiento anterior (por ejemplo, hidroxurea), niveles de HbF más A2
10 iniciales, estado de aloinmunización, tratamiento y fechas, cualquier exploración MRI, terapia de transfusión, infecciones, necrosis aséptica, historial de hepatitis, sobrecarga de hierro, biopsias hepáticas previas, y hallazgos patológicos.

Se realizaron las siguientes pruebas hematológicas: CBC (Hgb, Hct, MCV, MCHC, RDW, plaquetas, recuento de
15 glóbulos blancos), recuento diferencial, recuento de reticulocitos, ferritina, folato, electroforesis Hgb cuantitativa, PT, PTT, fibrinógeno, prueba de Coombs directa e indirecta. Además, se determina el número de genes alfa, se determina el haplotipo beta-globina, se realizan estudios sintéticos de la cadena globina, y el sujeto se tipifica y se explora para determinar ABO Rh.

Se obtienen las siguientes químicas: bilirrubina total y directa, SGPT, SGOT, fosfatasa alcalina, Proteína C,
20 subclases de IgG, albúmina, Ca⁺⁺/PO⁴⁺⁺/Mg⁺⁺, electrolitos en suero, BUN/creatinina, urinalisis, depuración de creatinina/GFR; y niveles endocrinos de T4, TSH, FSH, LH y hormona del crecimiento.

El individuo se tipifica para HLA (tipificación de HLA A, B, C, DQ y DR) basándose en análisis molecular.

Se realizaron las siguientes pruebas de diagnóstico en el individuo: una exploración TC (cerebro, senos, tórax,
25 abdomen, pelvis), PFT (capacidad vital durante el llanto para niños más pequeños incapaces de realizar PFT convencional, DLCO para pacientes >10 años), EKG, ecocardiograma o exploración MUGA, exploración hepática y del bazo, ultrasonido de vesícula biliar, edad ósea y estradiol o testosterona.

El individuo se exploró para los siguientes marcadores infecciosos: CMV, IgG, PCR, HSV y VZV IgG, anticuerpo de
30 VIH 1 y 2 y PCR, anticuerpo para HTLV 1 y 2, antígeno de superficie para Hepatitis B, anticuerpo nuclear de Hepatitis B, anticuerpo de Hepatitis C y PCR, EBV IgG e IgM, toxoplasma IgG e IgM, NAT para Virus del Nilo Occidental, anticuerpo *Trypanosoma cruzi* (Chagas), RPR o equivalente.

35 Ejemplo 4 - Evaluación y selección del donante

Se usan donantes y receptores con HLA idéntico, o se usan pares no compatibles de donantes y receptores (por
40 ejemplo, hasta haploidénticos (progenitor, tía, tío primo o hermano)). Los miembros de la familia dispuestos a donar médula ósea son HLA-tipificados. Se selecciona la mejor compatibilidad disponible. Todos los donantes participantes se evalúan según regulaciones de la FDA para la selección de donantes antes de la cosecha de células madre. Todas las evaluaciones se completan dentro de los 30 días del trasplante. Se consideran donantes pediátricos para la movilización. Si el donante no es un buen candidato para la aféresis, se cosecha médula ósea de la cresta ilíaca. Si está disponible más de un donante emparentado, se selecciona la correspondencia más cercana, el donante más
45 joven y/o negativo a CMV. Todos los donantes se pusieron en una terapia de reemplazo de hierro. Los donantes de féresis pueden complementarse con Vitamina K y/o calcio.

Los donantes se sometieron a exploración como se describe en el presente documento y se obtiene la siguiente
50 información. El historial y examen físico del donante se obtiene incluyendo el historial de embarazos y de transfusiones. Los donantes se someten a exploración para CBC, diferencial; PT con INR, PTT y fibrinógeno; Tipo y exploración de ABO y Rh, ferritina, hierro y TIBC; tipificado de HLA: Tipificación de HLA clase I (-A, -B, -C) y clase II (-DR, -DQ) mediante análisis molecular; electroforesis de hemoglobina (es aceptable un rasgo de talasemia); SGPT o SGOT, fosfatasa alcalina y bilirrubina (total y directa); prueba de embarazo en suero; electrolitos en suero, BUN y creatinina; CMV, IgG, PCR, HSV y VZV IgG, anticuerpos VIH 1 y 2 y PCR, anticuerpos HTLV 1 y 2, antígeno de
55 superficie de Hepatitis B, anticuerpo nuclear de Hepatitis B, anticuerpo de Hepatitis C y PCR, EBV IgG e IgM, Toxoplasma IgG e IgM, NAT para Virus del Nilo Occidental, *Trypanosoma cruzi* (Chagas), RPR o prueba equivalente; anticuerpo nuclear de Hepatitis B (si el anticuerpo es positivo, realizar PCR para ADN vírico, aceptar donante si es negativo); antígeno de superficie de Hepatitis B (rechazar donante positivo a antígeno de la Hepatitis B); anticuerpo del VHC (el donante positivo es aceptable únicamente si la PCR para el ADN vírico es negativo); anticuerpo del Virus Herpes Simplex (únicamente estado documental; el donante positivo no se rechaza); anticuerpo del VIH I/II (rechazar donante positivo para VIH I/II); PCR para VIH (rechazar donante positivo para PCR por VIH); anticuerpo del VIH I/II (rechazar donante positivo para HTLV I/II); título de anticuerpo de CMV (si es positivo y el paciente es negativo, considerar si hay otro donante, es obligatoria una exploración de CMV y profilaxis); prueba serológica para sífilis (si es positivo, realizar un ensayo de anticuerpos treponémicos fluorescentes; el donante se
60 acepta si el anticuerpo treponémico fluorescente es negativo); rayos X de tórax, si el donante es mayor de 21 años;

y EKG si el donante es mayor de 40 años.

Ejemplo 5 - Tratamiento del donante previo al trasplante

5 Para los donantes, se recogieron un total de 560 cc de sangre para el archivo de linfocitos para el ensayo de inmunocompetencia. Esto puede obtenerse como una única donación previa al trasplante de sangre (450 cc). Los once tubos de recogida de tapón amarillo de 10 cc resultantes se obtienen ocho semanas después de la primera donación. Para los donantes de médula ósea pediátricos, no se extraen más de 3 ml/kg al mismo tiempo, y no se extraen más de 7 ml/kg durante un periodo de seis semanas según las directrices del NIH para extracciones de sangre en investigación pediátrica.

10 Comenzando el día -4 (con respecto a una infusión de HSC + hFC) y hasta +4 días, se administran dos veces al día 10 µg/kg de G-CSF. La recogida comienza el día -1. Se recoge un mínimo de 5×10^6 CD34/kg total. Se hace un máximo de dos recogidas. Con cada donación de células madre sanguíneas, se toman 5-10 ml de sangre al inicio y al final del procedimiento para medir los recuentos de células sanguíneas que incluyen la enumeración de células CD 34+.

15 Dos días y una semana después de la donación, se contacta con el donante para confirmar si se ha producido cualquier reacción adversa. También se pide al donante que done una muestra de sangre (7 µl) un mes después de la donación para garantizar que los recuentos sanguíneos se han recuperado. El donante se trata con hierro terapéutico, Vitamina K o calcio según sea necesario. Las visitas para la administración de G-CSF, las donaciones de células madre sanguíneas, y las extracciones de sangre se resumen a continuación en la Tabla 4 (por ejemplo, una X marca lo que ocurrirá en cada visita).

25

Tabla 4

Visitas	Evaluación de los Síntomas	Filgrastim/G-CSF	Donación de Células Madre Sanguíneas	Extracciones de Sangre
Exploración	X			X
Preparación, Día -3	X	X		X
Preparación, Día -2	X	X		
Preparación, Día -1	X	X		
Preparación, Día 0, Primera donación	X	X	X	X
Segunda donación*	X		X	X
2 días después de la donación	X			
1 semana después de la donación	X			
Extracciones de sangre potenciales para ensayar el quimerismo donante en el receptor (hasta 3 años)				X
*La 2ª donación se produce únicamente si no se obtienen suficientes células en la 1ª recogida				

Ejemplo 6 - Acondicionamiento del receptor

30 Los individuos se examinaron por un radioterapeuta para determinar la dosimetría para la ICT. Se establece un acceso venoso central en todos los pacientes antes del inicio del acondicionamiento. Se administra Campath-1H en una primera sesión el día -53, -52, -51 y -50 a una dosis máxima de 30 mg y en una segunda sesión a una dosis máxima de 20 mg administrados el día -24, -23, -22 y -21. La dosis pediátrica de Campath es 10 mg/día en el ciclo uno y 7 mg/día en el ciclo dos. Para receptores más pequeños y aquellos menores de un año, Campath-1H se dosifica a una dosis redondeada de 0,4 mg/kg para el primer régimen, y a una dosis redondeada de 0,3 mg/kg para el segundo régimen. La vía de administración del Campath, por vía subcutánea o intravenosa, es a discreción del médico tratante. Las fechas de inicio para la administración de Campath pueden adelantarse o retrasarse 1-3 días para dar cabida a conflictos de programación. La Fludarabina se administra el día -5, -4 y -3. El individuo recibe ICT y comienza la inmunosupresión por ciclosporina el día -1. La segunda medicación inmunosupresora, micofenolato mofetilo, se inicia la noche de la infusión de HSC + hFC (día 0). El régimen de acondicionamiento se muestra en la siguiente Tabla.

40

Tabla 5. Enfoque de Acondicionamiento

Día - 53 a - 50	Campath-1H se administra a 30 mg/día para adultos y 10 mg/día para niños durante cada uno de los cuatro días.
Día - 24 a - 21	Campath-1H se administra a 20 mg/día para adultos y 7 mg/día para niños durante cada uno de los cuatro días.
Día - 5, -4, -3	Fludarabina se administra a 30 mg/m ² por vía intravenosa durante un periodo de 30 minutos en cada uno de estos tres días.
Día - 1	Acondicionamiento previo al trasplante 200 cGy de ICT (35-40 cGy/min); la ciclosporina se administra el día -1 y se continúa hasta que se ha determinado que el paciente se ha implantado, o se ha demostrado que el injerto del paciente ha fracasado, o a la discreción del médico. Si se produce el injerto, la ciclosporina se continúa durante al menos 12 meses. Si no hay injerto, el tratamiento con ciclosporina se interrumpe. La médula se procesa para retener hFC y HSC usando un enfoque ferromagnético.
Día 0	Se administra HSC + hFC. Se inicia tratamiento con MMF.

La radiación se administra el día -1. La dosis de radiación es de 200 cGy de rayos X de un acelerador de 6 MV, administrada en una fracción. Se usa una velocidad de dosis de 35-40 cGy/minuto, dependiente de la distancia, la energía y las dimensiones del paciente. Las variaciones de dosis mayores del 10 % se evalúan y se aprueban en una base individual. La infusión de las HSC + hFC se produce el día 0. Los pacientes reciben penicilina diaria o una profilaxis equivalente durante 2 años después del trasplante, o durante más tiempo a discreción del médico tratante.

Ejemplo 7 - Procesamiento de células HSC + hFC

Las células madre de sangre periférica movilizada se incuban con anticuerpos monoclonales que son específicos para linfocitos T y linfocitos B TCR alfa beta, después se empobrecen por separación inmunomagnética. La composición de las células infundidas se evalúa por tinción inmunofluorescente para HSC CD34; hFC CD8+/TCR-/CD56^{dim/neg}; linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T TCR+ $\alpha\beta$. La adecuación del empobrecimiento celular se determina mediante análisis de citometría de flujo, y se advierte al médico de las dosis celulares preliminares antes de la infusión. El producto celular también se analiza para bacterias, hongos y endotoxinas. El producto de HSC + hFC se infunde a través de una línea venosa central en un marco monitorizado siguiendo las directrices institucionales.

El injerto procesado se administra a todos los sujetos, y el injerto únicamente se limita basándose en la dosis TCR alfa beta máxima permisible. Sin embargo, únicamente aquellos sujetos con un injerto mínimamente aceptable (por ejemplo, al menos 5 x 10⁹ leucocitos totales disponibles de la colección a procesar; al menos 5 x 10⁶ CD34/kg de peso corporal del receptor; y un empobrecimiento de linfocitos T de menos de 0,5 log) se evalúan como se describe en el presente documento.

Ejemplo 8 - Algoritmo de dosificación celular

Se administran tantas HSC, hFC y progenitoras como sea posible dentro del contexto de una dosis de linfocitos T permisible máxima para evitar EICH. Actualmente, la dosificación máxima es de 3,0 x 10⁶ a 4,2 x 10⁶ linfocitos T alfa beta/kg de peso corporal del receptor (con un punto de inicio preferido en 3,8 x 10⁶ linfocitos T alfa beta/kg de peso corporal del receptor). Se hace un seguimiento de los receptores durante un mínimo de 28 días. Si no se observa injerto, la dosis TCR alfa beta permisible máxima aumenta en una unidad (4 x 10⁵/kg de peso corporal del receptor). La dosis TCR alfa beta permisible máxima se aumenta hasta que se consigue un injerto estable sin EICH significativa. Para trasplantes HLA compatibles, no hay ningún límite de linfocitos T máximo y la dosis celular no aumenta basándose en el resultado de estos trasplantes compatibles. Para pacientes que no eran compatibles, se determina la dosis TCR alfa beta permisible máxima.

Tabla 6

HSC, hFC, progenitoras		Tantas como sea posible
Células NK, linfocitos B		Registro e informe de dosis
Linfocitos TCR+ $\gamma\delta$	T	Registro e informe de dosis
Linfocitos TCR+ $\alpha\beta$	T	Para HLA compatible, no hay ningún límite. Para HLA incompatible, la dosis permisible máxima se determinará por la última dosis segura en el riñón, corazón, tolerancia hepática, células falciformes y protocolos MS.

Si se observa un injerto donante significativo (>0,5 %) en los primeros 28 días, se hace un seguimiento del individuo durante 28 días más para evaluar la incidencia de EICH aguda.

Ejemplo 9 - Pacientes con Células Falciformes Adicionales Trasplantados

El Sujeto Nº 5 tenía 9 años en el momento del trasplante (marzo de 2006). Había experimentado múltiples crisis de dolor, dos episodios de síndrome torácico agudo antes del trasplante, y había recibido tratamiento con transfusiones de intercambio durante 7 años. El sujeto recibió médula ósea de la cresta ilíaca de un hermano donante con rasgo HLA compatible y se acondicionó básicamente con el mismo régimen que se ha descrito en la Sección C anterior. El injerto contenía $5,24 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso corporal, $0,55 \times 10^6$ células TCR⁺ alfa beta/kg de peso corporal y $0,35 \times 10^6$ células FC/kg de peso corporal. El sujeto no dependió de transfusiones después del trasplante de células madre con una producción RBC donante del 100 % y niveles de quimerismo al 20-30 % de donante por FISH durante más de 1525 días después del trasplante. La inmunosupresión se interrumpió a los 23 meses después del trasplante. El sujeto no mostró enfermedad de injerto contra huésped (EICH), toxicidad relacionada con el trasplante ni complicaciones en las células falciformes desde el trasplante.

El Sujeto Nº 7 era un varón de 16 años que experimentó episodios repetidos de síndrome torácico agudo que requirieron terapia de transfusión de glóbulos rojos. Antes de someterse al trasplante en septiembre de 2009, fue hospitalizado por osteomielitis de la rodilla derecha y múltiples eventos dolorosos vaso-occlusivos. El sujeto recibió un trasplante haploidéntico de su padre. El sujeto se acondicionó básicamente como se ha descrito anteriormente en la Sección C. El sujeto toleró bien el acondicionamiento y el trasplante transcurrió sin incidentes. Recibió $3,26 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso corporal, $3,8 \times 10^6$ células TCR+ alfa beta/kg de peso corporal, y $0,5 \times 10^6$ células FC/kg de peso corporal, y se le trató como paciente ambulatorio. Desafortunadamente, este sujeto no cumplió el periodo inmediato posterior al trasplante y no tomó regularmente ciclosporina ni MMF como era necesario. No hubo presente quimerismo en los meses 1 y 2 posteriores al trasplante. Después del trasplante, experimentó una crisis de color recurrente que se resolvió posteriormente. El sujeto permaneció en el estudio para controlar las reacciones secundarias, pero las pruebas de quimerismo se interrumpieron después de mes 2 después del trasplante.

El Sujeto Nº 8 era una mujer de 12 años que experimentó numerosas hospitalizaciones por crisis de dolor. También se había sometido a una esplenectomía tras secuestro y colecistectomía. Se sometió a acondicionamiento básicamente como se ha descrito anteriormente en la Sección C, y recibió un trasplante haploidéntico de su padre, que tenía el rasgo ACF. Recibió $19,1 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso corporal, $3,8 \times 10^6$ células TCR+ alfa beta/kg de peso corporal, y $0,79 \times 10^6$ FC/kg de peso corporal, y, después del trasplante, se trató como paciente ambulatorio. Toleró el acondicionamiento muy bien y demostró un fuerte injerto donante del 71 % un mes después del trasplante. Su quimerismo de sangre completa permaneció duradero al 84 %, con quimerismo linfoide al 58 % y quimerismo mieloides al 95 % el noveno mes. Producía RBC donante al 100 % como se refleja por la hemoglobina A al 57 %, hemoglobina S al 41 %, y hemoglobina A2 al 2% como se demostró por electroforesis de hemoglobina. El sujeto no ha necesitado terapia de transfusión desde el trasplante y no presenta síntomas. No ha tenido ninguna evidencia de EICH.

El Sujeto Nº 9 era un varón de 25 años que experimentó transfusiones de PRBC repetidas, colecistectomía con anemia de células falciformes, hipertensión y enfermedad vascular renal antes del trasplante. El sujeto se acondicionó básicamente como se ha descrito anteriormente en la Sección C, y toleró bien el acondicionamiento. Las células TCR+ alfa beta para este sujeto se aumentaron a $4,2 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, y el sujeto también recibió $1,46 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso corporal y $0,72 \times 10^6$ FC/kg de peso corporal. Demostró un quimerismo donante del 10 % el mes 1 después del trasplante. Su quimerismo descendió al 4 % el segundo mes y hasta menos del 2 % el día 100. El sujeto estuvo hospitalizado por creatinina elevada debido a sensibilidad a los inhibidores de calcineurina (CNI) en el segundo mes después del trasplante. La dosis se ajustó y el SAE se resolvió. Aproximadamente un mes más tarde, fue hospitalizado por fiebre, cocos gram positivos e infección por CMV. Salió del estudio para participar en un fármaco experimental para el tratamiento de CMV.

