

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 148**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13169386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13788469 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2846816**

54 Título: **Métodos y composiciones para infusión de poblaciones seleccionadas de linfocitos alogénicos con prendimiento transitorio para tratar cáncer**

30 Prioridad:

08.05.2012 US 201261644126 P

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

29.03.2017

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**FUCHS, EPHRAIM, JOSEPH;
SYMONS, HEATHER, JILL y
SWINNEN, LODE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 607 148 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

Métodos y composiciones para infusión de poblaciones seleccionadas de linfocitos alogénicos con prendimiento transitorio para tratar cáncer

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a inmunología y, más específicamente, a composiciones que contienen linfocitos alogénicos, método para preparar la composición de linfocitos alogénicos y a su uso tratar cáncer.

Información antecedente

10 El sistema inmune de un huésped proporciona los medios para organizar rápidamente y específicamente una respuesta protectora frente a microorganismos patogénicos y también para contribuir al rechazo de tumores malignos. Las respuestas inmunes se han descrito generalmente como que incluyen respuestas humorales, en las que se producen anticuerpos específicos para antígenos por linfocitos B diferenciados, y respuestas mediadas por células, en las que varios tipos de linfocitos T eliminan antígenos por una variedad de mecanismos. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4 (también denominadas CD4+) que son capaces de reconocer antígenos específicos pueden responder liberando mediadores solubles tales como citoquinas para reclutar células adicionales del sistema inmune para participar en una respuesta inmune. Las células T citotóxicas CD8 (también denominadas CD8+) también son capaces de reconocer antígenos específicos y pueden unirse a y destruir o dañar una célula o partícula que porta un antígeno. En particular, las respuestas inmunes mediadas por células que incluyen una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) pueden ser importantes para la eliminación de células tumorales y células infectadas por un microorganismo, tal como virus, bacterias, o parásito.

20 El cáncer incluye un amplio rango de enfermedades y afecta aproximadamente a uno de cuatro individuos en todo el mundo. Una respuesta CTL es una característica clave de las vacunas efectivas contra el cáncer; la ayuda efectiva de las células T CD4 probablemente también juega un papel crítico en la activación productiva de células T CD8 y proporciona así un beneficio clínico.

25 Respecto a las infecciones microbianas, la malaria, tuberculosis, VIH-SIDA y otras infecciones virales tales como las infecciones por el virus del herpes simple (VHS) (la causa principal de úlceras genitales en todo el mundo) continúan contribuyendo a problemas sanitarios globales. La prevalencia de VHS-2 se está incrementando a una proporción alarmante en todo el globo. En los Estados Unidos, la proporción de prevalencia sero VHS-2 global supera el 20%, y en las naciones en desarrollo la prevalencia de VHS-2 se estima entre el 30% y el 50%. Además de la carga profunda de infección por VHS-2 en adultos, se está incrementando la incidencia de infección por VHS-2 neonatal. Incluso cuando se trata, la encefalitis neonatal resultante de infección por VHS-2 tiene una mortalidad >15%, y la morbilidad neurológica entre niños infectados por VHS-2 es un 30 a 50% adicional de los casos supervivientes. Concomitantemente a la epidemia de VHS-2 se encuentra una cruda realidad de que la infección por VHS-2 incrementa sustancialmente el riesgo de adquisición y transmisión de VIH-1. Los datos de África muestran que la infección por VHS-2 puede incrementar el riesgo de transmisión de VIH tanto como 7 veces y que tantos como la mitad de los casos de nueva adquisición de VIH se atribuyen directamente a infección por VHS-2. Globalmente, el riesgo relativo de adquisición de VIH se incrementa más de 2 veces en los individuos infectados por VHS-2.

30 La evidencia emergente sugiere que los cánceres inducen un estado de falta de capacidad de respuesta en los linfocitos que son específicos para antígenos expresados únicamente por el cáncer. Sin embargo, esta falta de capacidad de respuesta debe poder revertirse. Varios tumores humanos están infiltrados por células T CD8+, y el grado de infiltración de células T CD8+ se correlaciona frecuentemente con la ausencia de metástasis y supervivencia mejorada. Sin embargo, estas células T CD8+ pueden no eliminar el cáncer debido a la parálisis funcional de células T CD4+ específicas de tumor.

Resumen de la invención

45 La presente invención se basa en el descubrimiento trascendental de que la infusión de linfocitos alogénicos que contienen células T CD4+ puede romper la tolerancia en células T CD8+ anti-tumor del huésped, incluso si las células del donante no se injertan a largo plazo en el receptor. La administración de quimioterapia antes de la infusión de células alogénicas puede aumentar el efecto anti-tumor de los linfocitos con prendimiento transitorio, estimulando la expansión homeostática de los linfocitos transferidos, y/o deplecionando las células T reguladoras del huésped y las células supresoras derivadas de mieloides. La respuesta inmune frente al cáncer está dificultada por defectos funcionales de las células T CD4+ del paciente. Las infusiones de linfocitos alogénicos pueden proporcionar una fuente exógena de ayuda de células T CD4+ para las células T CD8+ endógenas, reactivas frente al tumor. La depleción de células T CD8+ de la infusión de linfocitos del donante reduce el riesgo de prendimiento sostenido y de enfermedad de injerto frente a huésped. La eliminación de células T reguladoras de la población infundida puede aumentar la capacidad de las células T no reguladoras para proporcionar ayuda para los efectos endógenos de la inmunidad anti-tumor.

La terapia con células T alogénicas se proporciona típicamente en el contexto de trasplante de células madre alogénicas, en la que el paciente recibe un acondicionamiento altamente inmunosupresor seguido por una infusión de un injerto de células madre que contiene poblaciones no seleccionadas de células T maduras. El objetivo de aloSCT es obtener el prendimiento sostenido de las células del donante y conlleva el riesgo de mortalidad por enfermedad de injerto frente a huésped. En el tratamiento descrito aquí, el injerto se modifica por ingeniería para minimizar la posibilidad de prendimiento sostenido de las células del donante, y las células T efectoras anti-tumor derivan del huésped. Así, la terapia conlleva una cooperación única de linfocitos del huésped y del donante durante el periodo del prendimiento transitorio de las células del donante.

Este es un tratamiento que puede aplicarse a cualquier cáncer humano o animal. Las variaciones de la presente invención incluyen: 1) variaciones del régimen de quimioterapia que se proporciona antes de la infusión de los linfocitos alogénicos (puede incluir ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, gemcitabina, dasatinib, combinaciones de éstos; 2) variaciones en la fuente de linfocitos del donante (pueden ser de donantes relacionados o no relacionados, pueden incluir disparidades definidas en los loci genéticos de HLA Clase I o Clase II; 3) variaciones en los tipos de células seleccionados para la infusión, tal como depleción de células T reguladoras CD4+CD25+, depleción de células T CD8+. Los donantes pueden inmunizarse para antígenos definidos antes de las infusiones de linfocitos o pueden polarizarse con citoquinas *ex vivo* para enriquecer para células T Tipo 1 (que producen IFN-gamma) o Tipo 17 (que producen IL-17).

En una primera realización, la invención proporciona un método para preparar una composición de linfocitos alogénicos que comprende: proporcionar una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico al receptor, comprendiendo la composición de células de sangre periférica células T CD4+, células T CD8+, y células asesinas naturales, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, y (ii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante; y preparar la composición de linfocitos alogénicos a partir de la composición de células de sangre periférica reduciendo el número de células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica al menos un orden de magnitud, en la que (a) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, y (b) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

En otra realización, la invención proporciona una composición preparada por el método de la invención. En otra realización más, la invención proporciona una composición de linfocitos alogénicos humanos que comprende: células T CD4+ y células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica de un donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iii) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

La invención también proporciona una primera composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en la que la primera composición de linfocitos alogénicos comprende un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iii) el número de células T CD4+ en la primera composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la primera composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la primera composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la primera composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

En un aspecto, posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto, el uso comprende además administrar un tratamiento sucesivo linforreductor no linfoablativo al sujeto para inducir una linfopenia transitoria en el sujeto; y posteriormente administrar al sujeto una composición sucesiva de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica adicional de un donante humano alogénico adicional, comprendiendo la composición sucesiva de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica adicional del donante adicional, en la que (i) el donante adicional comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante adicional frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante adicional, (iii) el número de células T CD4+ en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica adicional menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante adicional sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica adicional, y (vi) la composición sucesiva de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica adicional.

También se describe un método para preparar una composición de linfocitos alogénicos para administración a un receptor humano, que comprende: proporcionar una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico al receptor, comprendiendo la composición de células de sangre periférica un número de células T CD4+, un número de células T CD8+, y un número de células asesinas naturales, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, y (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante; y preparar la composición de linfocitos alogénicos a partir de la composición de células de sangre periférica reduciendo el número de células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica al menos un orden de magnitud, en la que (a) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, y (b) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

También se describe una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para administración a un receptor humano, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos: un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

También se describe una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para administración a un receptor humano, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos: un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno que no está presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de

células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

5 Se describe además un kit para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto, comprendiendo el kit: una composición de linfocitos en la que el sujeto es el receptor humano; y una composición de nanopartículas que comprende nanopartículas que comprenden el antígeno que no está presente en el receptor humano.

10 Se describe además un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto humano, que comprende: administrar al sujeto una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el sujeto, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

25 También se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto humano, que comprende inyectar una composición de nanopartículas en un tumor, en la que la composición de nanopartículas comprende nanopartículas que comprenden un antígeno que no está presente en el sujeto, introduciendo así el antígeno en el sujeto; administrar al sujeto una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente al antígeno, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

40 Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra los hematocritos de los mismos cinco pacientes después de BMT, con las partes dentadas reflejando el efecto de la transfusión (gráfico).