Sección E - Prevención de Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH) tras Trasplante de Órgano SólidoEjemplo 1 - Captación de pacientes

Los candidatos para el protocolo se seleccionaron entre la lista de pacientes que esperaban un trasplante renal o que estaban siendo evaluados para trasplante. Este proceso de selección se realizó por los cirujanos de trasplantes y los coordinadores de enfermeras de trasplante del Institute of Cellular Therapeutics de la University of Louisville ("el Instituto").

Ejemplo 2 - Criterios de Inclusión

Un paciente candidato debe tener entre 18 y 65 años y cumplir los criterios de la Institución para trasplante renal para fallo orgánico terminal. Un paciente candidato debe estar recibiendo su primer trasplante renal. Un paciente candidato debe estar recibiendo un trasplante renal únicamente. La compatibilidad cruzada debe ser negativa entre el donante y el receptor. Las mujeres que están en edad fértil potencial deben tener una prueba de embarazo negativa (es aceptable una prueba de orina) 48 horas antes de iniciar la ICT y deben estar de acuerdo en usar anticoncepción fiable durante 1 año después del trasplante. Los pacientes candidatos no han de mostrar evidencia

alguna de anticuerpo específico de donante, en la actualidad o en el pasado.

Ejemplo 3 - Criterios de Exclusión

5 Los pacientes no son candidatos si tienen una infección bacteriana, fúngica, vírica o parasitaria clínicamente activa, o si están embarazadas. Los pacientes no son elegibles si muestran evidencia clínica o serológica de infección vírica que impedirá que el receptor reciba un trasplante de riñón. Un paciente no es un candidato si han recibido terapia de radiación previa a una dosis que impedirá la ICT, si hay una compatibilidad cruzada positiva entre el donante y el receptor, o si hay evidencia de memoria inmunológica frente al donante. Los pacientes también se excluyen si su índice de masa corporal (IMC) es inferior a 18 o menor de 35.

Ejemplo 4 - Criterios de Selección de Donantes

15 Los donantes para este protocolo deben cumplir todos los criterios del Instituto para trasplante renal y de células madre.

Ejemplo 5 - Protocolo

20 El tiempo para todas las manipulaciones está relacionado con el condicionamiento a la ICT del receptor el día 0. Comenzando el día -3 y durante cuatro días, se administraron dos veces al día 10 µg/kg de G-CSF. La recogida comenzó el día 0. El día 0, se realizó un recuento de CD34 antes de administrar la dosis final de G-CSF. El trasplante de HSC + hFC se programó de 4 a 6 semanas antes de la fecha deseada de la recogida del riñón. La donación y el trasplante del riñón no se programa hasta que los recuentos plaquetarios del donante han regresado a niveles iniciales y seguros para la donación del riñón (por ejemplo, más de 100.000/µl de sangre completa).

25 Las visitas para la administración de G-CSF, donaciones de células madre sanguíneas, y extracciones de sangre se resumen en Tabla 7. La "X" marca lo que ocurrirá en cada visita.

Tabla 7. Movilización del Donante

Visitas	Evaluación de los Síntomas	Filgrastim/G-CSF	Donación de Células Madre Sanguíneas	Extracciones de Sangre
Exploración	X			X
Preparación, Día -3	X	X		X
Preparación, Día -2	X	X		
Preparación, Día -1	X	X		
Preparación, Día 0, Primera donación	X	X	X	X
2 días después de la donación	X			
1 semana después de la donación	X			
Extracciones de sangre potenciales para ensayar el quimerismo donante en el receptor (hasta tres años)				X

30 Ejemplo 6 - Acondicionamiento previo al trasplante

35 La dosis celular (HSC + hFC), así como el grado de tipo de acondicionamiento del receptor fueron variables independientes que afectan al injerto. En el protocolo actual, la dosis celular y el acondicionamiento se optimizaron hasta que se estableció >1 % de quimerismo donante. La dosis celular diana inicial para HSC + hFC fue $\geq 1 \times 10^8$ CD34+/kg. Los primeros pacientes recibieron 200 cGy de ICT, fludarabina (30 mg/m² día -3 a -1), e inmunosupresión después del trasplante con MMF (15 mg/kg cada 12 h comenzando el día 0), y FK506 (0,02 mg/kg cada 12 h comenzando el día -1) durante seis meses, o según lo requiera la necesidad clínica. La decisión de usar FK506 (tacrolimus) o ciclosporina se dejó al médico ya que los pacientes diferían en su capacidad para tolerar cualquier fármaco. La médula se infundió el día +1. La programación se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Día	Tratamiento	Dosis
-3	Fludarabina después de diálisis (cuando se requiera)	30 mg/m ²
-2	Fludarabina después de diálisis (cuando se requiera)	30 mg/m ²
-1	Fludarabina	30 mg/m ²
0	Iniciar MMF y FK506 o ciclosporina	
0	ICT (200 cGy)	35-40 cGv/min
	Cosechar médula donante y procesar para obtener HSC + hFC	
+1	Infundir HSC + hFC después de diálisis (cuando se requiera)	
+28-60	Trasplante renal; continuar MMF e inhibidores de calcineurina	

Si el receptor requería diálisis, la dosificación de fludarabina y la infusión de HSC + hFC se produjo después de la diálisis los días especificados. A la mañana de la infusión de HSC + hFC, se eliminó un litro adicional de volumen de la diálisis para contar el volumen de HSC + hFC. Después, se programó diálisis para 48 h o más tarde después de la infusión de HSC + hFC para dar a las células una oportunidad óptima de alojarse en el compartimento medular.

Ejemplo 7 - Resultados

Pasaron un mínimo de aproximadamente 2 semanas después de la infusión de HSC + hFC, o siempre que el paciente necesite recuperarse completamente del procedimiento de trasplante de células madre, antes de que el trasplante renal se realizase del mismo donante. Se usó el siguiente algoritmo basándose en el resultado del trasplante de HSC + hFC.

- 1) Si el receptor mostró un quimerismo de $\geq 1\%$ y se determinó como tolerante al donante, se administraron al menos seis meses de Prograf y MMF mientras que se establece la tolerancia donante:huésped para el riñón. El receptor no recibió Campath-1H ni ninguna inmunosupresión adicional en el momento del trasplante.
- 2) Si el receptor no se injertó, el paciente se sometió a ensayo por compatibilidad cruzada de flujo antes del trasplante para asegurar que no se desarrolló ningún anticuerpo específico de donante. Si no había presente ningún anticuerpo específico de donante, el paciente se somete a trasplante de riñón donante vivo usando inducción de linfodepleción convencional con Campath-1H seguido de inmunosupresión de mantenimiento con FK506 y MMF. Pueden usarse otros enfoques de linfodepleción para terapia de inducción, tal como ALG, en lugar de Campath según la normativa de atención.
- 3) Si se desarrolló anticuerpo específico de donante, el paciente se evaluó y se implementó un protocolo de reducción de anticuerpos clínicamente apropiado antes del trasplante. No se esperó sensibilización del paciente.

Ejemplo 8 - Algoritmo de dosificación celular

El objetivo del estudio fue crear por ingeniería un injerto con HSC, hFC y progenitoras adecuadas para un injerto alogénico evitando al mismo tiempo EICH. Se estableció un algoritmo de dosificación celular que está ligado a la dosis de linfocitos T alfa beta permisible máxima. Por ejemplo, si la toxicidad (EICH) no se produjo pero el injerto no fue duradero, la dosis de linfocitos T permisible máxima se aumentó en 1 unidad (véase a continuación). Se administró la dosis de linfocitos T permisible máxima que contenía tantas HSC, hFC y progenitoras como fue posible. El algoritmo que se usó se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

HSC, progenitoras	hFC,	Tantas como sea posible
Linfocitos T alfa beta	TCR+	Para HLA compatible, no hay límite. Para HLA incompatible, la dosis máxima permisible se determina por la última dosis segura en el riñón, corazón, tolerancia hepática, células falciformes y protocolo
Células linfocitos B	NK,	Registro e informe de dosis
Linfocitos T gamma delta	TCR+	Registro e informe de dosis

La presente dosificación celular permite actualmente un máximo de $3,0 \times 10^6$ a $4,2 \times 10^6$ linfocitos T alfa beta/kg de peso corporal del receptor; $3,8 \times 10^6$ linfocitos T alfa beta/kg de peso corporal del receptor fue la dosis de partida. Se hizo un seguimiento de cada paciente durante al menos 28 días. Si no se observó ninguna evidencia de injerto, la dosis TCR alfa beta máxima permisible se aumentó en una unidad (4×10^5 /kg de peso corporal del receptor). La dosis TCR alfa beta máxima permisible se aumentó en los sujetos hasta que se consiguió un injerto estable sin EICH significativa. Para trasplantes HLA compatibles, no hubo ningún límite de linfocitos T máximo y la dosis celular no se aumento basándose en el resultado de los trasplantes compatibles. Para pacientes que no eran compatibles, se determinó la dosis TCR alfa beta máxima permisible.

Si se observó un injerto donante significativo ($>0,5\%$) en los primeros 28 días, el sujeto se siguió durante 28 días más para evaluar la incidencia de EICH aguda antes de aumentar la dosis celular. Se esperaba que la mayor parte de los casos de EICH aguda fuesen evidentes 8 semanas después del trasplante. Si se observó evidencia de EICH grave, la dosis de linfocitos T permisible máxima se redujo a un nivel seguro probado. Hasta la fecha, no se ha observado EICH.

Ejemplo 9 - HSC + hFC

Se procesó PBMC donante para enriquecer las hFC y HSC. Se eliminó aproximadamente el 85 % de la composición de médula ósea total, incluyendo linfocitos T y linfocitos B que producían EICH, usando un enfoque ferromagnético.

El producto resultante se enriqueció con hFC, HSC y progenitoras. Después de confirmar la adecuación del procesamiento por citometría de flujo, el injerto de HSC + hFC se aprobó para infusión. Se aceptó un retraso en el trasplante de médula ósea de hasta 72 horas tras la cosecha de células donante para permitir el procesamiento de la médula ósea y el trasplante. Se inició profilaxis ajustada a la dosis con Bactrim y Valcyte (si CMV+) o Valtrex (si CMV-). El paciente se controló cuidadosamente durante y después de la infusión de la médula para detectar cualquier cambio en, por ejemplo, la respiración, la presión arterial, o angioedema, que puede ser una indicación de hipersensibilidad.

Ejemplo 10 - Inmunosupresión después del trasplante

Los sujetos incluidos en este protocolo recibieron inmunosupresión convencional a discreción del médico tratante y de acuerdo con el protocolo institucional. Para receptores de riñón donante fallecido/HSC + hFC y receptores de HSC + hFC donante vivo sin quimerismo donante demostrable en 1 mes, esto incluía generalmente Prograf más MMF después de la terapia de inducción de linfodepleción con ALG o Campath. Los niveles de Prograf se mantuvieron entre 8-12 ng/ml. Comenzando el día 0, MMF se dosificó generalmente a 1-1,5 g dos veces al día. Se administró opcionalmente una dosis única de Campath, 30 mg IV, en el quirófano. Se administró SoluMedrol en una dosis de 500 mg IV en el quirófano una hora antes de la dosis de Campath, después, tras la operación, el día 1 en una dosis de 250 mg IV y tras la operación, el día 2 en una dosis de 125 mg. Se continuó el tratamiento con FK506 y MMF durante al menos 6 meses en pacientes que fueron quiméricos para promover el injerto y la inducción de tolerancia.

Ejemplo 11 - Protocolo de trasplante de órganos sólidos preliminar

Los experimentos preliminares demostraron el éxito y seguridad de las HSC + hFC y el acondicionamiento no mieloablativo basado en la inmunidad en receptores de trasplante renal. La dosificación de las HSC + hFC se realizó para maximizar la seguridad y optimizar el contenido de HSC y hFC. La meta global fue evitar por completo la EICH. Los protocolos de tolerancia a órganos sólidos comenzaron con un máximo de $0,2 \times 10^6$ linfocitos T/kg de peso corporal del receptor para realizar un aumento gradual de la dosis. Se usaron linfocitos T alfa beta totales en los experimentos de aumento gradual de la dosis dado que las demás efectoras para EICH (NK, linfocitos B y APC) están todas presentes en cantidades proporcionales a los linfocitos T alfa beta totales. Se optimizaron las dosis de CD34 y hFC dentro de la dosis de linfocitos T máxima permisible. No se observó ningún evento inmunológico significativo (es decir, episodios de rechazo o producción de anticuerpos) en ninguno de los pacientes. Ninguno de los pacientes desarrolló EICH, pero únicamente se observó quimerismo transitorio.

Desde septiembre de 2004, se han trasplantado nueve pacientes de corazón y once de riñón usando la estrategia de aumento gradual de la dosis expuesta en la Tabla 10. Los pacientes 5, 6, 12 y 13, que se destacan en la Tabla 10, se describen en más detalle; tres pacientes se sometieron a un trasplante de riñón/HSC + hFC simultáneo de donantes vivos y el resto de pacientes recibió su riñón de un donante fallecido. Los cuatro pacientes se acondicionaron con 200 cGy de ICT y se sometieron a terapia de inducción de linfodepleción con Campath seguida de inmunosupresión de mantenimiento con MMF y un inhibidor de calcineurina. No recibieron fludarabina. Los 4 pacientes se describen brevemente a continuación.

El Paciente N° 5 es un varón de 55 años que se sometió a un trasplante de aloinjerto renal de donante fallecido/HSC + hFC en septiembre de 2005. El paciente recibió $3,7 \times 10^6$ CD34 y $0,8 \times 10^6$ hFC por kg de peso corporal del receptor. El acondicionamiento se toleró bien y no se produjo ninguna reacción adversa relacionada con el enfoque. El donante y el receptor compartían una compatibilidad 1/6 de HLA-antígeno. El paciente experimentó el nadir anticipado, y después recuperó la función inmune y la hematopoyesis endógena. Se encuentra bien y con una creatinina en suero reciente de 2,1.

El Paciente N° 6 es un varón de 58 años que se sometió a un trasplante de riñón de donante vivo/HSC + hFC de un amigo no emparentado en noviembre de 2005. El paciente recibió $1,33 \times 10^6$ CD34 y $0,18 \times 10^6$ hFC por kg de peso corporal del receptor. El acondicionamiento se toleró bien y no se produjo ninguna reacción adversa relacionada con el enfoque. El donante y el receptor compartían una compatibilidad 1/6 de HLA-antígeno. El paciente experimentó el nadir anticipado, y después recuperó la función inmune y la hematopoyesis endógena. Se encuentra bien, con una creatinina en suero reciente de 2,0.

El Paciente N° 12 es una mujer de 37 años que se sometió a un trasplante de riñón de donante vivo/HSC + hFC de su primo en octubre de 2007. Recibió $2,24 \times 10^6$ CD34 y $0,41 \times 10^6$ hFC por kg de peso corporal del receptor. El acondicionamiento se toleró bien y no se produjo ninguna reacción adversa relacionada con el enfoque. El donante y la receptora compartían una compatibilidad 2/6 de HLA-antígeno. La paciente experimentó el nadir anticipado, y después recuperó la función inmune y la hematopoyesis endógena. Se encuentra bien, con una creatinina reciente de 1,2.

El Paciente N° 13 es una mujer de 49 años que se sometió a un trasplante de riñón/HSC + hFC de su hermano en noviembre de 2007. La paciente recibió $3,85 \times 10^6$ CD34 y $0,78 \times 10^6$ hFC por kg de peso corporal del receptor. El

acondicionamiento se toleró bien y no se produjo ninguna reacción adversa relacionada con el enfoque. El donante y la receptora compartían una compatibilidad 4/6 de HLA-antígeno. La paciente experimentó el nadir anticipado, y después recuperó la función inmune y la hematopoyesis endógena. Se encuentra bien, con una creatinina reciente de 1,2.

5

Tabla 10. Dosificación celular para pacientes (por kg de peso del receptor)

Nº	Trasplante	Fecha del trasplante	Fuente	ICT (cGy)	Linfocitos T*	CD34*	hFC*
1	Corazón	Septiembre de 2004	VB	200	0,2	1,99	0,23
2	Riñón	Octubre de 2004	MPB	200	0,2	0,78	0,02
3	Corazón	Diciembre de 2004	VB	200	0,4	5,70	1,07
4	Riñón	Febrero de 2005	VB	200	0,6	3,80	0,14
5	Riñón	Septiembre de 2005	VB	200	0,8	3,70	0,80
6	Riñón	Noviembre de 2005	MPB	200	1,0	1,33	0,18
7	Corazón	Marzo de 2006	VB	200	1,2	0,71	0,08
8	Corazón	Marzo de 2006	VB	200	1,2	5,60	0,74
9	Corazón	Mayo de 2006	VB	200	1,4	4,69	0,55
10	Corazón	Febrero de 2007	VB	200	1,8	3,81	0,72
11	Corazón	Agosto de 2007	VB	200	1,8	2,08	0,75
12	Riñón	Octubre de 2007	MPB	200	2,2	2,24	0,41
13	Riñón	Noviembre de 2007	MPB	200	2,2	3,85	0,78
14	Corazón	Enero de 2008	VB	200	2,6	2,67	1,61
15	Riñón	Marzo de 2008	MPB	200	3,0	9,26	9,34
16	Riñón	Abril de 2008	MPB	200	3,0	1,45	5,81
17	Corazón	Abril de 2008	VB	200	3,4	4,86	1,87
18	Riñón	Febrero de 2009	IC	200	0,96	0,90	0,16
19	Riñón	Abril de 2009	MPB	200	3,8	2,53	4,48
20	Riñón	Mayo de 2009	MPB	200	3,8	3,60	0,90

*x 10⁶ > células; VB = cuerpo vertebral; MPB = sangre periférica movilizada; IC = cresta ilíaca

Ejemplo 12 - Resultados del protocolo preliminar

10 Inicialmente, el quimerismo observado fue bajo (<0,2%) y únicamente transitorio. Sin embargo, según se aumentó la dosis celular total, se consiguió un quimerismo mixto duradero. La respuesta inmune al injerto se moduló por la infusión de médula como fue evidente por la tolerancia específica de donante transitoria en ensayos de reacción mixta de linfocitos (MLR) observados en los pacientes trasplantados más recientemente y la ausencia de cualquier episodio clínico o de rechazo histológico.

15 El hecho de que la hematopoyesis endógena se reanudara en los pacientes que no confirmaron el injerto confirmó la naturaleza no mieloablativa del acondicionamiento. Hubo un nadir esperado de recuento absoluto de neutrófilos (ANC) de menos de 1.000 que se produjo en los receptores entre 7 y 18 días (figuras 9A y 11A), que se trató como un paciente ambulatorio en el Paciente Nº 12. Se descubrió que la administración de G-CSF no aceleró la recuperación. El tratamiento con MMF y FK506 continuó a través del nadir para promover el injerto. La recuperación de linfocitos B (CD 19), células CD4+, y células CD8+ se produjo en 3 meses en el receptor Nº 12 con linfodepleción con Campath (figura 11B). Los recuentos plaquetarios se determinaron tras el trasplante de órgano sólido (figuras 9B, 10A y 11C). El nadir plaquetario, si está presente, típicamente fue breve y normalmente no requirió terapia de transfusión. El quimerismo que se estableció en pacientes de trasplante sólido se muestra en las figuras 9C y 10B.

Ejemplo 13 - Protocolo modificado para trasplante de órganos sólidos

25 El protocolo de trasplante de riñón/HSC + hFC se modificó para añadir acondicionamiento con fludarabina y realizar los trasplantes de donante vivo secuencialmente, con HSC + hFC administradas un mes antes de la colocación del injerto de riñón.

30 El primer trasplante (fase 1 FCRx) se realizó en marzo de 2008 (Paciente Nº 15 en la Tabla 10). Es una mujer de 31 años cuyo marido fue su donante. La paciente está actualmente en su periodo de nadir y va bien como paciente extrahospitalaria. Una compatibilidad cruzada de flujo realizada el día 14 fue negativa (Tabla 11). En este ensayo, la unión de anticuerpos a los linfocitos T y B donantes se midió por análisis de citometría de flujo en unidades MCDF.

35

Tabla 11: Compatibilidad Cruzada de Flujo

	Linfocitos T			Linfocitos B		
	% de Linfocitos T	MCDF	Positivo/Negativo	Linfocitos B	MCDF	Positivo/Negativo
Control Negativo	57	250	-	5	301	-
Control Positivo	52	495	+	5	534	+
Paciente N° 15	54	245	-	5	246	-
Paciente N° 15	52	252	-	5	266	-

Estos resultados demostraron la seguridad del acondicionamiento no mieloablativo y la viabilidad del proceso HSC + hFC y el producto en un trasplante de órgano sólido. Cabe destacar que ninguno de los receptores se volvió sensible al donante.

Sección F - Trasplante de Riñón

Ejemplo 1 - Elegibilidad del Donante y el Receptor

Todos los protocolos se aprobaron por el Northwestern Institutional Review Board, FDA IND 13881, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes y receptores. Los donantes y los receptores debían cumplir los criterios institucionales como donantes y receptores de trasplante vivos adecuados; los participantes tuvieron que completar todas las fases de la evaluación de donantes y receptores pre-trasplante a considerar para la participación en el estudio. Los criterios de inclusión para los receptores de trasplante incluían edad entre 18 y 65 años, ausencia de anticuerpos específicos de donante según se evaluó por análisis PRA de flujo, y haber recibido únicamente un trasplante de riñón de donante vivo. Las mujeres en edad fértil tenían que tener una prueba negativa de embarazo (prueba de orina aceptable) en las 48 horas de la recepción de ICT y tenían que comprometerse a usar métodos anticonceptivos fiables durante un año después del trasplante. Los criterios de exclusión incluían infección bacteriana, fúngica, vírica o parasitaria clínicamente activa, embarazo, terapia de radioterapia anterior a una dosis que impediría la ICT, una compatibilidad cruzada por citometría de flujo positiva entre el donante y el receptor, presencia de anticuerpos específicos de donante, índice de masa corporal (IMC) >35 o <18, y serologías positivas para VHB, VHC y VIH.

Ejemplo 2 - Acondicionamiento y Preparación del Producto Donante

El acondicionamiento consistió en tres dosis de fludarabina (30 mg/kg/dosis) los días -4, -3, -2; dos dosis de ciclofosfamida (Cytosan; 50 mg/kg/dosis) los días -3 y +3; y 200 cGy de ICT el día -1 relativa al trasplante renal como se representa en la figura 12. La hemodiálisis se realizó 6-8 h después de la administración de fludarabina y Cytosan. Tacrolimus (concentraciones mínimas diana 8-12 ng/ml) y micofenolato mofetilo (MMF) (Cellcept; 1 g por vía oral dos veces al día si el receptor pesa <80 kg, 1,25 g dos veces al día si el receptor pesa >80 kg) se iniciaron el día -3 y se continuó durante todo el acondicionamiento. Las HSC + hFC pueden administrarse al receptor el día 0 (es decir, el mismo día del trasplante) o el día +1.

Ejemplo 3 - Recogida de Células Madre Hematopoyéticas

Al menos dos semanas antes del trasplante renal, los donantes se movilizaron con factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) a 10 mcg/kg dos veces al día y la aféresis se realizó el día +4. El producto se transportó por mensajería al Institute for Cellular Therapeutics (ICT) y se procesó para eliminar las células productoras maduras de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) mientras que se conservaron las células madre hematopoyéticas (HSC), las células facilitadoras (FC) y las células progenitoras. Después, el producto se envió de nuevo a Northwestern University para su infusión, como producto fresco o crioconservado.

Ejemplo 4 - Monitorización Inmunológica

La respuesta del receptor a PHA, *Candida*, toxoide tetánico, aloantígenos de donante y de terceros, se ensayó mensualmente (véase, por ejemplo, Patel y col., 2008, J. Allergy Clin. Immunol., 122: 1185-93). El ensayo de compatibilidad cruzada de flujo para detectar anticuerpos donantes se realizó en 1 y 6 meses. La prueba de quimerismo se realizó por ensayo molecular usando repeticiones cortas en tándem (Akpınar y col., 2005, Transplant., 79: 236-9). Las biopsias de supervivencia se realizaron en 1 año. En los puntos temporales seleccionados, se realizó un análisis inmunofenotípico de sangre periférica para la recuperación de linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos, linfocitos T reguladores CD4⁺/CD25⁺ Fox P3⁺ (T_{reg}) y linfocitos T efectores (T_{eff}).

Ejemplo 5 - Prueba de Quimerismo

El quimerismo se determinó mediante el genotipado de polimorfismo de secuencia larga sencilla que codifican repeticiones cortas en tándem (STR). Para la prueba de quimerismo de linaje, se clasificaron las células CD19⁺ (linfocitos B), CD3⁺ (linfocitos T) y mieloides CD66B⁺ a partir de sangre completa y después se analizaron por tipificación STR molecular.

Ejemplo 6 - Retirada de Inmunosupresión

El tratamiento con Prograf y MMF se continuó según la normativa de atención hasta 6 meses después del trasplante. En ese momento, si estaba presente quimerismo o tolerancia específica de donante, el tratamiento con MMF se interrumpió en primer lugar, después el tratamiento con Prograf se redujo hasta cantidades sub-terapéuticas los pocos meses siguientes (por ejemplo, $\leq 3,0$ ng/ml en 9 meses). El tratamiento con Prograf se interrumpió en 12 meses si había presente evidencia de quimerismo y/o hipersensibilidad específica de donante *in vitro*.

Ejemplo 7 - Resultados

A continuación se muestra un resumen del Sujeto N° 1 - Sujeto N° 9 en la Tabla 12, y la Tabla 13 muestra los regímenes de dosificación celular. Algunos de los sujetos se analizan en más detalle como se indica a continuación.

El Sujeto N° 3 es un varón caucásico de 43 años que desarrolló ESRD debido a enfermedad renal poliquística. Su donante fue un altruista no emparentado 1:6 HLA compatible. Se infundieron un total de $3,8 \times 10^6$ linfocitos T TCR⁺ alfa beta, $2,53 \times 10^6$ células CD34, y $4,48 \times 10^6$ FC/kg de peso corporal del receptor de producto crioconservado. El receptor demostró un quimerismo donante del 95 % en 1 mes, y el quimerismo fluctuó entre el 63 % y 100 % durante 18 meses después del trasplante (figura 13A). A los 12 meses, la prueba multilinaje reveló una producción del 100 % de linfocitos B, linfocitos T y mieloides (figura 13B). La compatibilidad cruzada de flujo fue negativa en 1 mes y 6 meses. El mes 5, el receptor mostró tolerancia específica de donante e inmunocompetencia para responder a un aloantígeno de terceros (figura 13C). Esto ha durado 12 meses. Su función renal ha permanecido estable basándose en los resultados de creatinina (figura 13D). El sujeto mostró un nadir transitorio entre 6-15 días (figura 13E y 13F), que se trató como un paciente ambulatorio.

El Sujeto N° 5 es un varón de 40 años cuyo fallo renal fue secundario a una glomerulonefritis crónica. Se sometió a un trasplante FC/renal combinado a partir de un donante no emparentado 1:6 HLA compatible. Su producto consistía en $3,8 \times 10^6$ linfocitos T TCR⁺ alfa beta, $0,7 \times 10^6$ FC, y $3,94 \times 10^6$ células CD34/kg de peso corporal del receptor. El nadir siguió un patrón similar al sujeto anterior. El quimerismo fue del 100 % en 1 mes, del 92 % en 3 meses, y del 94 % en 5 meses. Un perfil de tolerancia específica de donante comenzó a surgir el mes 3, con respuestas a PHA y aloantígeno de terceros, pero al donante.

El Sujeto N° 6 es una mujer de 39 años que desarrolló ESRD secundaria a reflujo. Se sometió a un segundo trasplante renal de un donante no emparentado 2:6 HLA compatible. El producto consistía en $3,8 \times 10^6$ linfocitos T TCR⁺ alfa beta, $8,59 \times 10^6$ CD34⁺, y $3,11 \times 10^6$ células FC/kg de peso corporal del receptor. El receptor mostró quimerismo donante del 100 % en 1 mes.

Tabla 12. Resumen de Pacientes de Riñón + hFC

Sujeto	Sexo	Edad	Compatibilidad HLA	Fecha de Trasplante	Enfermedad Original	Reacciones Adversas
1	M	50	5/6	Febrero de 2009	Membranosa	enfermedad recurrente 1 año después del trasplante; tratada con éxito con rituximab
2	M	56	3/6	Abril de 2009	Hipertensión	episodio de séptico febril 3 meses después del trasplante, fallo de médula, rescate HSCT autólogo, sepsis y fallo de aloinjerto; ahora trasplantado de nuevo con éxito con riñón de donante vivo
3	M	43	1/6	Mayo de 2009	PCKD	erupción por drogas, herpes
4	M	29	3/6	Junio de 2009	Síndrome de Alport	infección de heridas, rechazo subclínico un año después del trasplante
5	M	40	1/6	Febrero de 2010	GN Crónica	celulitis en flancos, seroma
6	F	39	2/6	Marzo de 2010	Reflujo: 2º Trasplante	ninguna
7	M	35	3/6	Abril de 2010	Hipertensión	ninguna
8	F	46	1/6	Julio de 2010	PCKD	celulitis del sitio i.v.
9	M	28	0/6*	Septiembre de 2010	Nefropatía por IgA	síndrome urémico hemolítico debido a FK506, convertido en sirolimus y resuelto

* 1 compatibilidad de antígeno menor

Tabla 13. Dosificación Celular para Pacientes

Paciente	Fuente	% de quimerismo en 1 mes	Producción de Anticuerpos Anti-donante	Composiciones administrada (10^6 /kg de peso del receptor)		
				linfocitos T alfa beta	CD34	FC
1	IC*	30	No	0,963	,896	0,157
2	MPB*	95	No	3,8	2,53	4,48
3	MPB	100	No	3,8	3,6	0,90
4	MPB	25	No	1,94	1,00	0,49
5	MPB	100	No	3,8	3,94	0,716
6	MPB	100	No	3,8	8,59	3,11
7	MPB	100	No	3,8	16,9	1,16
8	MPB	100	NA	3,8	12,6	2,74
9	MPB	0	NA	3,8	5,07	2,12

*Fuente: IC, médula de cresta ilíaca; MPB, sangre periférica movilizada

Ejemplo 8 - Resumen de Trasplante de hFC y Riñón de Donante Vivo

- 5 En los 9 sujetos trasplantados, el acondicionamiento no mieloablativo se toleró bien. Además, el periodo nadir posterior al trasplante se gestionó fácilmente como ambulatorio.

Ocho de los nueve sujetos mostraron macroquimerismo tras el trasplante, que variaba del 6 % al 100 % en 1 mes. Se consiguió un quimerismo duradero en la mayor parte de los sujetos.

- 10 Un sujeto se retiró por completo de la inmunosupresión. Varios sujetos han mostrado evidencia de hipersensibilidad específica de donante y se preparan para ser retirados de la inmunosupresión. Los sujetos eran inmunocompetentes para responder a mitógeno (PHA), *Candida*, y aloantígeno de terceros MHC-desigual.

- 15 Ninguno de los sujetos desarrollo EICH a pesar de la incompatibilidad HLA.

Sección G. Trastornos Metabólicos

Ejemplo 1 - Tratamiento de Trastornos Metabólicos Heredados

- 20 El Sujeto N° 1 era un niño de siete años con leucodistrofia metacromática. Recibió un trasplante 3: 6 HLA compatible de su padre, que lleva el rasgo de leucodistrofia metacromática. El sujeto se acondicionó básicamente como se ha descrito anteriormente en la Sección C, Ejemplo 2. Toleró el acondicionamiento y la infusión muy bien como paciente ambulatorio. Recibió $14,4 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso corporal, $3,8 \times 10^6$ células TCR+ alfa beta/kg de peso corporal, y $4,1 \times 10^6$ FC/kg de peso corporal. Su nadir fue breve y no requirió terapia de transfusión. Su quimerismo, por STR molecular, ha variado entre el 80 % - 98 %. 14 meses después del trasplante, el receptor no mostró EICH. Los resultados MLR para este sujeto mostraron tolerancia al donante y confirmaron la probabilidad de un injerto duradero a largo plazo. Previamente al trasplante, el nivel de la enzima Arilsulfatasa A del paciente fue de 3, en comparación con el nivel del donante de 50 después del trasplante. El nivel del sujeto fue aproximadamente 50 tres y seis meses después del trasplante, y fue de 88,6 un año después del trasplante. Éste representa el nivel enzimático de un paciente fenotípicamente normal.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una composición celular terapéutica que comprende:

5 células madre hematopoyéticas (HSC) humanas, en la que dichas HSC tienen un fenotipo de CD34+; células facilitadoras humanas (hFC), en la que dichas hFC comprenden células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} y células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright}; y linfocitos T TCR+ alfa beta humanos para su uso en un método para hacer el sistema inmune de un receptor quimérico con el sistema inmune de un donante, cuyo método comprende:

10 administrar la composición al receptor, en la que el receptor se ha condicionado, donde dicha condición es una irradiación corporal total, la administración de un agente tóxico terapéutico, la administración de un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal fijado a una toxina o un radioisótopo o combinación de cualquiera de estos, donde dichos linfocitos T TCR+ alfa beta están presentes en una cantidad que es superior a la que se considerará terapéutica, en la que el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre $2,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor.

20 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las hFC mejoran la capacidad de injerto de dichas HSC en comparación con las HSC injertadas en ausencia de dichas hFC.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el condicionamiento del receptor incluye una dosis de irradiación corporal total (ICT), en la que la irradiación corporal total no excede 300 cGy.

25 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición celular terapéutica se administra al receptor por vía intravenosa.

30 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sistema inmune del receptor se considera que es quimérico con el sistema inmune del donante cuando el sistema inmune del receptor es al menos un 1 % original del donante.

35 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el receptor tiene una enfermedad, particularmente en la que la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en:

una enfermedad autoinmune, particularmente diabetes, esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico, leucemia, una hemoglobinopatía, un trastorno metabólico hereditario, una enfermedad que necesita un trasplante de órgano, particularmente en la que el órgano es el corazón, la piel, el hígado, el pulmón, el corazón y el pulmón, el riñón, el páncreas, o un órgano endocrino, particularmente donde el órgano endocrino es una glándula tiroideas, una glándula paratiroides, un timo, una corteza suprarrenal o una médula suprarrenal, una infección por un virus de inmunodeficiencia o hepatitis, y una neoplasia hematopoyética, anemia, hemoglobinopatías y una deficiencia enzimática.

7. Una composición celular terapéutica para su administración a un receptor, que comprende:

50 células madre hematopoyéticas (HSC) humanas, en la que dichas HSC tienen un fenotipo de CD34+; células facilitadoras humanas (hFC), en la que dichas hFC comprenden células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{dim/neg} y células que tienen un fenotipo de CD8+/TCR- alfa beta/CD56^{bright}; y linfocitos T TCR+ alfa beta humanos, en la que dichos linfocitos T TCR+ alfa beta están presentes en una cantidad que es superior a la que se considerará terapéutica en la que el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre $2,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor.

60 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 7, en la que el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre $3,0 \times 10^6$ y $4,2 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor.

9. Un método para preparar una composición celular terapéutica para su administración a un receptor, que comprende las etapas de:

65 proporcionar una fuente donante de células madre hematopoyéticas (HSC) humanas; empobrecer los linfocitos T TCR+ alfa beta humanos de dicha fuente donante para producir una fuente

donante empobrecida;

ajustar el número de linfocitos T TCR+ alfa beta humanos en dicha fuente donante empobrecida entre $2,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta humanos por kg de peso corporal del receptor, producir de este modo una composición celular terapéutica para su administración a un receptor, en el que el método no usa un embrión humano.