La Figura 2 muestra que ILD sin prendimiento induce inmunidad anti-tumor (gráfico).

45 La Figura 3a muestra el prendimiento de células del donante como vacuna más aloCD4s prolongan la supervivencia (gráfico). La Figura 3b muestra un gráfico con quimerismo de células T CD4+ del donante y los días posteriores al trasplante.

La Figura 4 muestra operaciones de validación para la depleción de CD8 usando el producto de leucaféresis y especímenes de flebotomía (resultados de citometría de flujo).

Descripción detallada de la invención

50 La presente descripción surge al menos en parte a partir del descubrimiento trascendental de que la respuesta inmune frente al cáncer está dificultada por defectos funcionales de las células T CD4+ del paciente. Las infusiones de linfocitos alogénicos pueden proporcionar una fuente exógena de ayuda de células T CD4+ para las células T CD8+ endógenas, reactivas frente al tumor. La depleción de células T CD8+ de la infusión de linfocitos del donante reduce el riesgo de prendimiento sostenido y de enfermedad de injerto frente a huésped. La eliminación de células T reguladoras de la población infundida puede aumentar la capacidad de las células T no reguladoras para proporcionar ayuda para los efectores endógenos de la inmunidad anti-tumor. La terapia con células T alogénicas se proporciona típicamente en el contexto de trasplante de células madre alogénicas, en la que el paciente recibe un acondicionamiento altamente inmunosupresor seguido de una infusión de un injerto de células madre que contiene

poblaciones no seleccionadas de células T maduras. En el tratamiento descrito aquí, el injerto se modifica por ingeniería para minimizar la posibilidad de prendimiento sostenido de células del donante, y las células T efectoras anti-tumor derivan del huésped. Así, la terapia conlleva una cooperación única de linfocitos el huésped y del donante durante el periodo del prendimiento transitorio de las células del donante.

- 5 En una realización, la invención proporciona un método para preparar una composición de linfocitos alogénicos como se define en las reivindicaciones para administración a un receptor humano, preferiblemente, el donante y el receptor no son el mismo ser humano. El método incluye proporcionar una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico al receptor, comprendiendo la composición de células de sangre periférica un número de células T CD4+, un número de células T CD8+, y un número de células asesinas naturales, algunas células asesinas naturales tienen antígeno CD8+ y pueden eliminarse por la etapa de "reducción"; sin embargo, las composiciones de linfocitos preferidas de la presente invención comprenden al menos algunas células asesinas naturales del donante. En el método como se define en las reivindicaciones (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor (una disparidad alélica de HLA Clase II en la dirección donante frente a receptor, es decir, dirección injerto frente a huésped) y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen tal como HLA-DRB1, HLA-DQB1, o HLA-DPB1. El receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante ("anticuerpos detectables" en este contexto se definen usando métodos estándar para tomar esta determinación (por ejemplo, el receptor no tiene anticuerpos frente a moléculas HLA del donante que son detectables por citotoxicidad dependiente de complemento, en ensayos de compatibilidad cruzada de citometría de flujo un resultado positivo es indeseable, o intensidad de fluorescencia media (MFI) de 3.000 o mayor en un inmunoensayo en fase sólida es inaceptable).

- La composición de linfocitos alogénicos se prepara a partir de la composición de células de sangre periférica reduciendo el número de células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica al menos un orden de magnitud, en la que (a) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%. En una realización preferida, la proporción del número de células T CD4+/el número de células T CD8+ en la composición de linfocitos es preferiblemente mayor de o igual a aproximadamente 30. Los ejemplos de algunas realizaciones incluyen, pero no están limitados a, las dosis siguientes por kilogramo de peso corporal ideal del receptor: una composición de linfocitos que comprende 10^5 células CD4+ típicamente no tiene más de $3,2 \times 10^3$ células CD8+, 10^6 células CD4+ típicamente no tiene más de $3,2 \times 10^4$ células CD8+, 10^7 células CD4+ típicamente no tiene más de $3,2 \times 10^5$ células CD8+, 10^8 células CD4+ típicamente no tiene más de $3,2 \times 10^6$ células CD8+, y 5×10^8 células CD4+ típicamente no tiene más de $1,6 \times 10^7$ células CD8+.

- El número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*. reducido un orden de magnitud, preferiblemente aproximadamente dos órdenes de magnitud, más preferiblemente a aproximadamente cinco órdenes de magnitud. En una realización, el número de células CD8+ se reduce aproximadamente 2,5 órdenes de magnitud (por ejemplo, usando el método de separación de células con lechos magnéticos).

- En un aspecto, en el que si el donante y receptor tienen un tipo sanguíneo ABO incompatible y la composición de células de sangre periférica comprende un número de células sanguíneas rojas, entonces la preparación de la composición de linfocitos alogénicos comprende además reducir el número de células sanguíneas rojas. "Tipo sanguíneo ABO incompatible", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cuando el receptor tiene una incompatibilidad principal de ABO de células sanguíneas rojas frente al donante, por ejemplo, el receptor tiene el tipo sanguíneo O y el donante tiene el tipo sanguíneo A, B, o AB, el receptor tiene el tipo sanguíneo A y el donante tiene el tipo sanguíneo B o AB, o el receptor tiene el tipo B y el donante tiene el tipo A o AB.

- En un aspecto, el número de células sanguíneas rojas comprende menos de o igual a aproximadamente 50 ml en volumen empaquetado, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente 50 ml en volumen empaquetado, preferiblemente menos de o igual a aproximadamente 30 ml en volumen empaquetado, además "volumen empaquetado" debe definirse, por ejemplo, centrifugación de la composición de linfocitos resultaría es un volumen empaquetado de 50 ml o menos de células sanguíneas rojas; una muestra de volumen medido de la composición de linfocitos también podría cribarse para proporcionar un volumen proporcionalmente representativo de células sanguíneas empaquetadas.

- En un aspecto, el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 20%. En algunas realizaciones, las células T CD4+ son menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, preferiblemente menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%. En algunas realizaciones, puede realizarse la expansión *ex vivo* de las células T CD4+, en dichas realizaciones, el número de células T CD4+ puede superar en gran medida el número original. Dicha expansión es una realización alternativa.

- En algunas realizaciones, las células T CD4+ obtenidas del donante no se expanden intencionadamente o

diferencian intencionadamente *ex vivo*. Expandidas intencionadamente o diferenciadas intencionadamente se distingue de expansión o diferenciación de las células T CD4+ que es meramente un efecto secundario (no intencional, involuntario) del método, por ejemplo, las células T CD4+ pueden experimentar algunas veces diferenciación poniéndose en contacto con plástico, otros ejemplos de dichos eventos involuntarios. En otra
5 realización, existe una condición adicional de que las células madre no se han movilizadas en la composición de células de sangre periférica del donante que es alogénico para el receptor.

En algunos aspectos, la reducción de las células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica comprende usar un anticuerpo anti-CD8+ asociado con partículas magnéticas o un anticuerpo anti-CD8+ más
10 complemento. La composición de células de sangre periférica puede ser un producto de sangre completa o un producto de aféresis, por ejemplo. Además, la disparidad alélica de HLA Clase II en la dirección del donante frente al receptor puede ser una disparidad en HLA-DRB1. Esta limitación con una disparidad alélica de HLA Clase II en la dirección donante frente a receptor es por ejemplo "dirección injerto frente a huésped", en el que la al menos una
15 disparidad del o de los alelos de HLA Clase II en la dirección del donante alogénico frente al receptor comprende además la misma disparidad del o de los alelos de HLA Clase II entre el donante alogénico frente a uno o más familiares de primer grado del receptor, lo que es deseable para preservar la oportunidad para trasplante de médula ósea de los familiares de primer grado al receptor; idealmente, todas las disparidades entre el donante frente al receptor no existen entre un donante de médula ósea familiar potencial frente al receptor.

En algunos aspectos, se hace el cribado para una o más características de selección y el cribado se lleva a cabo en un sujeto seleccionado del grupo que consiste en el receptor, el donante, y uno o más donantes alogénicos
20 potenciales. Por ejemplo, una característica de selección es el cribado para reactividad serológica a un antígeno de agente infeccioso. Un antígeno de agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en un antígeno de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un antígeno del virus de la hepatitis, y un antígeno de citomegalovirus. Los agentes importantes para ser cribados incluyen, por ejemplo, antígeno(s) de VIH-1, antígeno(s) de VIH-2, antígeno(s) del virus de la hepatitis A, antígeno(s) del virus de la hepatitis B, antígeno(s) del virus de la hepatitis C, antígenos de CMV, enfermedades infecciosas, etc. Si el virus o agente infeccioso o un antígeno de éste es la diana de la terapia, no se descartaría un donante que tiene la respuesta inmune mediada por CD4+ deseada frente a ese agente.

En un aspecto, el antígeno del agente infeccioso es un antígeno de citomegalovirus, el receptor y el donante se criban, y no hay reactividad serológica frente al antígeno de citomegalovirus en el receptor o el donante. En un
30 aspecto, el antígeno viral es un antígeno de influenza y el antígeno de influenza es un antígeno hemaglutinina o antígeno neuraminidasa.

En otro aspecto, una característica de selección es el cribado para más de uno de los alelos de HLA Clase II. En determinados casos, se selecciona un donante alogénico potencial sobre la base de maximizar la disparidad entre el donante alogénico potencial frente al receptor, en la dirección del donante alogénico potencial frente al receptor, en
35 más de uno de los alelos de HLA Clase II, y el donante alogénico potencial se elige como el donante. En determinados casos, una característica de selección es el cribado para uno o más alelo(s) de HLA Clase II.