- 5
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha fuente de HSC humanas es la médula ósea, el timo o sangre periférica.
- 10 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha fuente de HSC humanas es la médula ósea.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha fuente de HSC humanas es y/o en el que las células se empobrecen usando uno o más anticuerpos.
- 15 13. El método de la reivindicación 12, en el que el uno o más anticuerpos se conjugan con perlas magnéticas.
14. El método de la reivindicación 9, en el que el número de linfocitos T TCR+ alfa beta se ajusta entre $3,0 \times 10^6$ y $4,2 \times 10^6$ linfocitos T TCR+ alfa beta/kg de peso corporal del receptor.
- 20 15. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que puede producirse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

FC CD8+/TCR- total

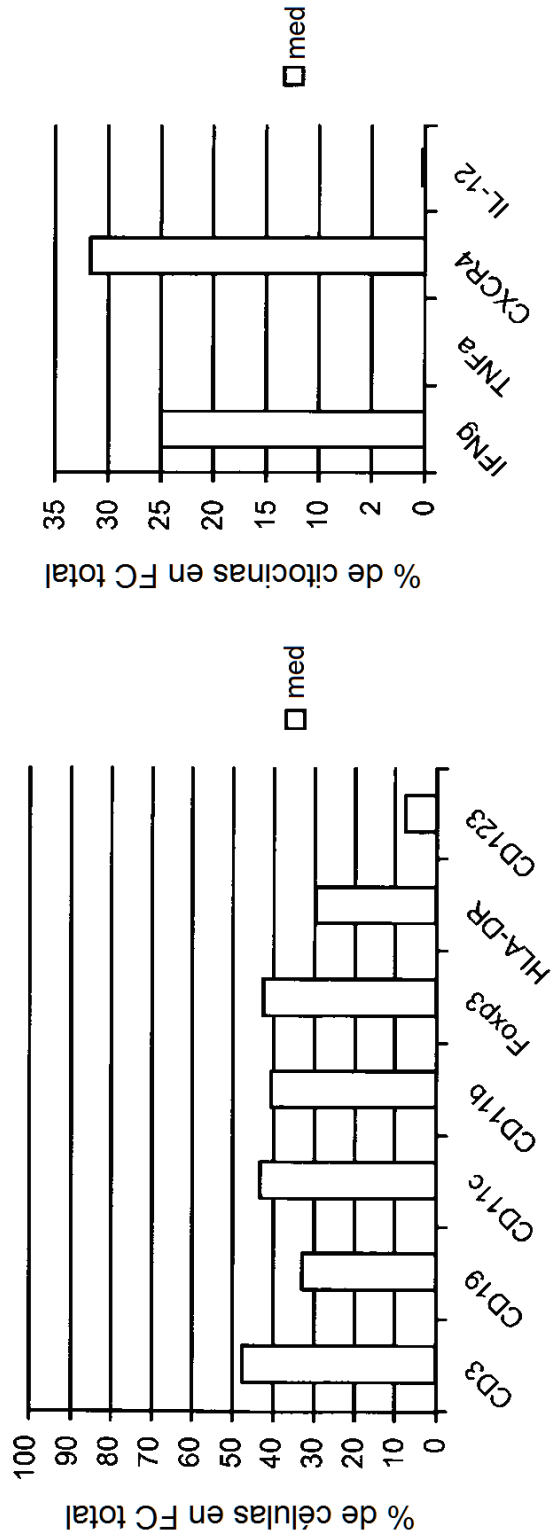


FIG. 1

FC CD8+/TCR-

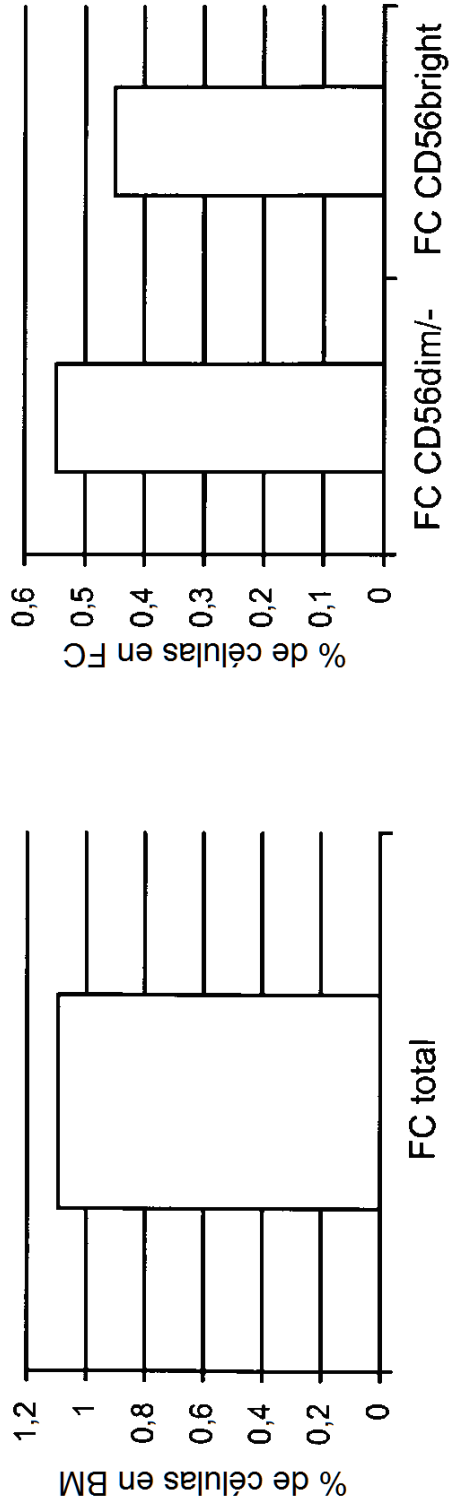


FIG. 2

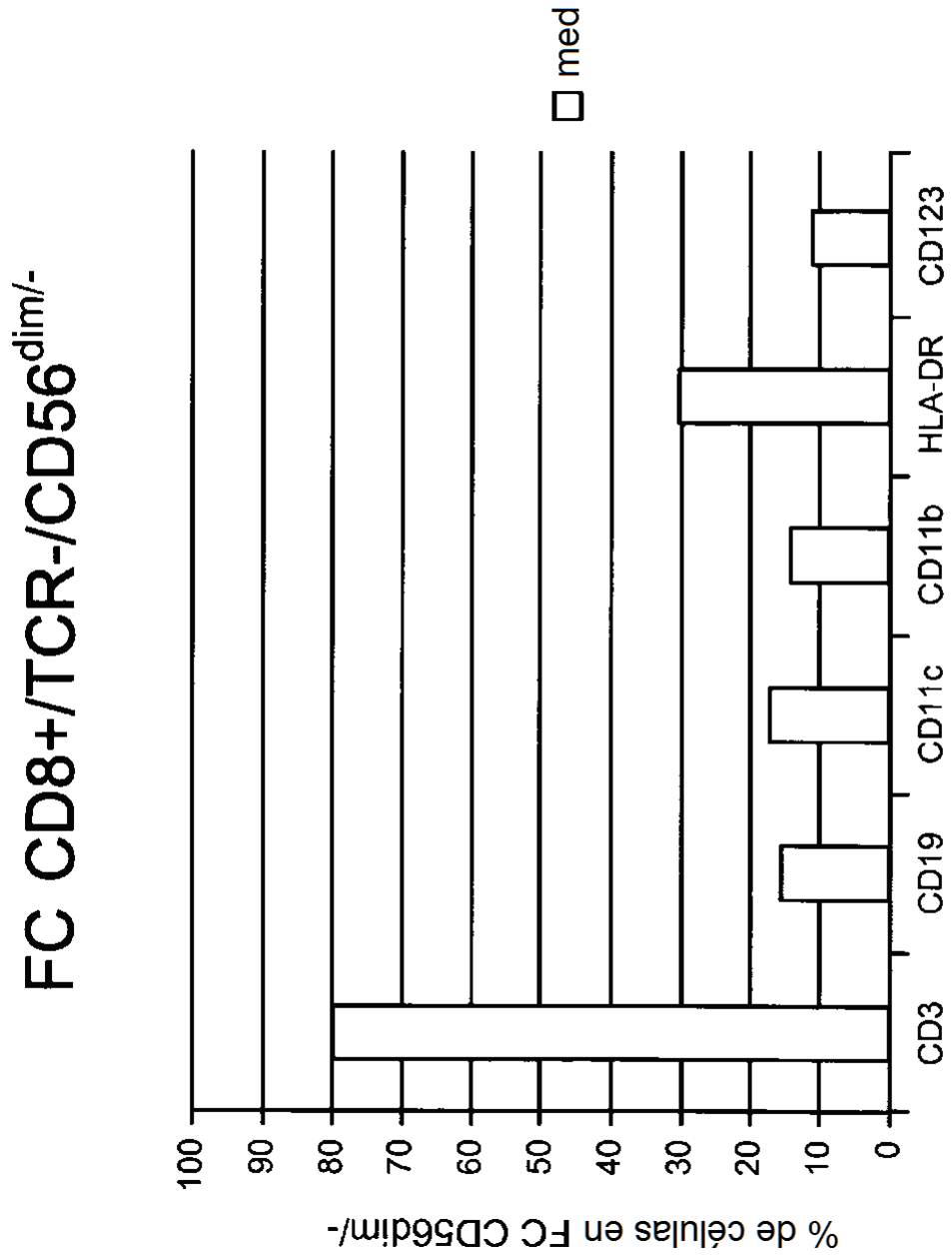


FIG. 3A

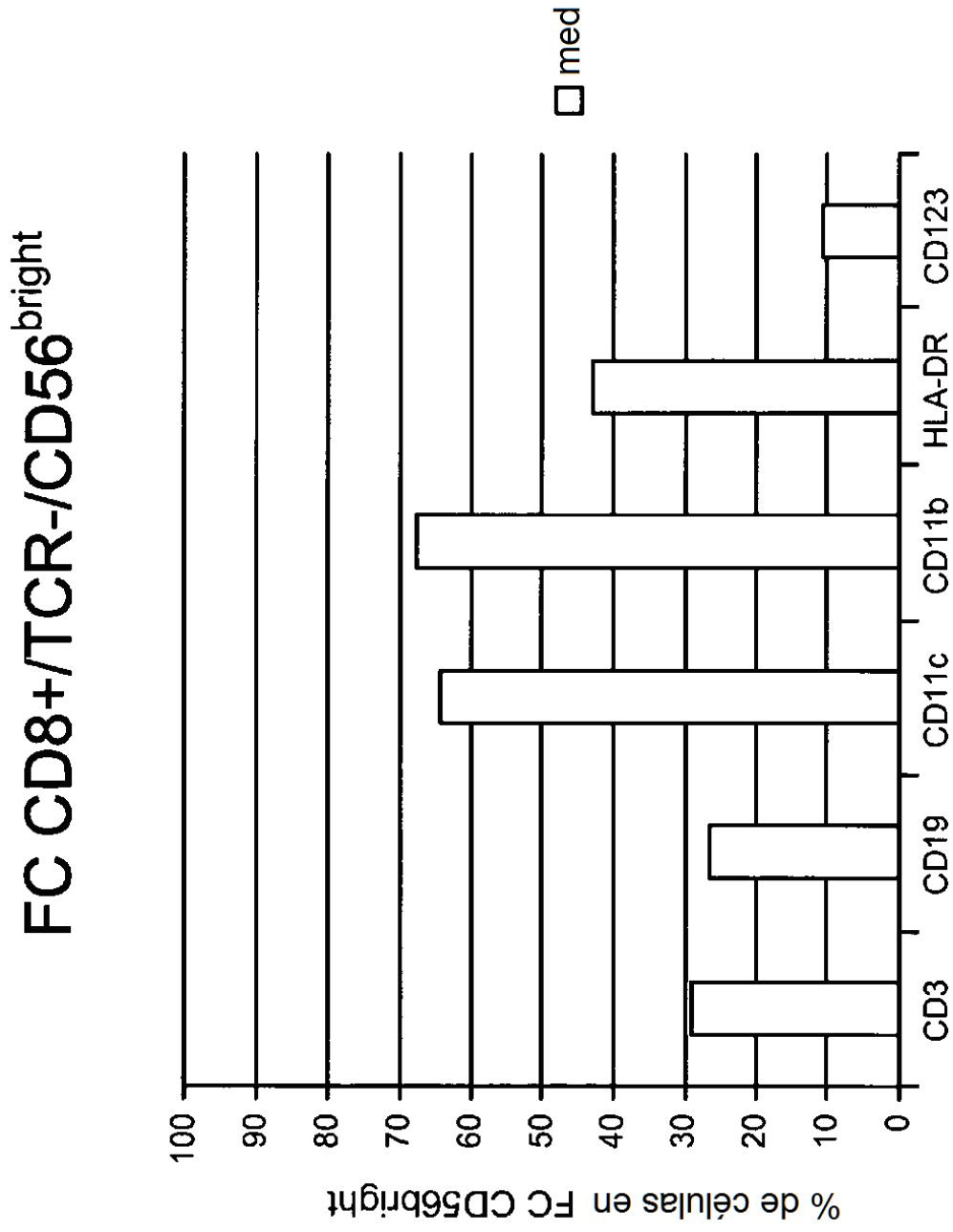


FIG. 3B

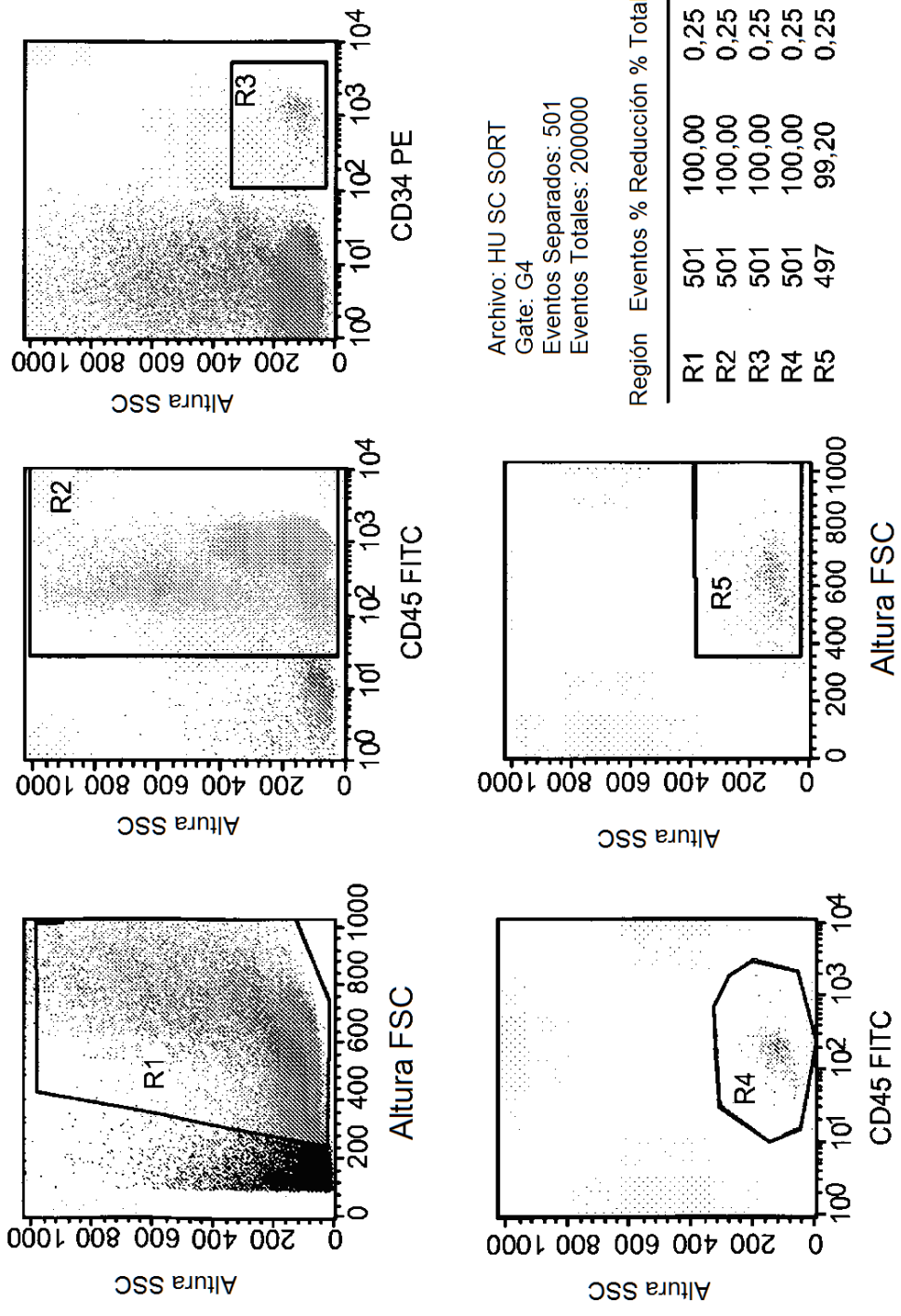


FIG. 4

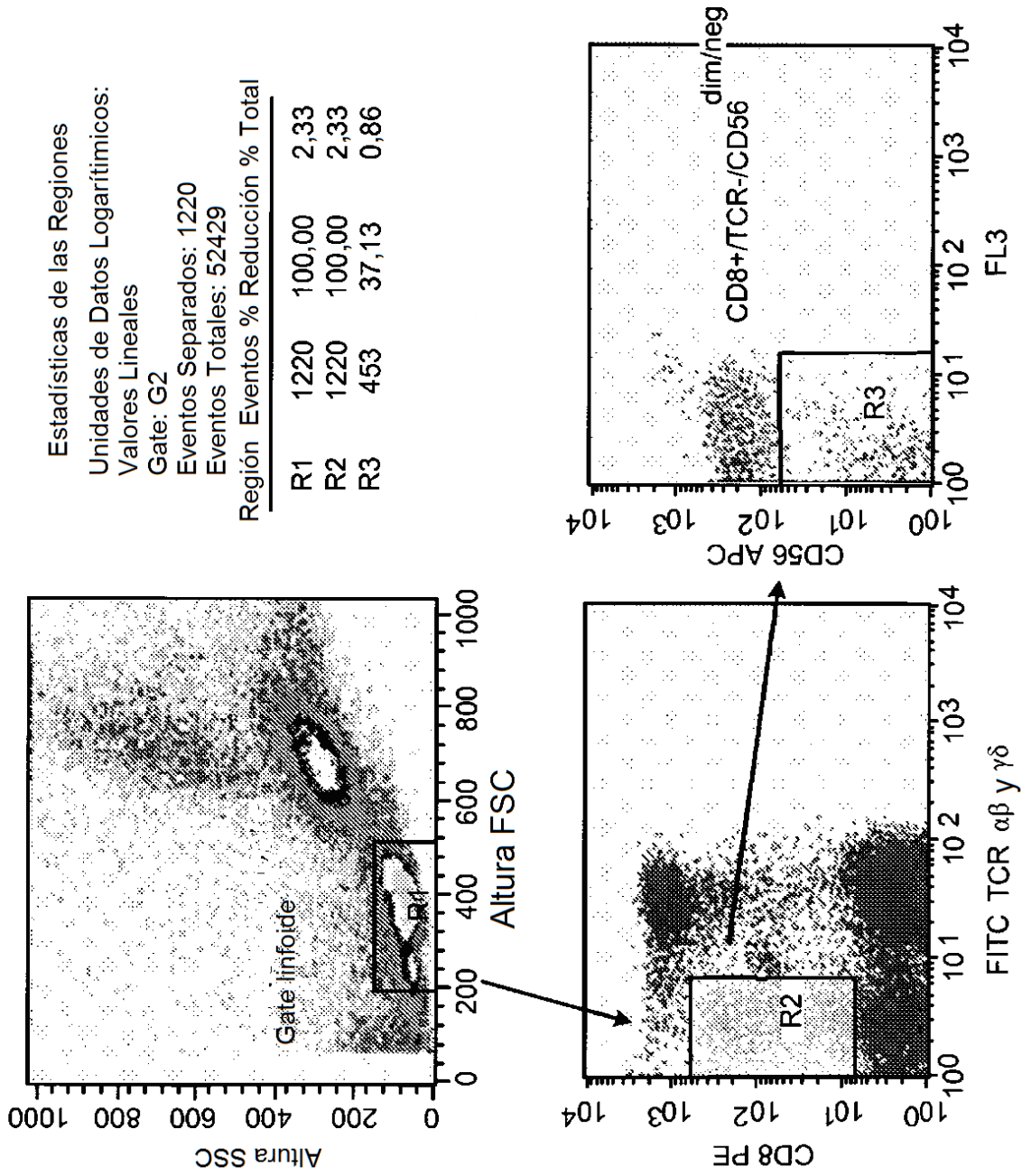


FIG. 5

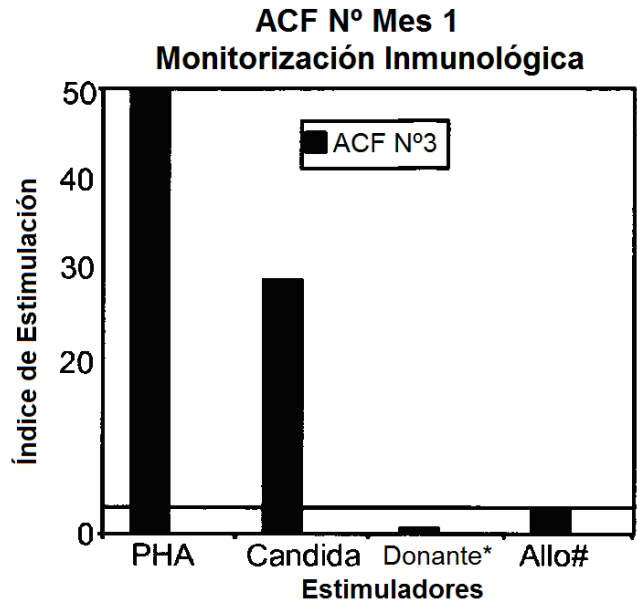


FIG. 6A

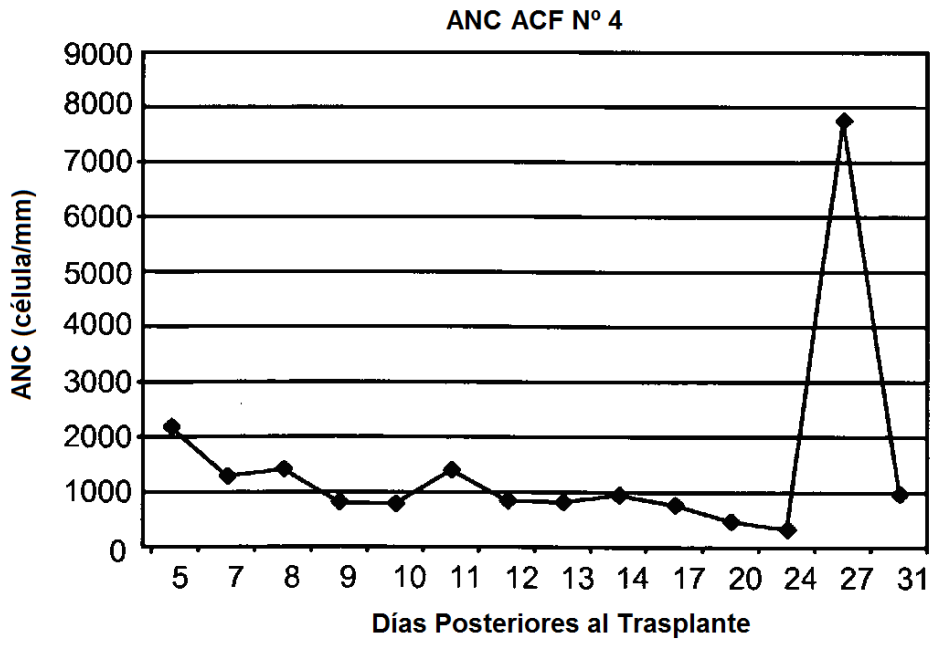


FIG. 6B

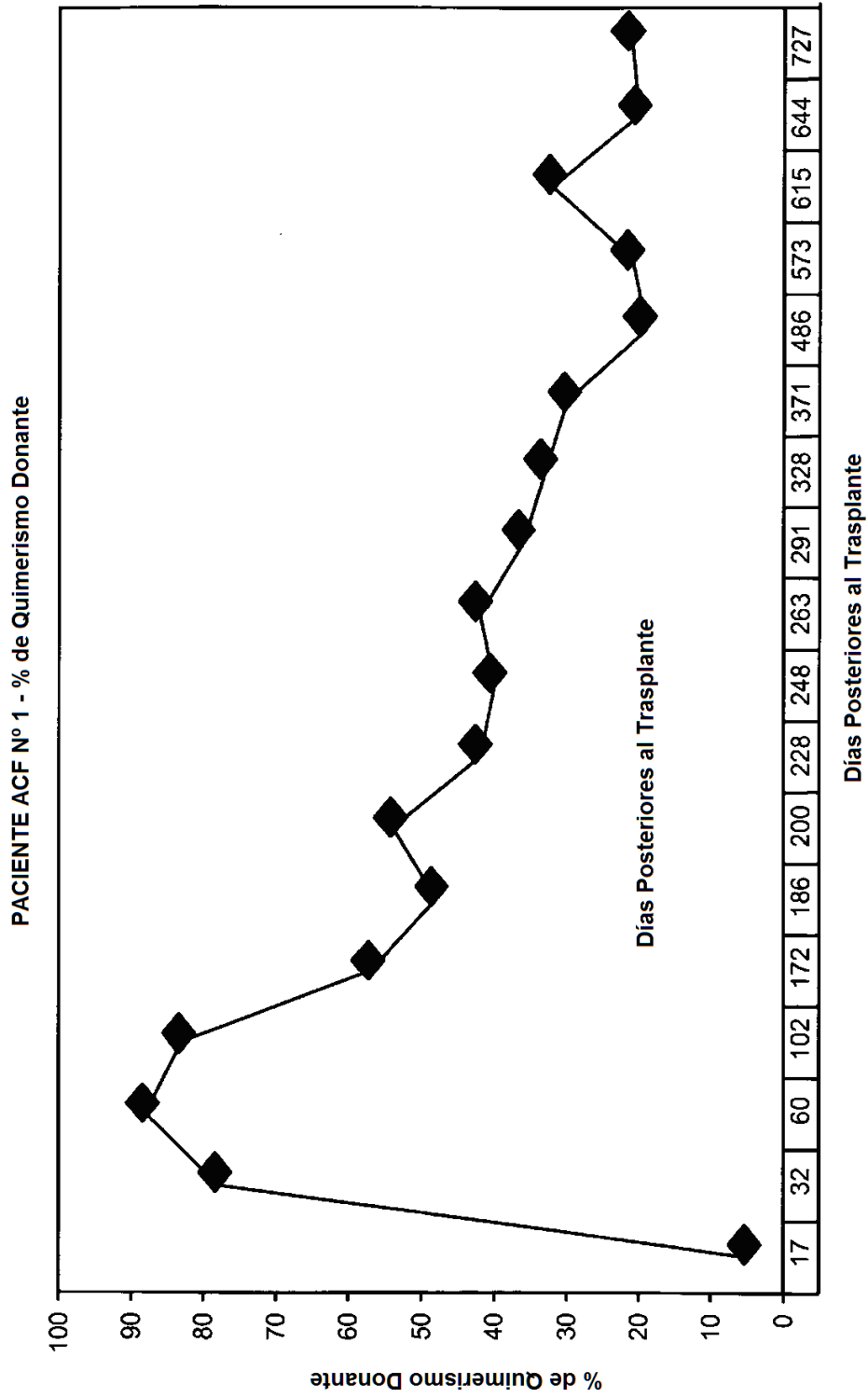
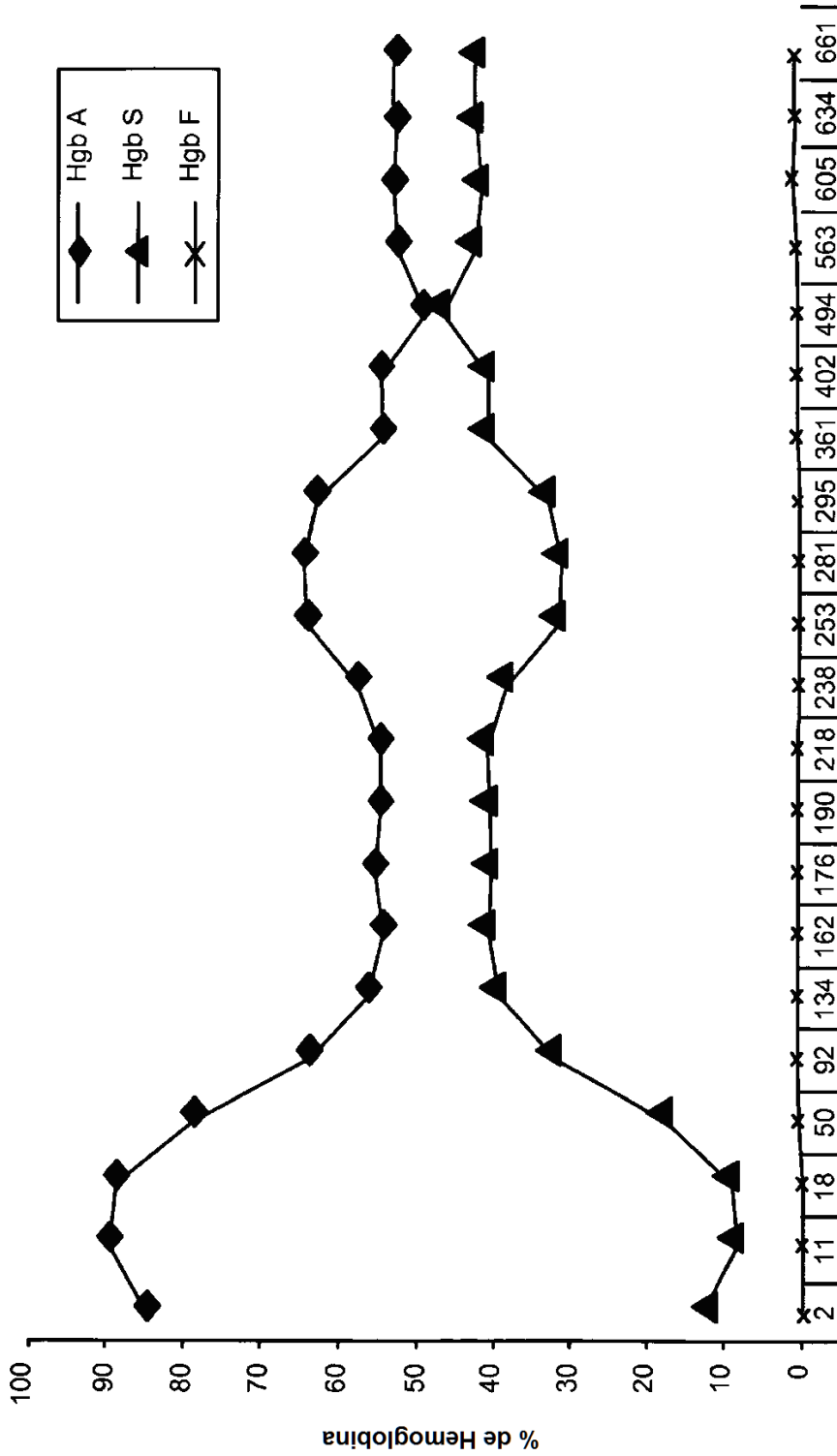


FIG. 7A

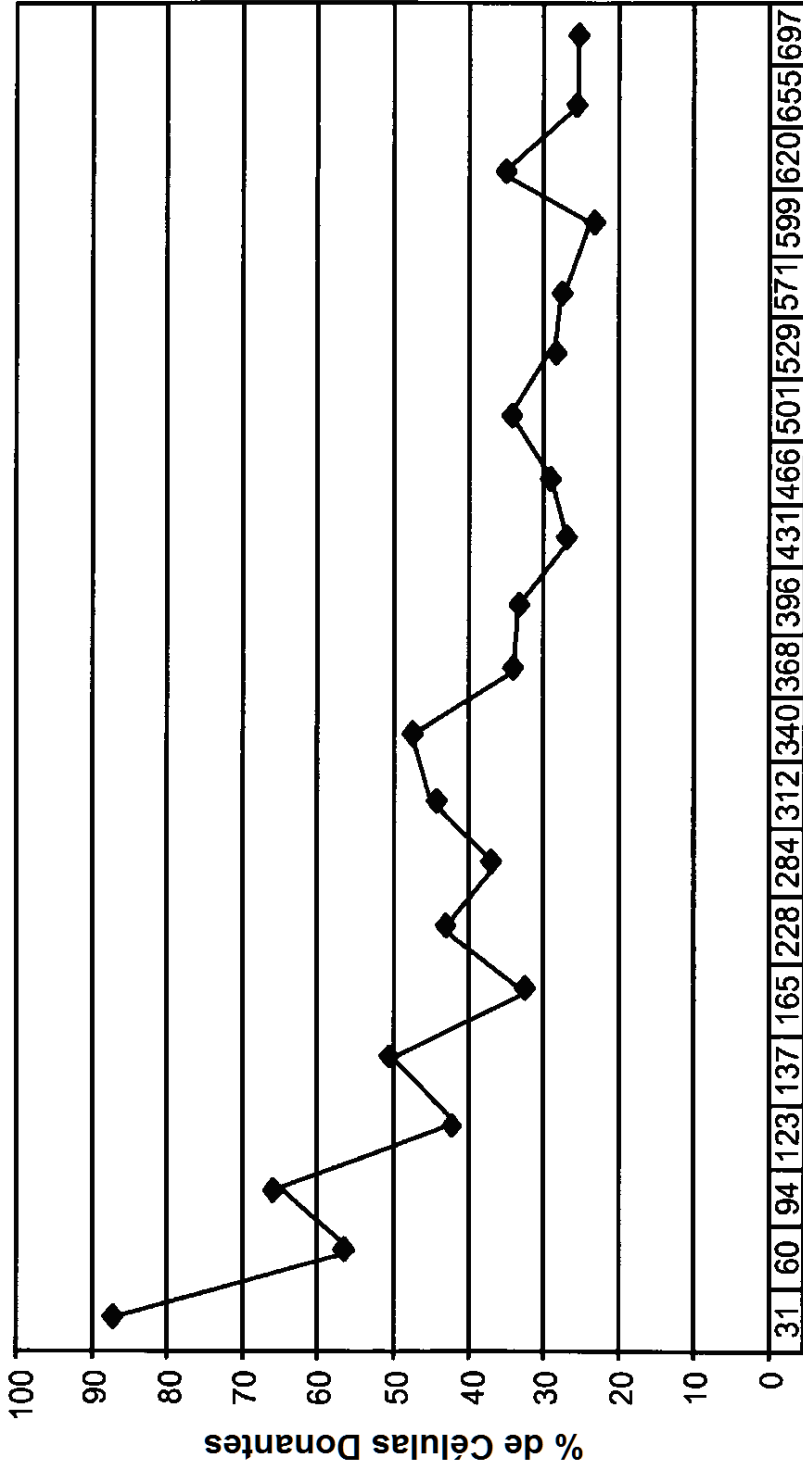
PACIENTE ACF N° 1 - Electroforesis de Hemoglobina



Dias Posteriores al Trasplante

FIG. 7B

PACIENTE N° 4
Quimerismo



Días Posteriores al Trasplante

FIG. 8A

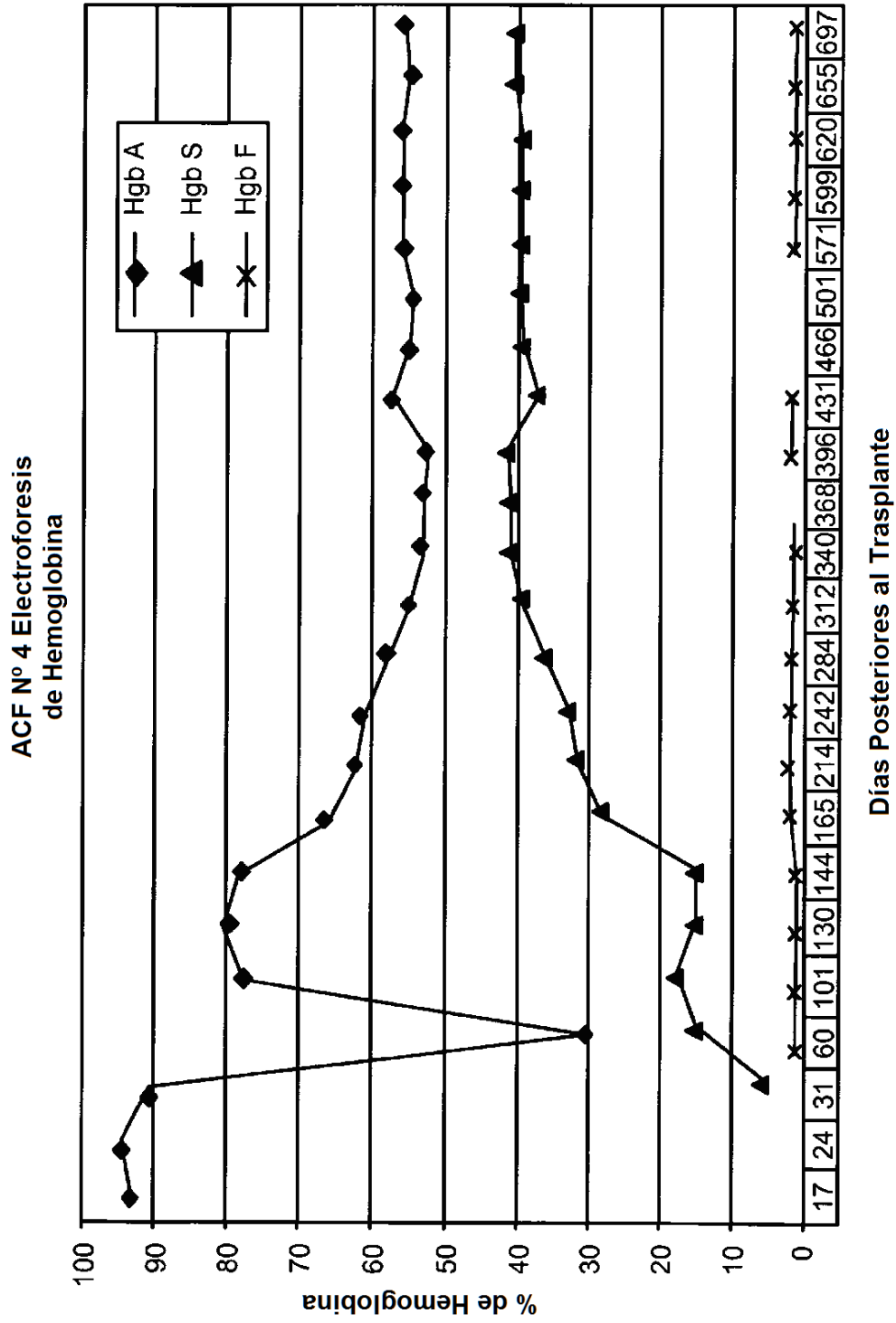
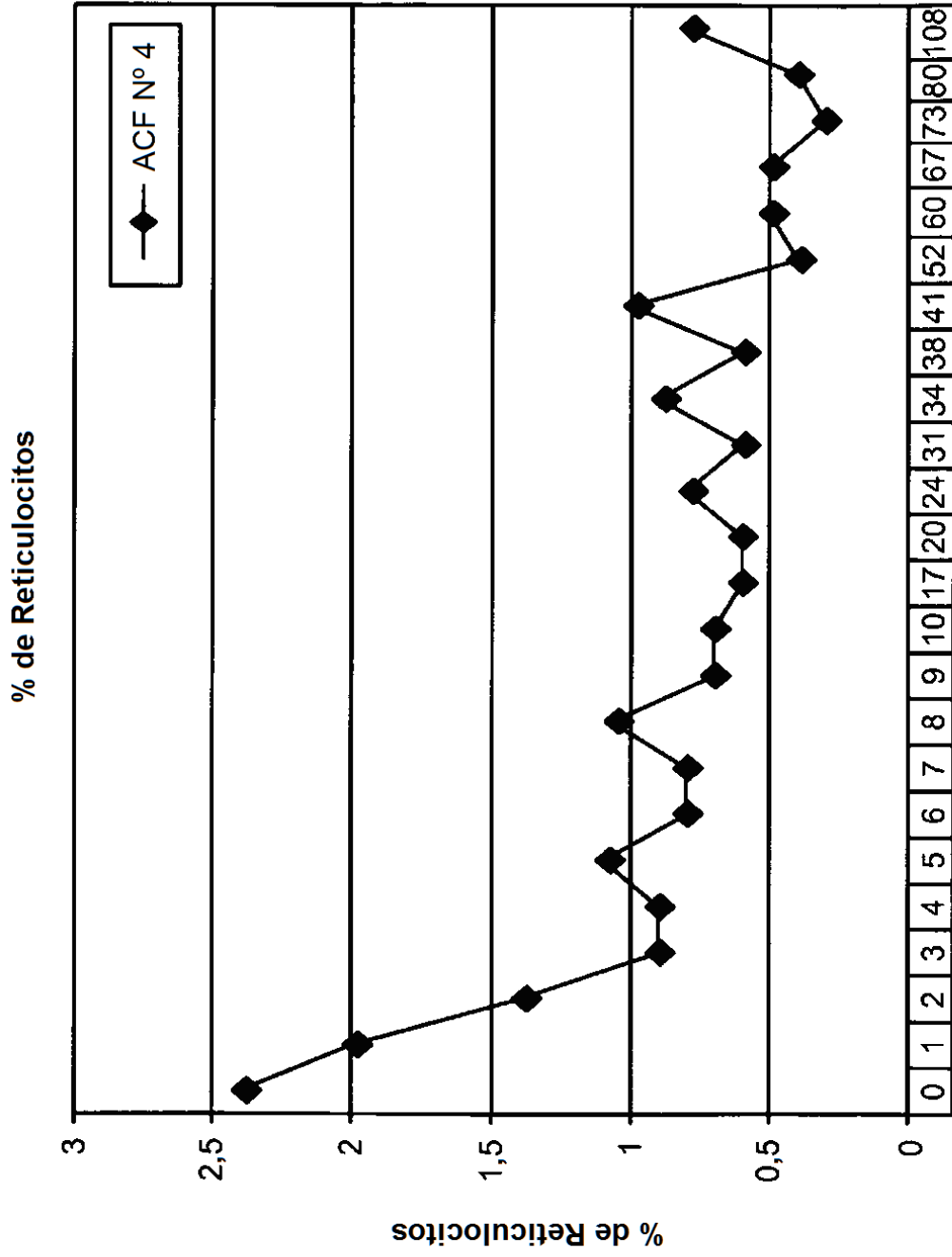