Un donante alogénico potencial puede seleccionarse sobre la base de minimizar la disparidad entre el donante alogénico potencial y el receptor en más de uno de los alelo(s) de HLA Clase II, y el donante alogénico potencial se elige como el donante.

En una realización, la invención proporciona una composición de linfocitos alogénicos para administración a un receptor humano obtenida por el método de la invención como se describe en la presente memoria.

Si el receptor es seropositivo para el antígeno de CMV, entonces el estado del donante no importa. En determinadas realizaciones en las que el donante no se inmuniza frente a un antígeno que está presente en, o que se administrará a, el receptor, la administración de ayuda de células T CD4+ es contingente después del reconocimiento por las
45 células T CD4+ del donante de moléculas de HLA Clase II alogénicas en las células del receptor. Un ejemplo de un "donante ideal" para el propósito de ejemplificar estas realizaciones de la presente invención presenta disparidad completa de los alelos de HLA Clase II (en particular, HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1) y paridad completa de los alelos de Clase I (para maximizar la supervivencia de las células del donante en el receptor y minimizar la formación de aloanticuerpo frente a moléculas de Clase I). Además, el donante ideal presenta disparidad completa con HLA no compartidos de familiares de primer grado del receptor que son donantes potenciales para trasplante de células madre alogénicas.
50

En una realización, hay una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para administración a un receptor humano, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la
55 composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iii) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se

diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (incluyendo, pero no limitado a, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, preferiblemente menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%). Además, "se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%" significa más o menos, menos de 50% del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica. Por ejemplo, si el número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica es 1×10^5 células CD4+, entonces "se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%" significa que el número de células T CD4+ está entre $1,5 \times 10^5$ y $0,5 \times 10^5$. En la composición, el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal (peso corporal ideal (IBW) se basa en la altura. Para los hombres, $IBW = 50 + 2,3 \text{ kg/cada } 2,54 \text{ cm}$ que superan los 1,524 metros. Para las mujeres, $IBW = 45,5 + 2,3 \text{ kg/cada } 2,54 \text{ cm}$ que superan los 1,524 metros) del receptor en kilogramos (kg) está entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg (en una realización preferida, entre aproximadamente 1×10^6 células T CD4+/kg y aproximadamente 5×10^8 células T CD4+/kg); (v) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto humano, que comprende administrar un tratamiento linforreductor (en algunas realizaciones de este aspecto de la presente invención, es deseable proporcionar un tratamiento linforreductor no linfoablato para estimular la expansión y diferenciación homeostática de la composición de linfocitos administrada; en otras realizaciones es deseable que el tratamiento también sea mielorreductor (es decir, que inhibe o depleciona poblaciones mieloides supresoras incluyendo células supresoras derivadas de mieloides, macrófago asociado a tumor, y o neutrófilos N2) no linfoablato al sujeto para inducir linfopenia transitoria en el sujeto; y posteriormente administrar al sujeto una primera composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico, comprendiendo la primera composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iii) el número de células T CD4+ en la primera composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la primera composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la primera composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la primera composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

Aunque no se pretende la vinculación a una teoría particular, las células CD4+ infundidas proporcionan señales a otros tipos de células, predominantemente las células CD8+, macrófagos, y/o células presentadoras de antígeno del sujeto que aumentan la función citotóxica de estas células en el sujeto (CD4+ con tolerancia inmune del sujeto/CD8+ agotadas del sujeto); un ejemplo de tratamiento de una enfermedad o afección por este método debe ejemplificarse, al menos tratamiento de síndrome mielodisplásico.

En un aspecto, el tratamiento linforreductor no linfoablato comprende tratar al sujeto con uno o más agentes citorreductores seleccionados del grupo que consiste en agentes alquilantes, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, antimetabolitos, análogos de pirimidina, análogos de purina, alcaloides de vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, dibromomanitol, desoxiespergualina, dimetil milerán y tiotepa. En un aspecto, el tratamiento linforreductor no linfoablato comprende tratar al sujeto con un agente alquilante y el agente alquilante es ciclofosfamida. En un aspecto, posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto, el método comprende además la administración de un anticuerpo monoclonal anti-tumor o conjugado anticuerpo monoclonal anti-tumor/fármaco al sujeto.

Se describen kits para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto, comprendiendo el kit: una composición de linfocitos como se describe en la presente memoria en la que el sujeto es el receptor humano; y una composición de nanopartículas que comprende nanopartículas que comprenden el antígeno que no está presente en el receptor humano. Las nanopartículas pueden comprender además una citoquina, por ejemplo, una interleuquina o un interferón. La citoquina puede ser una interleuquina y se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-7, IL-12 e IL-15. La citoquina puede ser un interferón, por ejemplo, interferón gamma, interferón beta, interferón alfa, interferón tau, interferón omega, e interferón de consenso.

Las nanopartículas pueden comprender además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una quimioquina, un agente para la formación de imágenes, una molécula antena fotosensible, una molécula antena

termal, y un ligando de receptor semejante a Toll, ligandos que estimulan la diferenciación de células T CD4+ en células T de memoria CD4+ de tipo I (por ejemplo, que producen IFN-gamma), ligandos para receptores que inducen la activación de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 o aptámeros). Además, las nanopartículas pueden incluir un agente que dirige a las nanopartículas a células tumorales o células presentadoras de antígeno.

El método puede comprender la administración del anticuerpo monoclonal anti-tumor y el anticuerpo monoclonal anti-tumor se selecciona del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, trastuzumab, y pertuzumab. El método puede comprender además la administración del conjugado anticuerpo monoclonal anti-tumor/fármaco y el conjugado anticuerpo monoclonal anti-tumor/fármaco se selecciona del grupo que consiste en brentuximab vedotina, gemtuzumab ozogamicina, trastuzumab emtansina, inotuzumab ozogamicina, glembatumumab vedotina, lorvotuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, y milatuzumab-doxorrubicina. En algunos aspectos, la administración es, en primer lugar, la composición de linfocitos alogénicos y después la administración de un agente quimioterapéutico al sujeto. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en dasatinib, nilotinib, ponatinib, imatinib, lapatinib, y vismodegib.

Posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto, el método puede comprender además la administración de un conjugado anticuerpo monoclonal/epítipo de célula T CD4+ al sujeto. Posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto, el método puede comprender además la administración de un tratamiento sucesivo linforreductor no linfoablativo al sujeto para inducir una linfopenia transitoria en el sujeto; y posteriormente administrar al sujeto una composición sucesiva de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica adicional de un donante humano alogénico adicional, comprendiendo la composición sucesiva de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica adicional del donante adicional, en la que (i) el donante adicional comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante adicional frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante adicional, (iii) el número de células T CD4+ en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica adicional menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante adicional sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica adicional, y (vi) la composición sucesiva de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica adicional. Con este método existe la condición de que las células T CD4+ de la composición sucesiva de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*. Posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto, el método comprende además la administración de un agente que bloquea la señalización negativa en las células T. El agente que bloquea la señalización negativa en las células T se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD1, ipilimumab, un anticuerpo anti-PD-L2, y una proteína de fusión PD-1. La enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, un trastorno autoinmune, un trasplante de órgano, un rechazo de aloinjerto, y una infección viral. Por ejemplo, la enfermedad o afección es un cáncer y el cáncer es síndrome mielodisplásico.

Se describe un método para preparar una composición de linfocitos alogénicos para administración a un receptor humano, que comprende: proporcionar una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico al receptor, comprendiendo la composición de células de sangre periférica un número de células T CD4+, un número de células T CD8+, y un número de células asesinas naturales, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1 y (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante; y preparar la composición de linfocitos alogénicos a partir de la composición de células de sangre periférica reduciendo el número de células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica al menos un orden de magnitud, en la que (a) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, y (b) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

En un aspecto, el antígeno presente en el receptor se selecciona del grupo que consiste en un antígeno neoplásico (antígeno neoplásico es un antígeno asociado con un neoplasma en el que neoplasma se define como cualquier crecimiento celular nuevo y anormal, específicamente uno en el que la replicación celular es incontrolada y progresiva. Los neoplasmas pueden ser benignos, pre-malignos o malignos, y los cánceres son neoplasmas malignos. Así, todos los antígenos de cáncer son antígenos neoplásicos pero no todos los antígenos neoplásicos son antígenos de cáncer. El idiotipo neoplásico (Id) es una diana específica de tumor, por ejemplo, en aquellas malignidades de células B que expresan esta molécula en su superficie celular, por ejemplo, linfoma o mieloma

múltiple, e incluyen un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasitario, y un antígeno animal no humano.

5 En un aspecto, un donante alogénico potencial se selecciona de uno o más donantes alogénicos potenciales sobre la base de minimizar la disparidad entre el donante alogénico potencial y el receptor en más de uno de los alelos de HLA Clase II, y el donante alogénico potencial se elige como el donante. Un donante alogénico potencial se selecciona de uno o más donantes alogénicos potenciales sobre la base de minimizar la disparidad entre el donante alogénico potencial y el receptor en uno o más de los alelo(s) de HLA Clase II, y el donante alogénico potencial se elige como el donante.

10 En un aspecto, al antígeno presente en el receptor frente al que el donante tiene inmunidad es un antígeno viral y el antígeno viral se selecciona del grupo que consiste en un antígeno del papilomavirus humano, un antígeno del virus de Epstein Barr, un antígeno de herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), un antígeno del virus de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, y un antígeno del virus de la hepatitis C. Por ejemplo, el antígeno viral es un antígeno del papilomavirus humano y el antígeno del papilomavirus humano es un péptido antigénico E6 o E7. En un aspecto, el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del
15 número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 20%.

También se describe una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para administración a un receptor humano, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente el 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.
20
25
30

Se describe además una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para administración a un receptor humano, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno que no está presente en el receptor, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.
35
40
45

También se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente a un antígeno presente en el sujeto, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica;
50
55
60

con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

Las composiciones de la invención pueden usarse frente a un amplio rango de cánceres y tipos de tumor, incluyendo pero no limitado a, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer gastrointestinal, cáncer genitourinario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de piel, y cáncer testicular. Más particularmente, los cánceres que pueden tratarse por las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: cánceres cardíacos, incluyendo, por ejemplo, sarcoma, por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y liposarcoma; mixoma; rhabdomioma; fibroma; lipoma y teratoma; cánceres de pulmón, incluyendo, por ejemplo, carcinoma broncogénico, por ejemplo, de células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, y adenocarcinoma; carcinoma alveolar y bronquiolar; adenoma bronquial; sarcoma; linfoma; hamartoma condromatoso; y mesotelioma; cáncer gastrointestinal, incluyendo, por ejemplo, cánceres del esófago, por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, y linfoma; cánceres del estómago, por ejemplo, carcinoma, linfoma, y leiomyosarcoma; cánceres del páncreas, por ejemplo, adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, y vipoma; cánceres del intestino delgado, por ejemplo, adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, y fibroma; cánceres del intestino grueso, por ejemplo, adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, y leiomioma; cánceres del tracto genitourinario, incluyendo, por ejemplo, cánceres del riñón, por ejemplo, adenocarcinoma, tumor de Wilm (nefroblastoma), linfoma, y leucemia; cánceres de la vejiga y uretra, por ejemplo, carcinoma de células escamosas carcinoma de células transicionales, y adenocarcinoma; cánceres de la próstata, por ejemplo, adenocarcinoma, y sarcoma; cáncer de los testículos, por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, y linfoma; cánceres de hígado, incluyendo, por ejemplo, hepatoma, por ejemplo, carcinoma hepatocelular; colangiocarcinoma; hepatoblastoma; angiosarcoma; adenoma hepatocelular; y hemangioma; cánceres de hueso, incluyendo, por ejemplo, sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, cordoma de tumor de células gigantes maligno, osteocronoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; cánceres del sistema nervioso, incluyendo, por ejemplo, cánceres del cráneo, por ejemplo, osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, y osteitis defoinians; cánceres de las meninges, por ejemplo, meningioma, meningiosarcoma, y gliomatosis; cánceres del cerebro, por ejemplo, astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma (pinealoma), glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, y tumores congénitos; y cánceres de la médula espinal, por ejemplo, neurofibroma, meningioma, glioma, y sarcoma; cánceres ginecológicos, incluyendo, por ejemplo, cánceres del útero, por ejemplo, carcinoma endometrial; cánceres del cuello uterino, por ejemplo, carcinoma del cuello uterino, y displasia del cuello uterino pre tumoral; cánceres de los ovarios, por ejemplo, carcinoma de ovario, incluyendo cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado, tumores de células tecales granulosa, tumores de células de Sertoli Leydig, disgerminoma, y teratoma maligno; cánceres de la vulva, por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, y melanoma; cánceres de la vagina, por ejemplo, carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides, y rhabdomyosarcoma embrionario; y cánceres de los tubos de falopio, por ejemplo, carcinoma; cánceres hematológicos, incluyendo, por ejemplo, cánceres de la sangre, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, y síndrome mielodisplásico, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (linfoma maligno) y macroglobulinemia de Waldenström; cánceres de la piel, incluyendo, por ejemplo, melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares nevus displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y cánceres de la glándula adrenal, incluyendo, por ejemplo, neuroblastoma. En determinadas realizaciones, cuando la enfermedad es cáncer, puede incluir un tumor de cáncer de pulmón, un tumor de cáncer de mama, un tumor de cáncer de próstata, un tumor de cáncer de cerebro, o un tumor de cáncer de piel, por ejemplo.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse en combinación con métodos existentes para tratar cánceres, por ejemplo por quimioterapia, irradiación, o cirugía. Así, se proporciona además la composición de linfocitos alogénicos descrita para uso en el tratamiento de cáncer que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición de la invención a un individuo que necesita dicho tratamiento, en el que se administra una cantidad efectiva de al menos un agente quimioterapéutico para cáncer adicional al individuo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen cualquiera de: abarelix, aldesleuquina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, azacitidina, bevacizumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, bortezomib, busulfán intravenoso, busulfán oral, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, dalteparina sodio, dasatinib, daunorrubicina, decitabina, denileuquina, denileuquina diftotox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de dromostanolona, eculizumab, epirubicina, erlotinib, estramustina, fosfato de etopósido, etopósido, exemestano, citrato de fentanilo, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, acetato de goserelina, acetato de histrelina, ibritumomab tiuxetán, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón alfa 2a, irinotecán, ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, acetato de leuprólido, levamisol, lomustina, mecloretamina, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona,

fenpropionato de nandrolona, nelarabina, noretumomab, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, panitumumab, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disodio, pentostatina, pipobromano, plicamicina, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, maleato de sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, y zoledronato.

En los métodos descritos en la presente memoria, opcionalmente, antes de administrar al sujeto la composición de linfocitos alogénicos, el método comprende además administrar un tratamiento para deplecionar o inhibir las células supresoras derivadas de mieloides. El tratamiento para deplecionar o inhibir las células supresoras derivadas de mieloides puede comprender la administración de un fármaco seleccionado del grupo que consiste en dasatinib, 5-fluorouracilo, taxotere, clodronato, y gemcitabina, por ejemplo. Opcionalmente, antes de administrar al sujeto la composición de linfocitos alogénicos, el método comprende además administrar un tratamiento para deplecionar o inhibir células de macrófagos asociadas a tumor. Opcionalmente, antes de administrar al sujeto la composición de linfocitos alogénicos, el método comprende además administrar un tratamiento para deplecionar células T reguladoras. El tratamiento para deplecionar células T reguladoras puede incluir la administración de un fármaco seleccionado del grupo que consiste en ciclofosfamida, denileuquina difitox, y daclizumab.

También se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto humano que comprende: inyectar una composición de nanopartículas en un tumor (las nanopartículas pueden inyectarse en o infundirse en el sujeto, en el que las nanopartículas comprenden además un agente de direccionamiento, y el agente de direccionamiento se une a una célula diana tal como un neoplasma dispersado/no localizado (por ejemplo, un linfoma o leucemia) cuando la inyección directa a todos los sitios posibles no es práctica o factible), en la que la composición de nanopartículas comprende nanopartículas que comprenden un antígeno que no está presente en el sujeto, introduciendo así el antígeno en el sujeto; administrar al sujeto una composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico, comprendiendo la composición de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante tiene inmunidad de células T CD4+ frente al antígeno, (ii) el donante comprende al menos una paridad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto y la paridad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (iii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, (iv) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (v) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (vi) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vii) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*. En un aspecto, el antígeno es un antígeno animal no humano y el antígeno animal no humano es un antígeno de hemocianina de lapa. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno viral y el antígeno viral se selecciona del grupo que consiste en un antígeno de papilomavirus humano, un antígeno del virus de Epstein Barr, un antígeno de herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), un antígeno del virus de la hepatitis A, un antígeno del virus de la hepatitis B, y un antígeno del virus de la hepatitis C.

Las composiciones de la invención pueden administrarse al individuo por una variedad de rutas, por ejemplo, oralmente, tópicamente, parenteralmente, intravaginalmente, sistémicamente, intramuscularmente, rectalmente o intravenosamente. En determinadas realizaciones, la composición se formula con un vehículo farmacéutico. Preferiblemente, la composición se administra intravenosamente.

En algunas realizaciones, la composición se combina con otras terapias anti-virales o anti-cáncer, tal como administración de un agente anti-viral o anti-cáncer, terapia de radiación, fototerapia o inmunoterapia. El agente anti-viral o anti-cáncer puede administrarse con una composición de la invención bien en la misma formulación o en formulaciones separadas, para potenciar el tratamiento. En estas realizaciones, la composición y las otras terapias pueden administrarse al mismo tiempo (simultáneamente) o en tiempos separados (secuencialmente), siempre que se administren de manera tal y lo suficientemente próximas en el tiempo como para tener el efecto deseado.

Los ejemplos siguientes se pretenden para ilustrar pero no limitar la invención.

Ejemplos

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo diverso de trastornos de células madre malignos caracterizados por una producción displásica e inefectiva por la médula ósea de células sanguíneas y un riesgo variable de transformación a leucemia aguda. Estos trastornos pueden desarrollarse de novo o surgir años después de la exposición a quimioterapia potencialmente mutagénica.

Aproximadamente, se diagnosticarán 12.000-20.000 nuevos casos de SMD en los Estados Unidos este año con una edad media de inicio de entre 60 y 72. Los resultados del tratamiento actual para los síndromes mielodisplásicos han

sido decepcionantes. La edad, estado funcional, y categoría de riesgo de la enfermedad, según se determina por el Sistema Internacional de Puntuación Pronóstica (IPSS), determinan habitualmente la elección de la modalidad de tratamiento. Los pacientes <60 años de edad, que tienen un estado funcional bueno o excelente y que están en las categorías de riesgo de IPSS intermedia-2 o alta, se considerarán predominantemente para terapias de alta intensidad, ya que estas categorías de IPSS confieren una supervivencia media de 1,2 y 0,4 años, respectivamente. Las terapias de alta intensidad se definen como tratamientos que requieren hospitalización, incluyendo quimioterapia de combinación intensiva y trasplante de células hematopoyéticas.