FIG. 8B



Días Posteriores al Trasplante

FIG. 8C

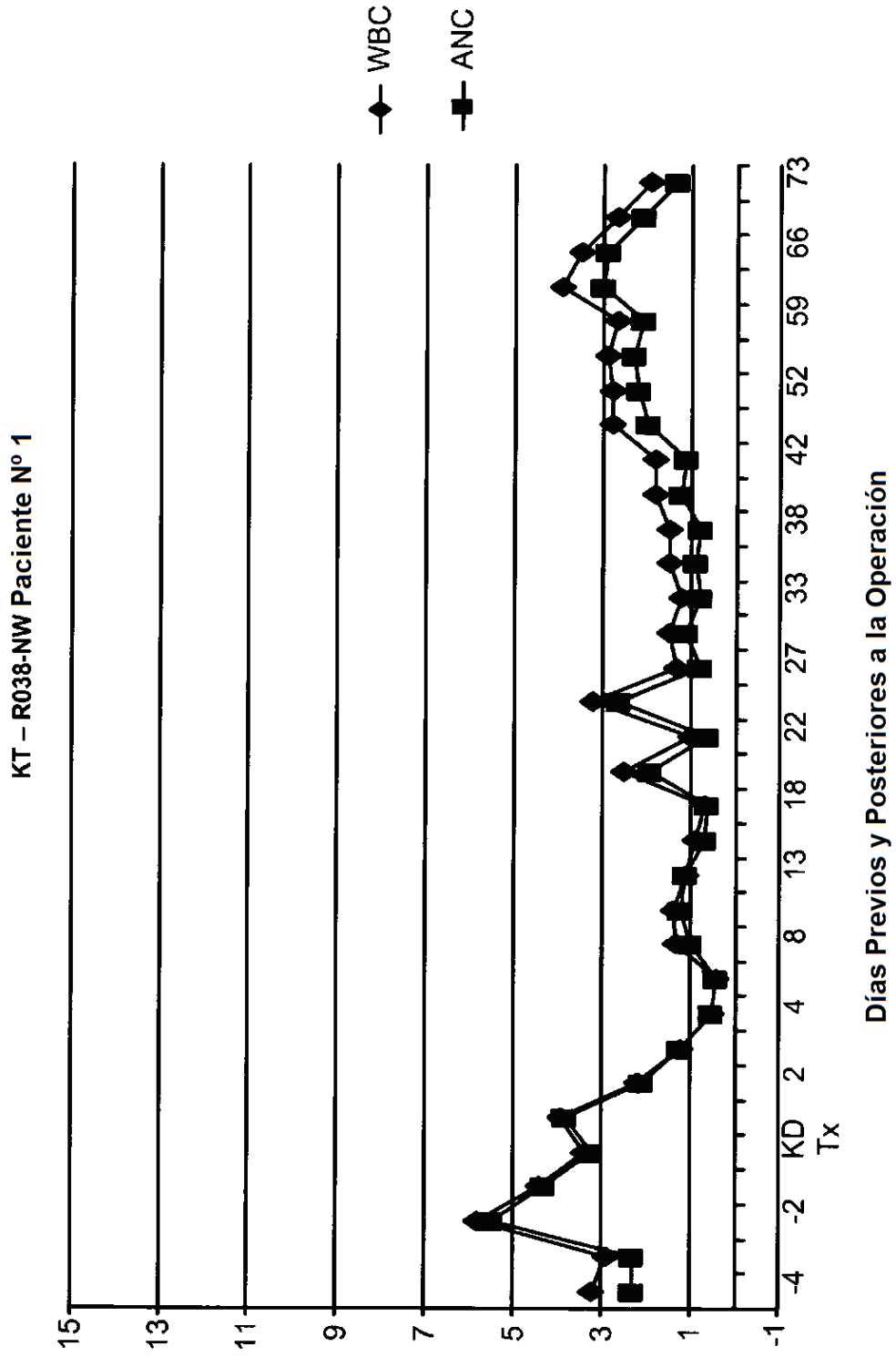


FIG. 9A

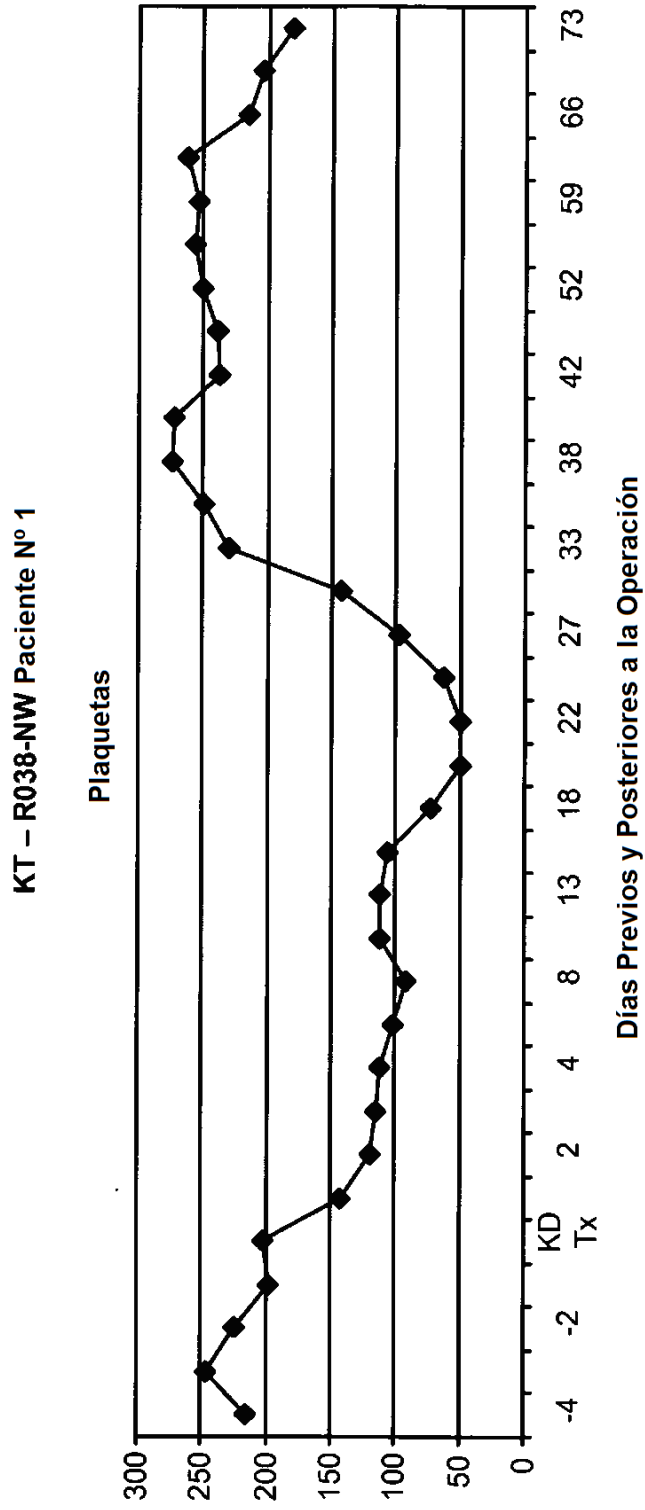


FIG. 9B

KT – R038-NW
Paciente Nº 1
Prueba de Quimerismo

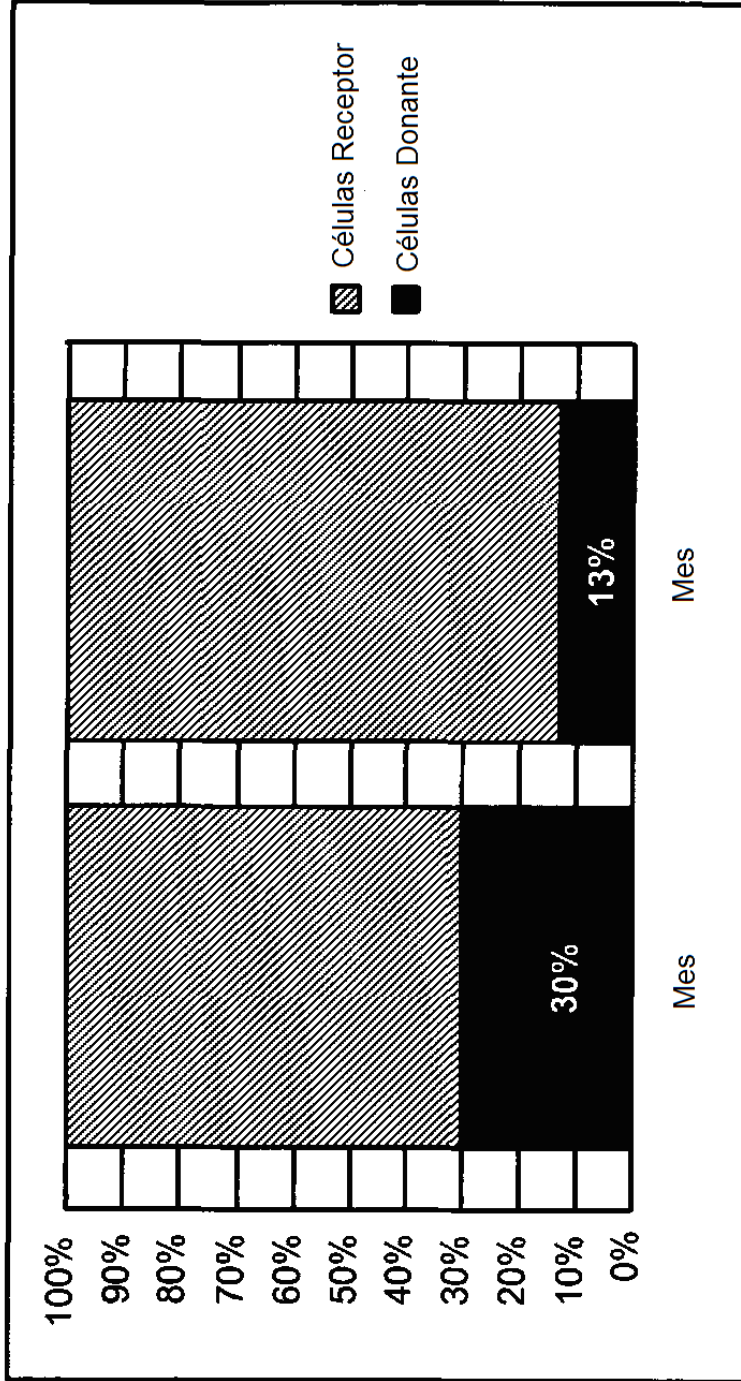


FIG. 9C

KT – R039-NW Paciente Nº 2

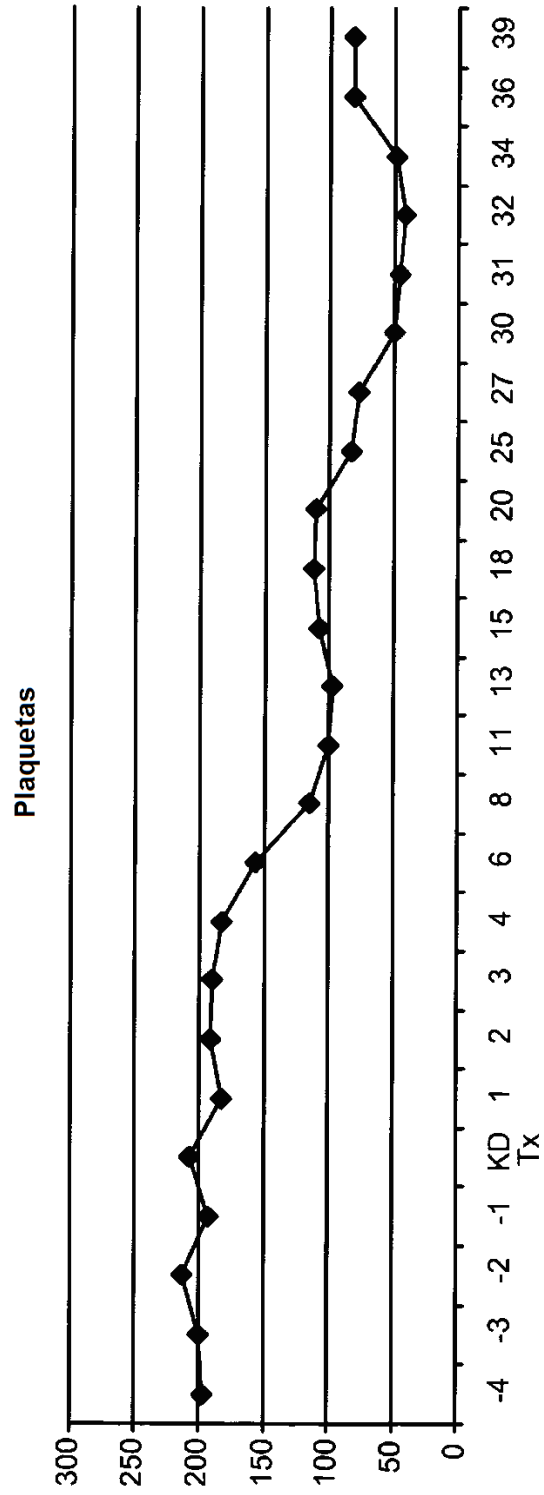


FIG. 10A

KT-R039 NW Paciente N° 2 - Prueba de Quimerismo

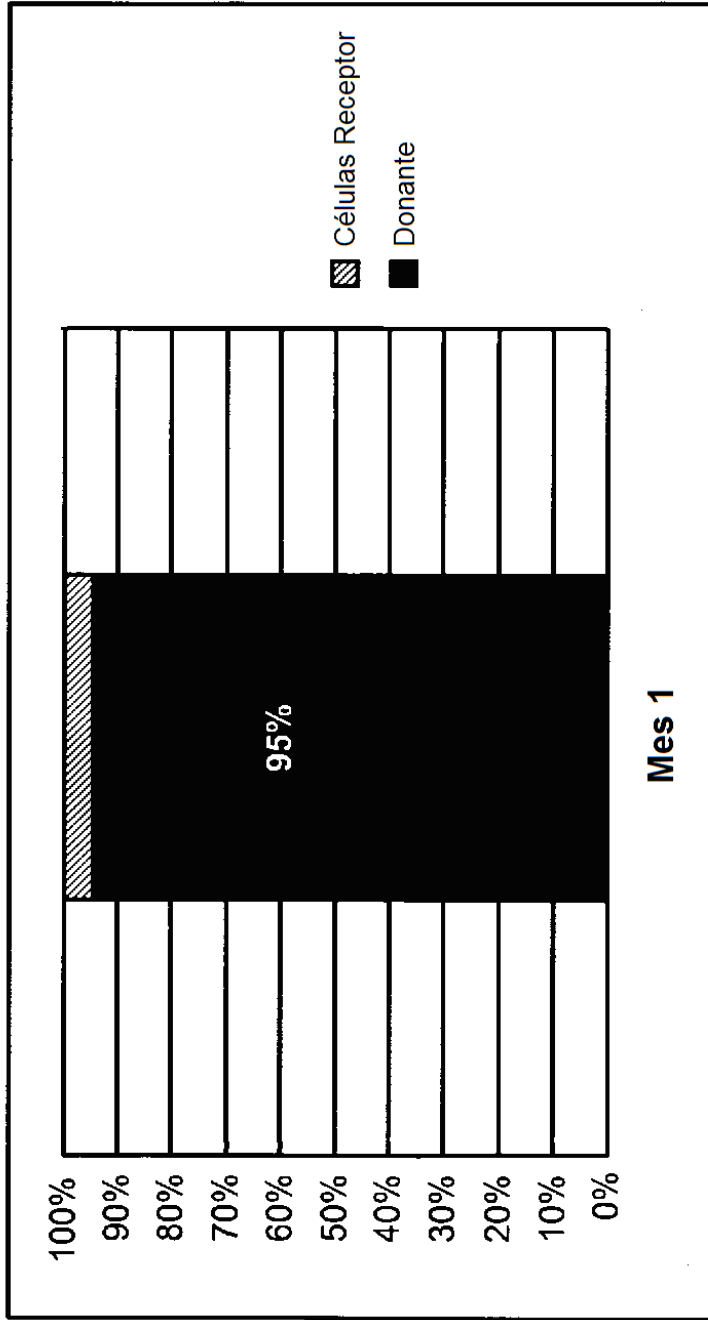


FIG. 10B

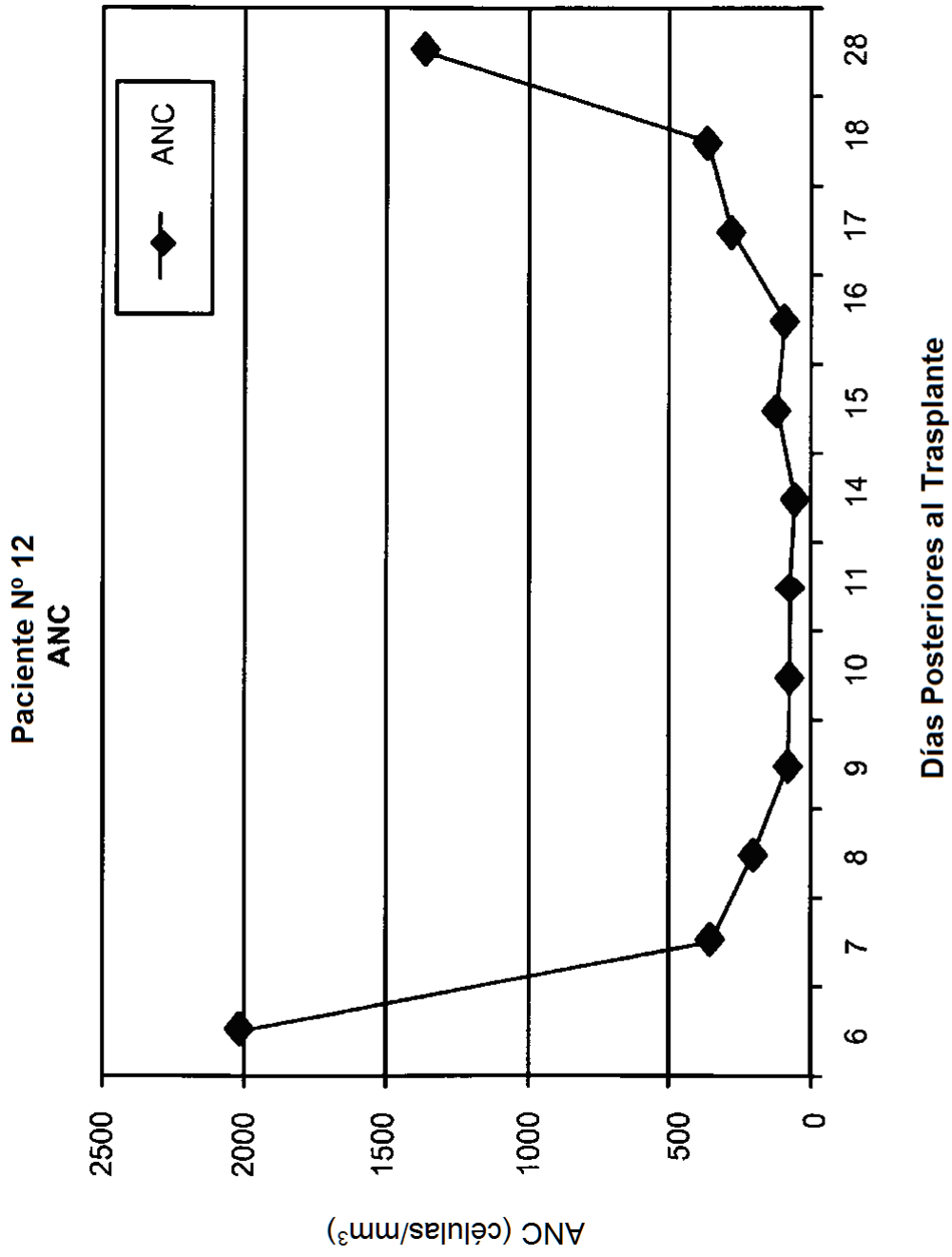


FIG. 11A

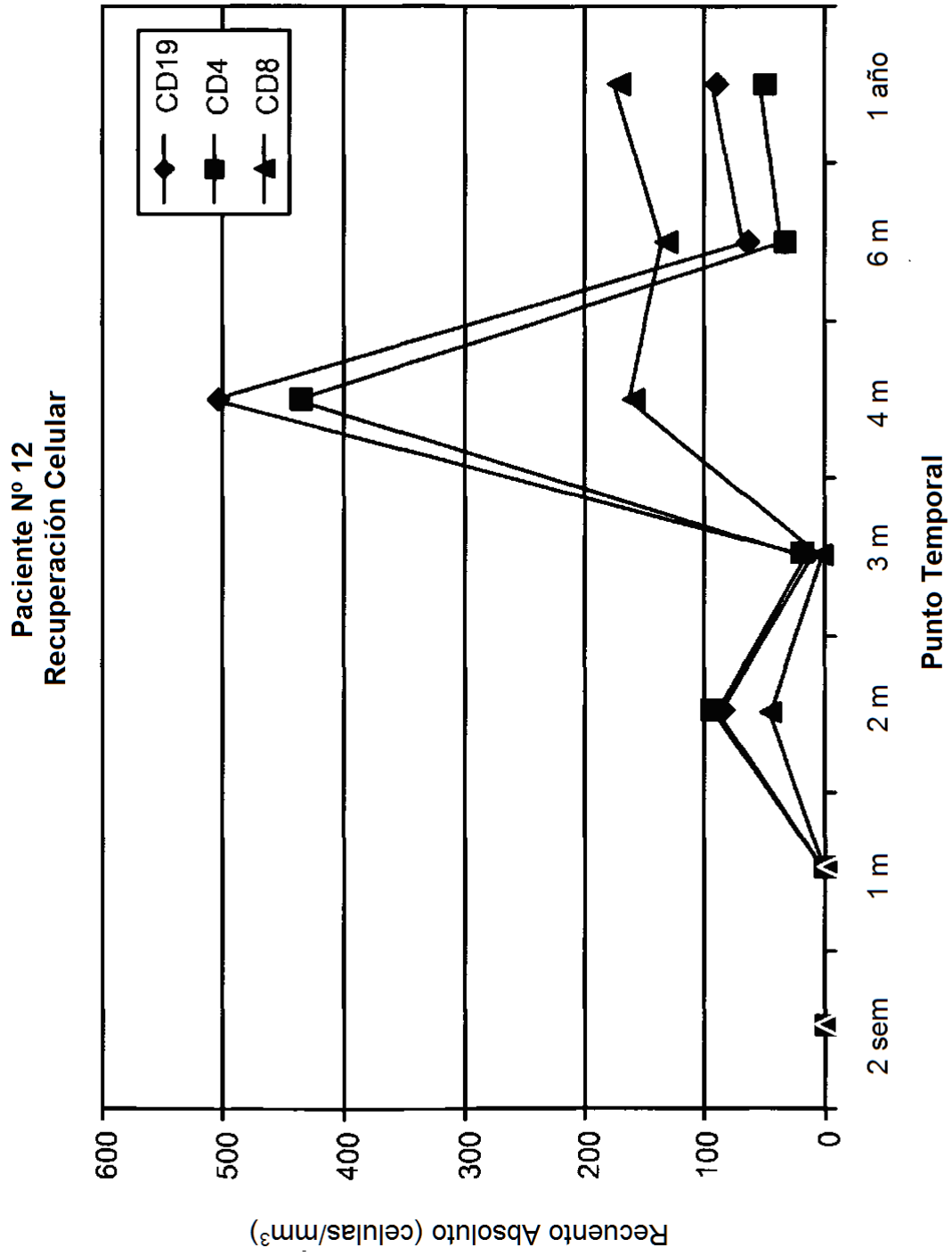


FIG. 11B

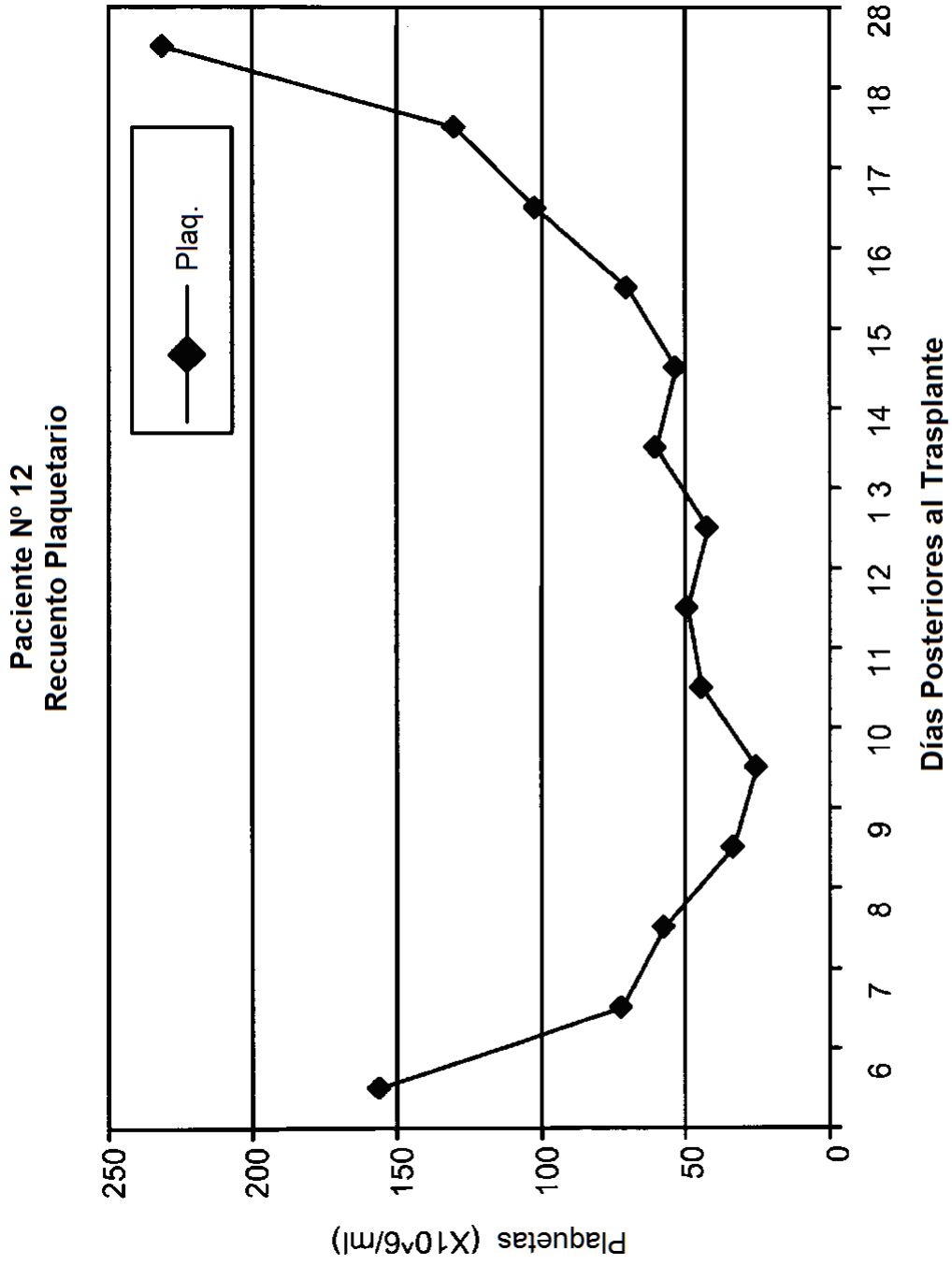


FIG. 11C

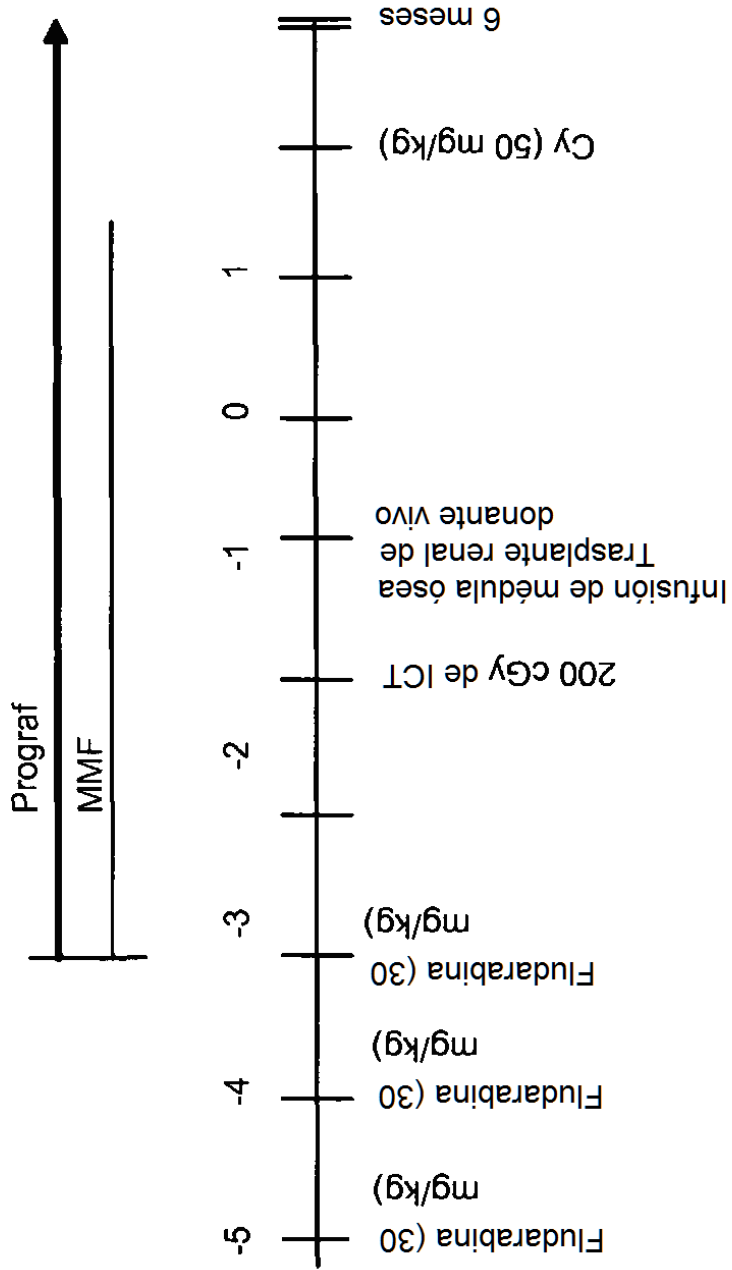