Los pacientes en la categoría baja o intermedia-1 se considerarían generalmente para terapias de baja intensidad. Éstas incluyen tratamientos que pueden administrarse en la clínica ambulatoria, tales como factores de crecimiento hematopoyéticos, agentes inductores de la diferenciación, modificadores de la respuesta biológica, y quimioterapia de baja intensidad. Los pacientes con un estado funcional pobre se considerarían para cuidado paliativo o terapias de baja intensidad.

Ejemplo 1-Dispositivo IDE

El agente investigacional que se va a usar en este ensayo es el sistema CliniMACS con reactivo CD8 CliniMACS®, un dispositivo médico que se usa para enriquecer o deplecionar células T CD8+ de productos de sangre humana. El sistema CliniMACS® pretendido para la selección de células CD8+ comprende cuatro componentes principales: 1) reactivo CD8 CliniMACS®-lechos de hierro-dextrano super paramagnéticos coloidales unidos a un anticuerpo murino frente a CD8 humano; 2) instrumento CliniMACSplus-un instrumento controlado por software que procesa la muestra de sangre (producto celular); 3) conjunto de tubos CliniMACS®, (estándar o LS)-un conjunto de tubos desechables, estériles, de un único uso, con dos columnas de selección de células patentadas; y 4) tampón PBS/EDTA CliniMACS®-una disolución salina estéril, isotónica, tamponada con fosfato, 1 mM EDTA, usada como lavado externo y fluido de transporte para la preparación in vitro de células sanguíneas. El sistema utiliza separación celular magnética (MACS®) una herramienta poderosa para el aislamiento de muchos tipos celulares, para enriquecer o deplecionar selectivamente la población de células de interés. En este caso, las células T CD8+ se marcan con un anticuerpo monoclonal unido a partículas super-paramagnéticas y entonces se deplecionan del producto sanguíneo por paso a través del sistema CliniMACS, que incorpora un imán permanente fuerte y una columna de separación con una matriz ferromagnética para eliminar las células marcadas. Merece la pena indicar que el agente terapéutico en este ensayo, células sanguíneas deplecionadas de células T CD8+, sale del dispositivo y no se pretende que contenga ningún componente del dispositivo.

Ejemplo 2-El prendimiento transitorio de linfocitos del donante induce respuestas tumorales clínicas

Hasta la fecha, sólo dos terapias son capaces de prolongar la supervivencia de los pacientes con SMD. La primera, BMT alogénico, ha conseguido algunas curas a largo plazo, así como el retraso en la progresión de la enfermedad. Esta terapia sólo es aplicable a una pequeña fracción de pacientes afectados debido a la edad, disponibilidad de donante, y comorbilidades. La segunda es el inhibidor de metiltransferasa, 5-azacitidina. Se ha mostrado que esta terapia prolonga la supervivencia media 7 meses comparado con cuidado paliativo solo¹⁰. Algunos pacientes con SMD responden a regímenes inmunosupresores, tales como ciclosporina, globulina antitímocito (ATG) o esteroides, con un incremento sostenido en recuentos sanguíneos. Este descubrimiento es similar a la anemia aplásica, en la que la inmunosupresión trata el componente autoinmune dando lugar a las citopenias. Los resultados favorables obtenidos con agentes dirigidos específicamente al sistema inmune sugieren que SMD es una enfermedad que es susceptible de modulación inmune. Una explicación potencial para el beneficio de ATG, ciclosporina, y esteroides es que estos fármacos desenmascaran la actividad de una respuesta inmune anti-tumor endógena inhibiendo o matando selectivamente linfocitos que suprimen la inmunidad anti-tumor. La evidencia adicional potencial para la existencia de una respuesta inmune endógena críptica frente a SMD se observó en nuestro estudio de trasplante de médula ósea alogénica con disparidad parcial de HLA (haploidéntico) no mieloablativo, en el que cinco pacientes experimentaron respuesta a la enfermedad a pesar de rechazo de injerto. Los cinco pacientes tuvieron al menos reducciones transitorias en el porcentaje de blastos de médula ósea, y tres de los cinco pacientes, cada uno de los cuales era dependiente de transfusiones de células sanguíneas rojas +/- plaquetas antes del trasplante, se convirtieron en independientes de la transfusión. La Tabla 1 demuestra que, a pesar de la ausencia de prendimiento de células del donante en el día 30 después de BMT, al menos tres de cinco pacientes tuvieron una reducción de blastos de la médula que duró al menos seis meses después de BMT.

Tabla 1

Paciente # (edad en años)	Diagnóstico	Quimerismo del donante (Día 30)	% de Blastos pre-BMT	% de Blastos post-BMT (día)
1 (39)	RAEB-t	0	22	0 (181+)
2 (62)	AA → RAEB	0	15	0 (378)
3 (62)	PCV → RAEB	0	8	0 (342)
4 (56)	RAEB	0	5	2
5 (59)	RAEB-t	0	20	4 (73) 50 (78)

La Figura 1 muestra los hematocritos de los mismos cinco pacientes después de BMT, con las partes dentadas reflejando el efecto de la transfusión. Tres de cinco pacientes se volvieron independientes de transfusión, con el paciente #1 permaneciendo en remisión morfológica y hematológica durante al menos tres años. De forma más interesante, el paciente #2 demostró una respuesta hematológica retrasada, volviéndose independiente de transfusión cuatro meses después de BMT y tres meses después de la documentación del rechazo de injerto. A la luz de la sensibilidad de SMD a inmunoterapia, planteamos la posibilidad de que una respuesta inmune anti-tumor endógena (es decir, derivada del huésped) se vuelve a despertar por la perturbación inmunológica proporcionada por el prendimiento transitorio de linfocitos del donante. Este mecanismo postulado, el despertar de una anti-respuesta endógena después del rechazo de injerto, también puede ser la responsable de la inducción de la remisión de leucemia en pacientes que reciben transfusiones de células sanguíneas blancas después bien de no acondicionamiento o sólo irradiación de cuerpo completo con 100 cGy. De forma interesante, en el último estudio, se produjeron tres respuestas clínicas principales en ausencia de quimerismo mensurable del donante. Las respuestas clínicas tanto de no Hodgkin y Figura 2 muestra un gráfico con el porcentaje de supervivencia y días después de la inoculación del tumor para mostrar que ILD sin prendimiento induce inmunidad anti-tumor. Se acondicionaron ratones BALB/c x C57BL/6 F1 (H-2b/d; = 10/grupo) con Cy 200 mg/kg IP en el día -1. En el día 0, recibieron 10^6 células de linfoma A20 IV +/- 5×10^7 células de bazo de donantes con disparidad parcial de MHC B6 x C3H F1 (H-2b/k) +/- vacuna de células tumorales autólogas sc (10^6 A20 irradiadas + 2×10^5 B78H1-GM-CSF irr.). El linfoma de Hodgkin a pesar de la pérdida de quimerismo del donante después de BMT alogénica también se ha descrito; en algunos de estos casos, se observó la regresión tumoral después del prendimiento transitorio de infusiones de linfocitos del donante. 24 Aunque ciertamente es posible que las células T del donante indujeran un efecto anti-leucémico antes de que fueran rechazadas, también es posible que una reacción GVH transitoria rompiera la tolerancia funcional a leucemia en las células T del huésped. Hemos ensayado recientemente la hipótesis de que infusiones de linfocitos del donante (ILD) con prendimiento transitorio puedan inducir respuesta inmunes anti-tumor de células T del huésped en un modelo de ratón. Se trataron ratones BALB/c x C57BL/6 F1 con Cy en el día -1, y en el día 0 recibieron 10^6 células de linfoma A20 (de origen BALB/c) IV junto con nada, ILD haploideéntico solo, vacuna de células tumorales autólogas solo, o ILD + vacuna. Comparado con los animales que recibieron bien no tratamiento o vacuna solo después de acondicionamiento con Cy, aquellos que se acondicionaron con Cy y después se trataron con ILD solo o ILD + vacuna sobrevivieron significativamente más, con una cura aparente conseguida en cinco y cuatro animales, respectivamente (Figura 2). Ninguno de los nueve animales curados tuvo ningún quimerismo de donante detectable cuando se ensayó > 100 días después de ILD, lo que sugiere que las células T del donante fueron rechazadas. Estos resultados demostraron que la combinación de Cy seguido de ILD con disparidad parcial de MHC indujo efectos anti-tumor significativos. Con el fin de caracterizar el papel de las células T del donante CD4+ frente a CD8+ en el efecto antitumor, el experimento se repitió en receptores de Cy + vacuna + 50 millones de células de bazo con disparidad que bien no se trataron o se deplecionaron de células T CD4+, células T CD8+, o ambas. En este experimento, los receptores de ILD de bazo completo murieron todos de GVHD antes del día 20 (Figura 3). Por el contrario, los ratones que recibieron vacuna más células de bazo deplecionadas de células T CD8+ vivieron significativamente más que los ratones que recibieron vacuna más células de bazo deplecionadas de células pan-T ($p = .04$), lo que indica que la depleción de células T CD8+ suprimió GVHD letal sin suprimir la inmunidad anti-tumor. Con el fin de entender por qué la depleción de células T CD8+ de ILD alogénica suprimió GVHD, estudiamos la supervivencia de células del donante en ratones acondicionados con Cy y después infundidos con células de bazo con disparidad, bien no tratadas o deplecionadas de uno o ambos subconjuntos de células T. De forma interesante, las células de bazo deplecionadas de células T CD8+ se prendieron sólo transitoriamente, con quimerismo de células T CD4+ del donante con un pico a los 7 días después de ILD y disminuyendo hasta niveles indetectables sobre el día 21 (más abajo). Por el contrario, se observó un prendimiento sostenido de células del donante en todos los ratones que recibieron ILD que contenía células T CD8+, y la mayor parte de estos animales murieron eventualmente de GVHD. Tomados conjuntamente, los estudios en animales demuestran que Cy seguido de ILD deplecionado de células T CD8+ induce el prendimiento transitorio de células del donante y efectos anti-tumor significativos sin inducir GVHD aguda. Más recientemente, hemos encontrado que la depleción de células T CD8+ del huésped antes de "Cy + ILD", disminuye significativamente el efecto terapéutico, implicando fuertemente a las células T CD8+ del huésped como mediadores críticos del efecto anti-tumor.

Ejemplo 3-Experimento clínico con infusiones de células madre o linfocitos alogénicos deplecionados de células T CD8+

No hay publicaciones de pacientes tratados con Cy seguido de una infusión de PBC deplecionadas de células T CD8+ de donantes haploidénticos, de manera que no es posible proporcionar datos de seguridad preliminares. Sin embargo, ha habido publicaciones de pacientes sometidos a aloBMT que han recibido injertos deplecionados de células T CD8+ o de pacientes en recidiva después de aloBMT que han recibido infusiones de PBMC deplecionadas de células T CD8+. El objetivo de la depleción de células T CD8+ fue reducir la incidencia de GVHD mientras se preserva el efecto anti-leucemia de la infusión. Respecto a GVHD, los estudios no rindieron una respuesta concluyente, con algunos mostrando un posible beneficio y otros sin mostrar ninguno. De forma interesante, la infusión de ILD deplecionados de células T CD8+ indujo la activación de células T CD8+ endógenas, un descubrimiento que es consistente con la hipótesis de que ILD deplecionados de células T CD8+ puede despertar efectivamente una respuesta de células T CD8+ del huésped frente al cáncer.

Los resultados de otros dos estudios están relacionados con consideraciones de la seguridad del estudio clínico propuesto. En el primer estudio, pacientes con varias malignidades hematológicas recibieron médula de donantes no relacionados que tenían disparidad bien para un alelo de HLA-DR o un antígeno de HLA Clase I (HLA-A o HLA-B). Los pacientes recibieron injertos deplecionados de células T CD4+ que contenían dosis tituladas de células T CD8+. El descubrimiento principal relevante para el estudio propuesto fue que el rechazo de injerto ocurrió a pesar del acondicionamiento mieloablativo en seis de diez pacientes que recibieron injertos que contenían $< 3,1 \times 10^6$ células T CD8+/kg de peso corporal del receptor pero en ninguno de quince pacientes que recibieron $> 3,1 \times 10^6$ células T CD8+/kg. Así, incluso después del acondicionamiento mieloablativo, la depleción de células T CD8+ incrementa significativamente el riesgo de rechazo de injerto, lo que anula el riesgo de aplasia inducida por injerto y GVHD. En el segundo estudio, los pacientes recibieron injertos de células madre de sangre periférica haploidénticos deplecionados de células T (PBSC; n = 15) o PBSC más médula (n = 28) que contenían una media de $2,7 \times 10^4$ ó $3,5 \times 10^4$ células T CD3+/kg, respectivamente, lo que se traduce en dosis de células T CD8+ de aproximadamente $1-1,5 \times 10^4$ /kg. Para facilitar el prendimiento a pesar de la depleción de células T, los pacientes se acondicionaron intensivamente y recibieron injertos de células madre "mega-dosis" que contenían una media de $14,0 \times 10^6$ ó $10,6 \times 10^6$ células CD34+/kg para receptores de PBSC solo frente a PBSC más médula, respectivamente. A la luz del bajo contenido en células T, no se administró profilaxis para GVHD. El prendimiento ocurrió en los 43 pacientes, y ningún paciente experimentó GVHD aguda o crónica como resultado del procedimiento de trasplante. Estos datos demuestran que incluso cuando ocurre el prendimiento sostenido en pacientes que reciben acondicionamiento mieloablativo, es improbable que los injertos haploidénticos que contienen $< 10^4$ células T CD8+/kg causen GVHD. Como el dispositivo consigue habitualmente > 2 log depleción de células T CD8+, la dosis de partida de PBC deplecionadas de células T CD8+ en el estudio contendrá probablemente menos de 10^4 células T CD8+/kg. Es probable, entonces, que ninguno de los pacientes que recibe esta dosis prenderá o experimentará GVHD, incluso si se produce el prendimiento sostenido.

Ejemplo 4-Depleción de CD8 usando el sistema CliniMACS con reactivo CD8 CliniMACS

Para este estudio, se deplecionarán células T CD8+ usando el sistema CliniMACS con el reactivo CD8 CliniMACS (Miltenyi Biotec, Woburn, MA), bajo un IDE patrocinado por investigador. Hemos realizado tres operaciones de validación, la primera usando un producto de leucaféresis, y las dos últimas usando especímenes de flebotomía. Los resultados de citometría de flujo de la última depleción se muestran más adelante, demostrando una depleción excelente de células T CD8+, de 8,40% a 0,03% de células totales, y un enriquecimiento correspondiente de células T CD4+ y células NK CD16+ o CD56+ (Figura 4). La Tabla 2 demuestra que los tres productos cumplieron con el criterio del protocolo de tener un número de células T CD8+ que es $< 3,2\%$ del número de células T CD4+. Si se hubieran usado los productos #2 y #3 para administrar una dosis de 10^6 células T CD4+/kg a un receptor con un peso corporal ideal de 70 kg, hubieran contenido $2,6 \times 10^3$ y $7,7 \times 10^2$ células T CD8+/kg IBW, respectivamente, dosis que están muy por debajo del umbral para prendimiento o inducción de GVHD. En comparación, los cinco pacientes que respondieron a pesar del rechazo de injerto recibieron médulas que contenían una media de $1,43 \times 10^7$ células T CD4+/kg (intervalo $0,84-3,14 \times 10^7$ /kg) y $1,86 \times 10^7$ células T CD8+/kg (intervalo $0,43-2,16 \times 10^7$ /kg). Por lo tanto, los pacientes con SMD son capaces de rechazar infusiones de células haploidénticas que contienen todas estas células T.

Tabla 2-Resultados de validación de productos celulares deplecionados de CE8

	% de células CD4+	Total de células CD4+	% de células CD8+	Total de células CD8+	Log de depleción de células CD8+	Porcentaje de viables	Resultado de esterilidad
Depleción #1	39,6%	$7,6 \times 10^8$	0,5%	$9,5 \times 10^6$	1,95	98%	Negativo
#2	11,6%	$2,5 \times 10^8$	0,03%	$6,5 \times 10^5$	2,43	90%	Negativo
#3	39,9%	$3,0 \times 10^8$	0,03%	$2,3 \times 10^5$	2,67	97%	Negativo

Ejemplo 5-Estudios de laboratorio correlativos para predecir la respuesta a terapia

5 A la luz de las toxicidades potenciales de las terapias inmunosupresoras, tales como globulina antitimocito, en pacientes con SMD35, numerosos investigadores se han esforzado para identificar características de los pacientes que se correlacionan con la respuesta a la terapia. Dichas características que predicen la respuesta de la enfermedad incluyen médula hipocelular, repertorio anormal de receptor de células T por el tamaño de CDR3 de la región variable de la cadena beta del receptor de células T por análisis de espectrotipificación, presencia de células con una característica de fenotipo de hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), expresión de HLADR15, trisomía 8, edad más joven, e historial de transfusión más corto. Un objetivo principal de este estudio es determinar si las características que predicen la respuesta a la terapia inmunosupresora también pueden predecir la respuesta a Cy + 10 ILD haploidénticas deplecionadas de células T CD8+. Los pacientes que se incluyeron en este estudio tendrán un examen de espectrotipificación de receptor de células T tanto antes como después de la terapia. La citogenética y tipificación de HLA se realizarán rutinariamente en todos los pacientes.

15 Estudios recientes han descubierto un papel para la alorreactividad de células asesinas naturales del donante en la prevención de recidiva de leucemia aguda después de trasplante de células madre haploidénticas 36-38. Más recientemente, se ha encontrado que células asesinas naturales alorreactivas de origen donante previenen la recidiva de AML y SMD después de trasplante de células madre idénticas para HLA39. Estos resultados subestiman la necesidad de caracterizar el repertorio expresado de receptores semejantes a inmunoglobulina de células asesinas, o KIR, en células NK del donante usando tanto métodos moleculares como de citometría de flujo para 20 identificar donantes que expresan KIR cuyos ligandos HLA están ausentes en las células del receptor. Estos estudios se realizarán retrospectivamente en el Laboratorio de Inmunogenética y los resultados se correlacionarán con la respuesta a la terapia.

Ejemplo 6-Base racional para el diseño de estudio propuesto

25 Éste es un diseño estándar de un estudio de fase I/II que busca determinar, en la parte de fase I del estudio, la dosis máxima tolerada (DMT) de células de sangre periférica haploidénticas deplecionadas de células T CD8+ (PBC CD8-) cuando se infunden después de ciclofosfamida (Cy), y después para estimar, en la parte de fase II del estudio, la eficacia del tratamiento con Cy más la DMT de PBC CD8-. Se ha usado extensamente una alta dosis de Cy (>100 mg/kg) como parte de acondicionamiento para trasplante para pacientes con malignidades hematológicas, y su 30 seguridad está bien documentada en esta población, incluyendo pacientes ancianos (edades 55-66) con síndrome mielodisplásico. Los riesgos más serios del tratamiento, debido a que tienen el potencial de causar la muerte, son aplasia prolongada y enfermedad de injerto frente a huésped, ambos de los cuales requieren prendimiento sostenido de las células del donante. La elección de la dosis inicial de células, 10^5 células T CD4+/kg y $<3,2 \times 10^3$ células T CD8+/kg, se basó únicamente en las consideraciones de seguridad. Específicamente, los injertos que contienen 35 $<10^4$ células T CD8+/kg no causan GVHD severa, incluso entre pacientes que reciben acondicionamiento letal y no inmunosupresión farmacológica después del trasplante. Además, la depleción parcial de células T CD8+ de injertos de médula estándar incrementa significativamente el riesgo de rechazo de injerto33, que es el resultado deseado de tratamiento en este estudio. Por estas razones, se pensó que un producto de ILD que contenía $<10^4$ células T CD8+/kg es improbable que cause eventos adversos serios.