FIG. 12

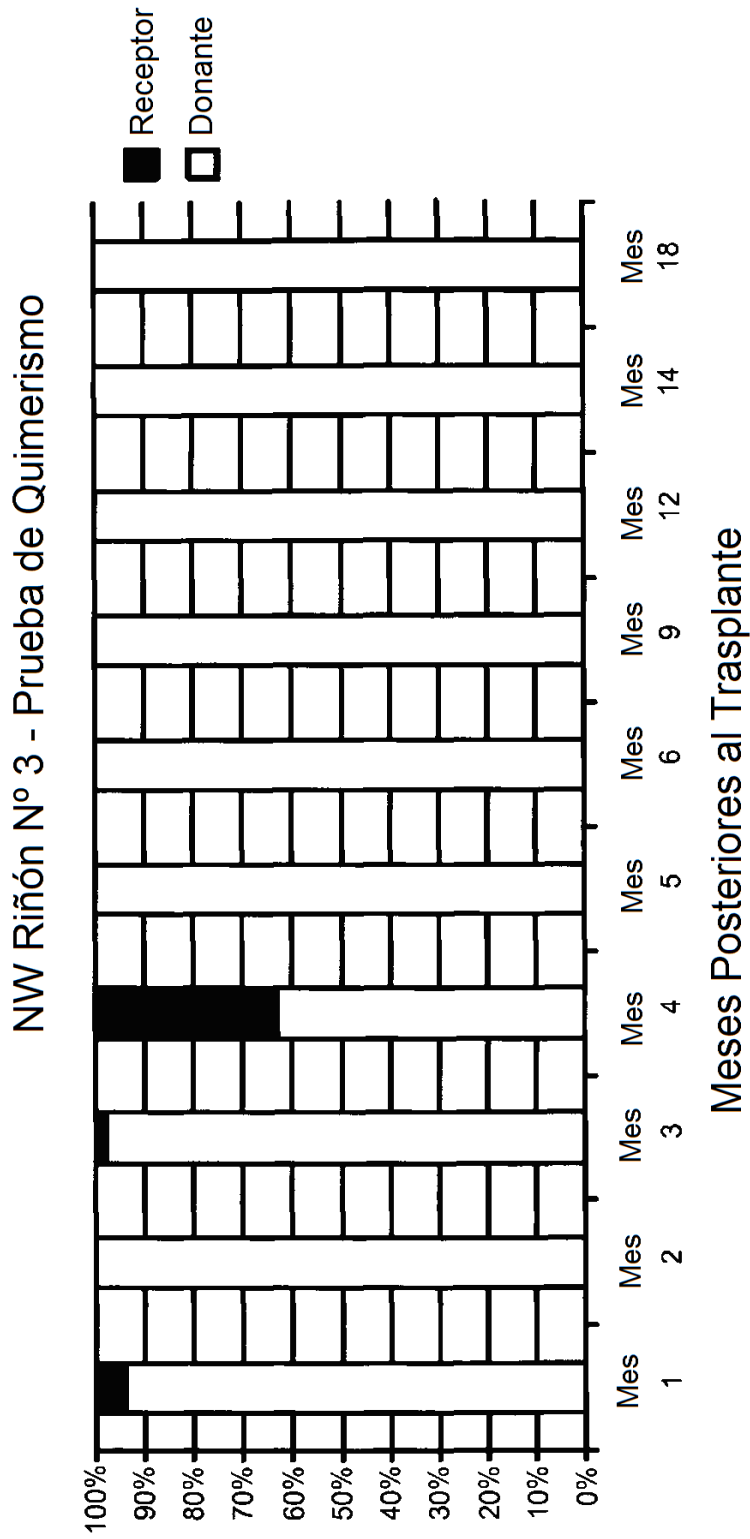


FIG. 13A

□ Donante
■ Receptor

NW Riñón N° 3 - Quimerismo Multilinjaje
Mes 12

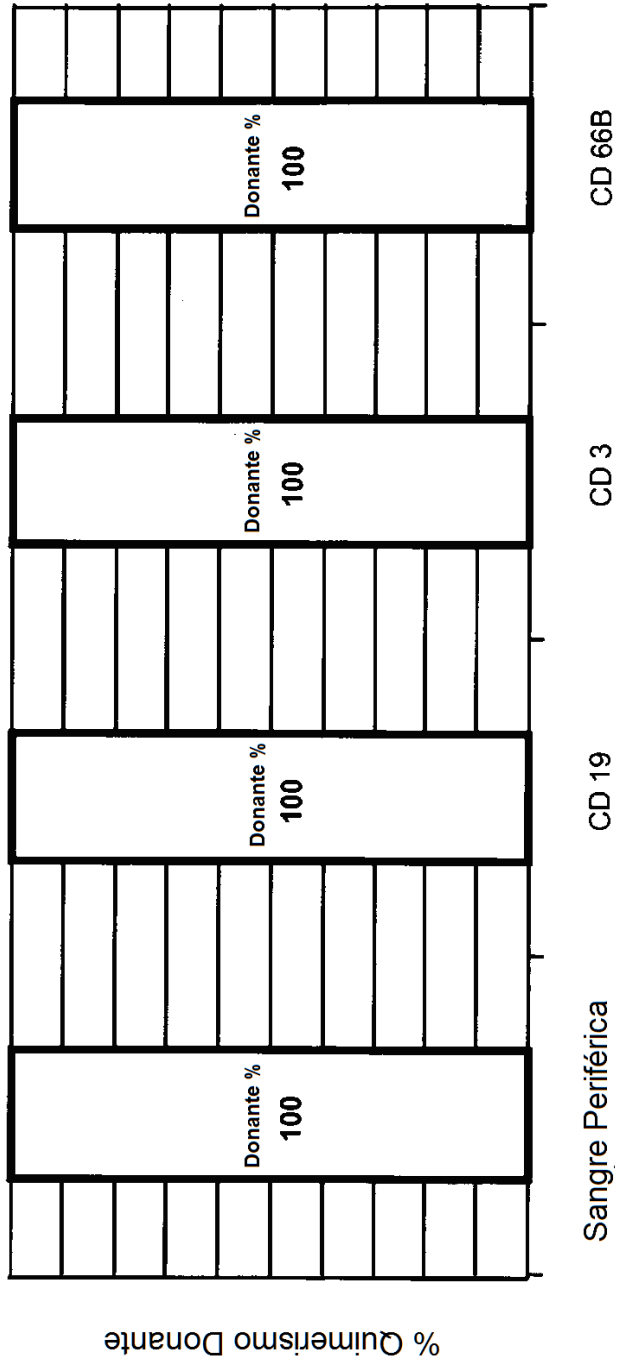


FIG. 13B

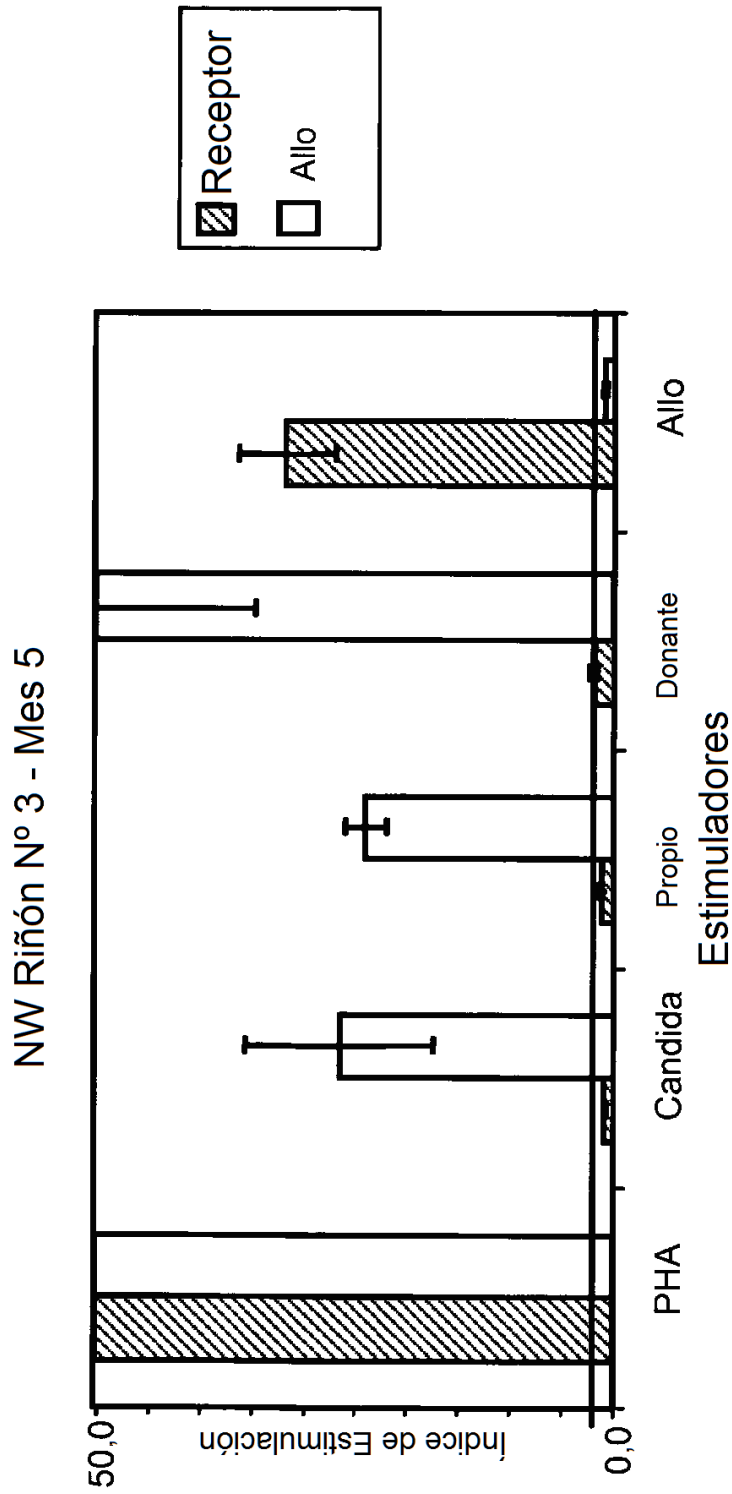
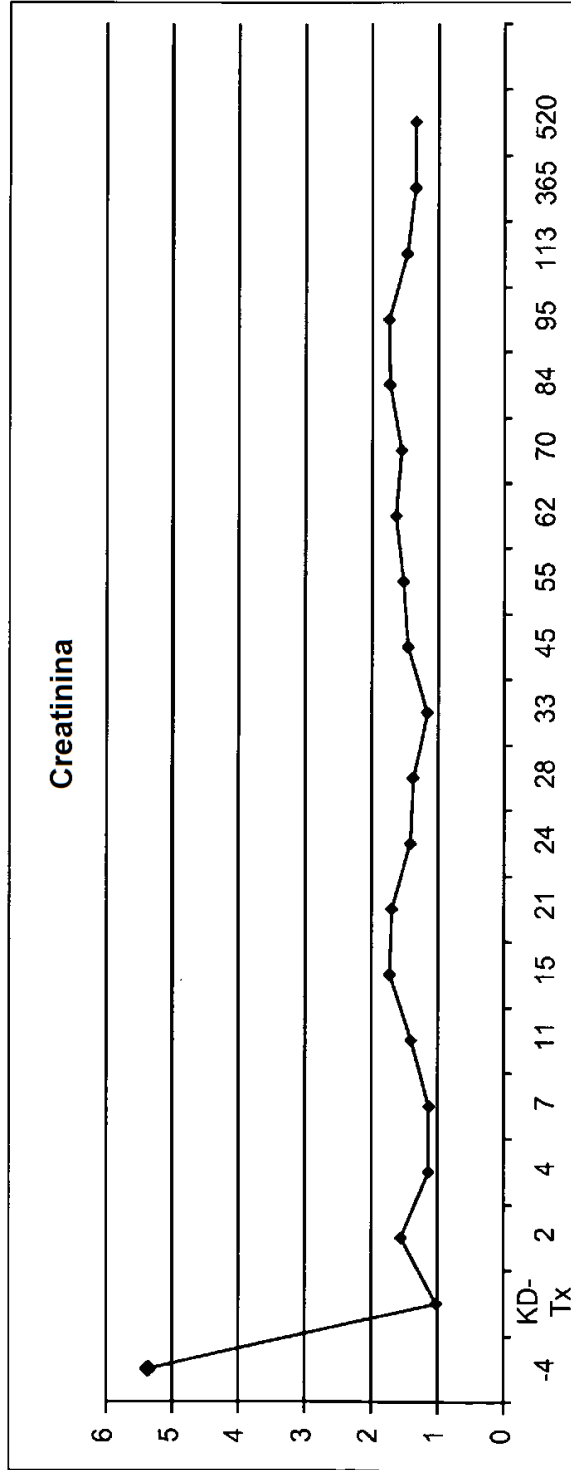


FIG. 13C

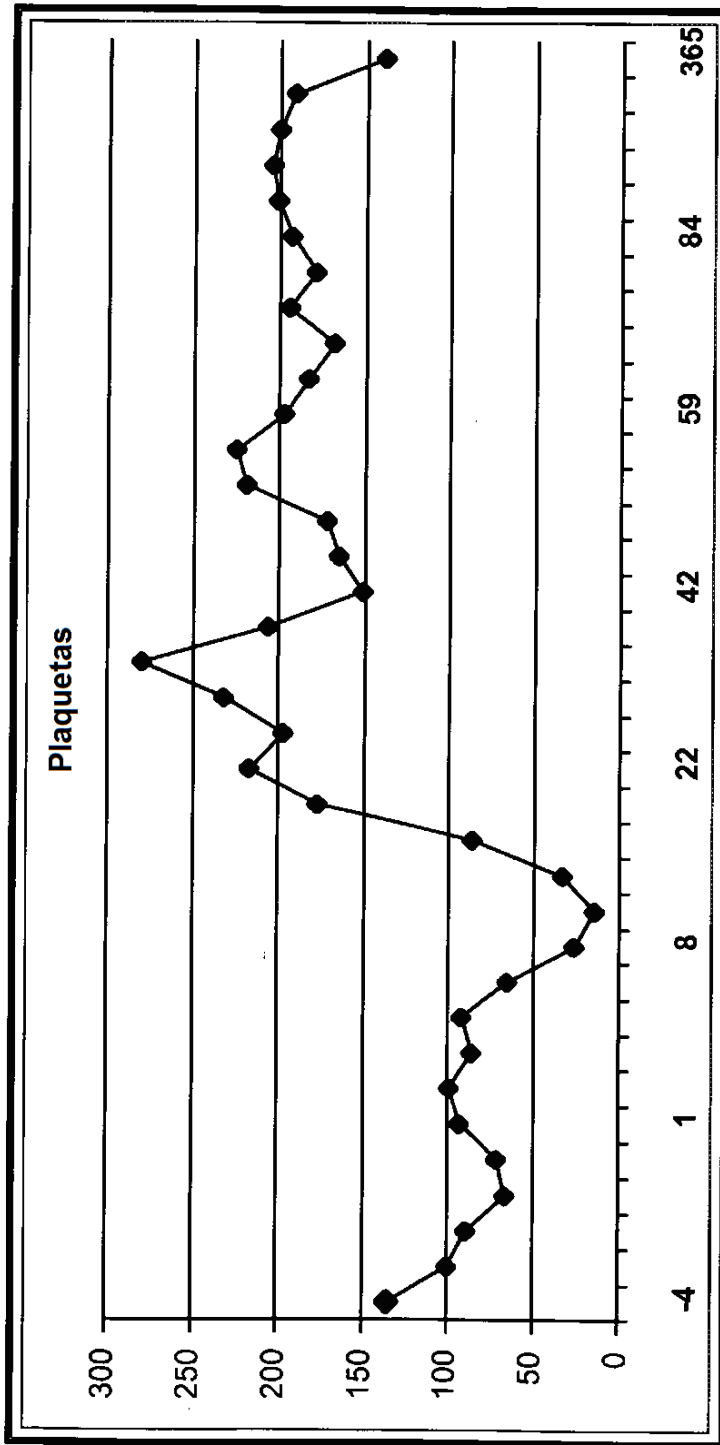
NW Riñón N° 3 - Creatinina



Días Previos y Posteriores a la Operación

FIG. 13D

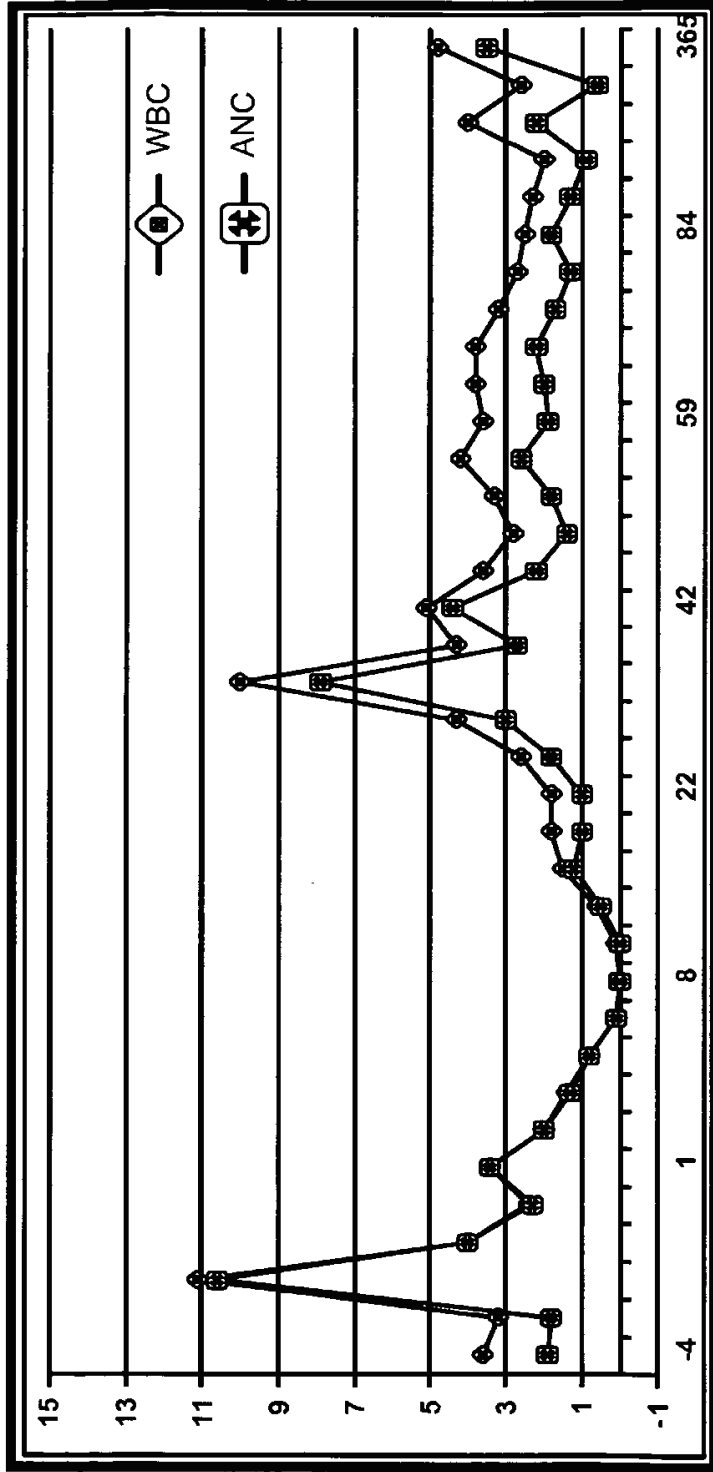
NW Riñón N° 3 - Plaquetas



Días Previos y Posteriores a la Operación

FIG. 13E

NW Riñón Nº 3 - WBC y ANC



Días Previos y Posteriores a la Operación

FIG. 13F