40 El experimento con ILD haploidéntico, sin depleción de células T CD8+, se ha publicado recientemente. En un estudio de fase I/II, 41 pacientes con malignidades recidivantes/refractarias recibieron acondicionamiento no ablativo con 100 cGy de irradiación de cuerpo completo, seguido de infusión de 1×10^6 a 2×10^8 células CD3+ haploidénticas/kg, con 29 pacientes recibiendo la dosis más alta. Las respuestas objetivo se consiguieron a los niveles de dosis más altos. Notablemente, 1×10^8 células CD3+/dosis fue la dosis mínima asociada con respuesta 45 (25% de proporción de respuesta, ó 2 de 8 pacientes), con 2×10^8 células CD3+/dosis (la más alta evaluada) asociadas con la proporción de respuesta mayor (cerca del 50% en 10 de 21 pacientes). Como prueba de principio, todas las respuestas ocurrieron en ausencia de quimerismo de donante sostenido. En la cohorte de la dosis más alta, se observó quimerismo de donante transitorio pero desapareció sobre las 2 semanas en la mayor parte de los

pacientes, con uno de dos pacientes que se convirtieron en quimerismo de donante completo desarrollando GVHD aguda grave (respondedora a esteroides, con el desarrollo posterior de sepsis fatal). Se observó un síndrome clínico agudo denominado "tormenta haplo inmune " probablemente secundario a flujo de citoquinas (caracterizado por 1 o más de los siguientes: fiebre, malestar, anormalidades de LFT, erupción y diarrea) comúnmente a los niveles de dosis más altos y fue respondedor de manera exquisita a esteroides. Este estudio demostró la actividad biológica y perfil de seguridad manejable de esta estrategia. La dosis mínima de células T CD3+ (no deplecionadas de CD8+) requerida para respuesta en este estudio fue 1×10^8 células/kg.

Ejemplo 7-Selección de pacientes

Los pacientes deben tener confirmado patológicamente: síndrome mielodisplásico (SMD), puntuación IPSS de Int-2 o alto (véase el Apéndice A para el sistema de puntuación IPSS). Los pacientes deben haber fracasado o ser ineleables o intolerantes de tratamiento con 5-azacitidina.

Ejemplo 8-Plan de tratamiento

Todos los pacientes requerirán documentación de un historial detallado y examen físico y evaluación estándar de función cardíaca, hepática y renal, como se designa en la sección 10. Todos los pacientes experimentarán un aspirado de médula ósea y biopsia para evaluación morfológica, citogenética (si es aplicable) y de citometría de flujo (si es aplicable) no más de un mes antes del registro en el protocolo, junto con otras evaluaciones estándar de la enfermedad (por ejemplo, CT de pecho, abdomen, pelvis) cuando sea aplicable.

Evaluación pre-tratamiento

La ciclofosfamida se administrará como una infusión iv durante 1-2 hr, (dependiendo del volumen) en los días -2 y -1. La dosis de ciclofosfamida es 50 mg/kg/día. La dosis se calcula sobre la base del peso corporal ideal ajustado o peso corporal real lo que sea menor. El peso corporal y altura se miden directamente. Se calculará un peso aproximado para la altura a partir de una tabla estándar o ecuaciones que reflejan "valores" ideales.

Régimen de ciclofosfamida y pre-ILD

Se instruirán los pacientes para incrementar los fluidos por la noche antes de la administración de ciclofosfamida. La hidratación con disolución salina normal a 3 cc/kg/hr iv se empezará 2 hr antes de la ciclofosfamida, después la velocidad se reducirá hasta 2 cc/kg/hr durante 1 hr pre-ciclofosfamida y se continuará durante 8 hr post-ciclofosfamida. Se proporcionará mesna en dosis divididas iv 30 min pre y a 3,6, y 8 hr post-ciclofosfamida.

La dosis de mesna se basará en la dosis de ciclofosfamida que se administra. La dosis diaria total de mesna es igual al 80% de la dosis diaria total de ciclofosfamida.

La terapia profiláctica anti-microbiana se empezará en el Día 0 y seguirá la práctica institucional.

La profilaxis antifúngica se administrará como sigue: flucanazol 400 mg po o IV qd, empezando el Día 0 y continuando hasta que ANC es >500 durante 3 días consecutivos (o durante 2 medidas consecutivas durante un periodo de 3 días). Puede sustituirse otro agente profiláctico antifúngico apropiado. La profilaxis frente a neumonía por pneumocystis carinii (PCP) empezará el Día 0 y debería continuar hasta el Día 60. Los pacientes intolerantes para trimetoprim/sulfametoxazol (Bactrim) recibirán bien dapsona o pentamidina como profilaxis para PCP. La profilaxis viral consistirá en valaciclovir o aciclovir desde el Día 0 hasta el Día 60. Se administrará una quinolona oral (por ejemplo, moxifloxacina o norfloxacina) según preferencia institucional hasta que ANC es >500 durante 3 días consecutivos (o durante 2 medidas consecutivas durante un periodo de 3 días) después de ILD.

Todos los pacientes recibirán infusión de PBC haploidénticas deplecionadas de células T CD8+ usando el sistema CliniMACS® con reactivo CD8 CliniMACS®. La numeración de los niveles de dosis es desde la dosis de células más baja hasta la más alta. La primera cohorte de pacientes (nivel de dosis 1) recibirá Cy más PBC haploidénticas deplecionadas de células T CD8+ (PBC CD8-) que contienen una dosis pretendida de 1×10^5 células T CD4+/kg de IBW del receptor. Si se cumplen los criterios para la escalada de la dosis, los pacientes en el nivel de dosis 2, 2b, 3, ó 4 recibirán PBC CD8- que contienen una dosis pretendida de 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 , ó 5×10^7 células T CD4+/kg, respectivamente.

Cálculo de la dosis de ILD

La fórmula para calcular el volumen del producto final (deplecionado de CD8) que administrará la dosis pretendida de células T CD4+ es como sigue: volumen pretendido (ml) = dosis pretendida de células T CD4+ (células/kg) x IBW del receptor* (kg)/concentración de células T CD4+ (células/ml). *Nota-Si el peso real es $<$ que el ideal, usar el peso real.

Sin embargo, el número total de células T CD8+ que se infunden puede no superar el 3,2% del número pretendido de células T CD4+ que se va a infundir (el numerador de la ecuación anterior). Si la proporción células CD4+/CD8+ en el producto deplecionado es menor de 31,25 (= 1/,032), entonces el volumen del producto que se va a infundir se determinará por la fórmula siguiente: si la proporción CD4/CD8 del producto final es $<$ 31,25, entonces: volumen

infundido (ml) = volumen pretendido x (proporción CD4/CD8)/31,25. Si la proporción células CD4+/CD8+ en el producto deplecionado es igual a o mayor de 31,25, entonces el volumen del producto que se va a infundir es el volumen pretendido (fórmula 1): si la proporción CD4/CD8 del producto final es > 31,25, entonces: volumen infundido (ml) = volumen pretendido.

5 Soporte de transfusión

Las transfusiones de plaquetas y células rojas empaquetadas se administrarán según recomendaciones institucionales actuales.

Ejemplo 9-Duración de la terapia

10 Los pacientes son elegibles sólo para una infusión de linfocitos. Esta restricción se lleva a cabo porque se espera que el rechazo de los linfocitos infundidos induzca inmunidad anamnésica a las células del donante o incluso a otros familiares cercanos. La sangre periférica del paciente se obtendrá en el día 60 y se ensayará para la presencia de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) y para anticuerpos citotóxicos frente a las células del donante.

Duración del seguimiento

15 Los pacientes se seguirán durante un mínimo de 60 días después de ILD, y después hasta la muerte o la progresión de la enfermedad, lo que ocurra primero. Los pacientes eliminados del estudio por eventos adversos inaceptables o que desarrollan eventos adversos relacionados con el tratamiento se seguirán hasta la resolución o estabilización del evento adverso.

Monitorización post-ILD:

20 A los pacientes que permanecen en el estudio se les extraerá sangre en los días 14, 28, y 60, y seis meses después de ILD. Se obtendrá una CBC con diferencial manual con estas extracciones de sangre. Los subconjuntos de linfocitos, incluyendo el porcentaje de células que expresan CD4 o CD8, se analizarán por citometría de flujo. Después del día 60, el paciente se someterá a recuentos sanguíneos completos mensualmente con diferencial de células sanguíneas blancas siempre que no haya progresión de la enfermedad documentada, hasta 6 meses después de ILD.

25 Evaluación de la enfermedad

Además de las evaluaciones de la enfermedad especificadas anteriormente, los resultados de evaluaciones de la enfermedad adicionales realizadas como atención médica estándar se recogerán para propósitos de estudio hasta la muerte o progresión de la enfermedad, lo que ocurra primero.

Ejemplo 10-Retrasos de la dosificación/modificación de la dosis

30 La dosis de ciclofosfamida no se modificará. La dosis de ILD se modificará en el evento de contenido excesivo de células T CD8+.

Eventos adversos: lista y requerimientos de notificación

35 La información siguiente se recogerá en todos los pacientes con GVHD aguda: fecha de inicio (definida como la fecha de la primera biopsia que confirma GVHD) formulario de evaluación de GVHD en el momento del inicio, semanalmente hasta que se resuelve GVHD, y grado clínico global inicial en el Día 60 grado clínico global máximo fecha de inicio de GVHD aguda de grado III-IV, si existe. La aparición y gravedad de GVHD aguda y crónica después del Día 60 se capturará en la evaluación de seis meses del paciente.

Todos los casos de GVHD aguda de grado II-IV se capturarán como eventos adversos. La GVHD de grado III-IV se reportará como un evento adverso serio.

40 La aplasia inducida por ILD se define como neutropenia (recuento de neutrófilos absoluto < 500/ml) con cualquier evidencia de quimerismo del donante en el día 60 o posterior. Todos los casos de aplasia inducida por ILD se reportarán como eventos adversos serios.

Ejemplo 11-Información farmacéutica

Ciclofosfamida (Cytosan®)

45 La ciclofosfamida está disponible comercialmente. La ciclofosfamida es un agente alquilante que previene la división celular principalmente mediante el entrecruzamiento de las cadenas de ADN. La ciclofosfamida no es específica del ciclo celular. La ciclofosfamida para inyección está disponible en viales de 2.000 mg que se reconstituyen con 100 ml de agua estéril para inyección. La concentración del producto reconstituido es 20 mg/ml. La dosis calculada se diluirá adicionalmente en 250-500 ml de dextrosa al 5% en agua. Cada dosis se infundirá durante 1-2 hr (dependiendo del volumen total).

50

Las toxicidades clínicas de ciclofosfamida incluyen alopecia, náusea y vómito, dolor de cabeza y mareo, cistitis hemorrágica, cardiotoxicidad, inmunosupresión, mielosupresión, fibrosis pulmonar, enzimas hepáticas incrementadas y síndrome de hormona anti-diurética inapropiada (SIADH). La ciclofosfamida se dispensará por la Farmacia de Oncología y es producida por Mead Johnson Pharmaceuticals.

5 Mesna (2-mercapto etano sulfonato de sodio)

Mesna es un agente profiláctico usado para prevenir la cistitis hemorrágica inducida por las oxasofosforinas (ciclofosfamida e ifosfamida). No tiene citotoxicidad intrínseca ni efectos antagonistas sobre la quimioterapia. Mesna se une con acroleína, el metabolito urotóxico producido por las oxasofosforinas, para producir un tioéter no tóxico y ralentiza la velocidad de formación de acroleína combinándose con metabolitos 4-hidroxi de las oxasofosforinas.

- 10 Mesna está disponible en viales de 200 mg, 400 mg y 1.000 mg que contienen una disolución 100 mg/ml. Cada dosis de mesna se diluirá adicionalmente en 50 ml de disolución salina normal para infundirse durante 15 min. La dosis de mesna se basará en la dosis de ciclofosfamida que se está proporcionando. La dosis diaria total de mesna es igual al 80% de la dosis diaria total de ciclofosfamida. A las dosis usadas para uroprotección, mesna es virtualmente no tóxico. Sin embargo, los efectos adversos que pueden ser atribuibles a mesna incluyen náusea y vómito, diarrea, dolor abdominal, erupción, urticaria, dolor de cabeza, dolor de articulaciones o extremidades, hipotensión y fatiga.

Dispositivo CBER IDE

- 20 Se recogerá la sangre de los donantes mediante recogida de sangre completa periférica (450 ml en CPDA-1) o un procedimiento de leucaféresis para recoger células sanguíneas blancas periféricas en condiciones de estado estacionario (sin movilización). Cada recogida de leucaféresis se realizará en un separador de células de flujo continuo (COBE Spectra, Gambro) usando procedimientos de operación estándar institucionales para la recogida de linfocitos. El método de la donación de sangre, flebotomía frente a leucaféresis, se determinará obteniendo un recuento de células T CD4+ absoluto de sangre periférica en los 30 días anteriores a la donación y estimando el volumen de sangre requerido para obtener la dosis diana de células T CD4+. Como el intervalo normal de recuentos de células T CD4+ de sangre periférica es $0,5-1,5 \times 10^6/\text{ml}$, es probable que una simple flebotomía será suficiente para los niveles de dosis 1-2, la féresis puede requerirse para los niveles 2b pero la leucaféresis se requerirá para el nivel de dosis 3 y 4.

- 25 Sobre la base de una experiencia anterior extensa, un procedimiento de leucaféresis de 4 horas debería ser suficiente para obtener 5×10^7 células T CD4+/kg de IBW del receptor. Las recogidas diana serán al menos 30% o más de la dosis deseada para acomodar la pérdida de células durante el proceso de depleción.

- 30 El producto experimentará depleción de CD8 en el Graft Engineering Laboratory. Se seguirán todos los procedimientos de operación estándar. El producto se analizará para recuento de células nucleadas, CD3, CD4, CD8, CD16, y CD56. El producto se almacenará toda la noche y la depleción de CD8 tendrá lugar en el sistema de selección CliniMACS® (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Antes de la depleción de CD8, los productos de sangre completa se procesarán inicialmente para preparar un concentrado de capa leuco-plaquetaria y para parejas donante/receptor principales con ABO incompatible, el concentrado de capa leuco-plaquetaria se procesará adicionalmente usando medio de separación de linfocitos para eliminar células sanguíneas rojas contaminantes. Los productos de sangre completa procesados o productos de aféresis se concentran y resuspenden en PBS/EDTA suplementado con 0,5% albúmina de suero humano.

- 35 El anticuerpo monoclonal murino de CD8, conjugado con partículas super-paramagnéticas de hierro-dextrano se añade y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se usará un vial de anticuerpo para tratar hasta 40×10^9 células sanguíneas blancas totales y hasta 4×10^9 células CD8+. El anticuerpo en exceso se eliminará lavando 1 vez y el volumen del producto se ajustará a 100 ml con PBS/EDTA con albúmina. Después, se conecta al sistema de selección CliniMACS usando un conjunto de tubos desechables estériles. La operación se inicia por un programa de ordenador pre-ajustado que controla (i) el flujo de células tratadas con anticuerpo, (ii) lavado que elimina las células no unidas residuales, (iii) eliminación del campo magnético alrededor de la columna para liberar las células seleccionadas, y (iv) la recogida final de células deplecionadas de CD8 en una bolsa. El proceso completo tarda aproximadamente 2-6 horas desde la terminación de la concentración del producto inicial. El producto posterior se analizará para recuento celular, viabilidad, contenido de CD3, CD4, CD8, CD16, y CD56. La concentración de CD4 se usará para calcular la dosis del paciente. El volumen calculado se retirará y preparará para infusión según procedimientos de operación estándar institucionales.

Estudios correlativos/especiales

Reconstitución inmune fenotípica

- 55 Las concentraciones en sangre periférica de subconjuntos de linfocitos incluyendo células T CD4+ y CD8+ se determinarán usando el recuento de linfocitos absoluto y citometría de flujo en los días 14, 28, 60, y 6 meses después de ILD.

5 Análisis de la diversidad del repertorio de células T CD8+ del huésped por análisis de espectrotipificación. Estudios recientes indican que la diversidad del repertorio de células T puede evaluarse por espectrotipificación de la región V del receptor de células T, que evalúa las regiones CDR3/diversidad/de unión ($V\beta$ -D-J-C β) de células que expresan un gen de V dado. Esta región confiere especificidad del receptor de células T. El análisis por
10 inmunoscope o espectrotipificación de V es útil de forma importante para evaluar las respuestas inmunes anti-tumor después de terapia y reconstitución inmune después de trasplante de médula ósea⁴⁹. Además, el análisis de espectrotipificación de pacientes con SMD antes y después de la terapia inmunosupresora ha revelado sesgo en el repertorio de células T que se normaliza con una respuesta al tratamiento. Por lo tanto, establecemos la hipótesis de que los pacientes con SMD y posiblemente CMML tendrán repertorios de células T sesgados antes del tratamiento,
15 que la ILD inicialmente inducirá una población de células T alorreactivas, y que los respondedores adquirirán eventualmente un repertorio de células T normal según se revela por análisis de espectrotipificación. Las células T CD8+ pre-tratamiento se obtendrán de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente. Para identificar las células T reactivas anti-donante del paciente, las PBMC pre-tratamiento del paciente se cultivarán durante siete días con PBMC irradiadas del donante antes de la separación celular. El periodo de cultivo permite la expansión clonal de las células T anti-donante del paciente. Las PBMC también se recogerán y las células T CD8+ se purificarán en los días 14, 28, 60, y a los seis meses.

20 Aquellos expertos en la técnica deberían apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún así obtener un resultado semejante o similar sin alejarse del alcance de la invención. La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que se pretenden como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están en el alcance de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en la presente memoria, serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. De acuerdo con esto, la invención sólo está limitada por las reivindicaciones siguientes.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de linfocitos alogénicos que comprende:

proporcionar una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico al receptor, comprendiendo la composición de células de sangre periférica células T CD4+, células T CD8+, y células asesinas naturales, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, y (ii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante; y preparar la composición de linfocitos alogénicos a partir de la composición de células de sangre periférica reduciendo el número de células T CD8+ en la composición de células de sangre periférica al menos un orden de magnitud, en la que (a) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, y (b) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

2. El método de la reivindicación 1, en el que si el donante y receptor tienen un tipo sanguíneo ABO incompatible y la composición de células de sangre periférica comprende un número de células sanguíneas rojas, entonces la preparación de la composición de linfocitos alogénicos comprende además reducir el número de células sanguíneas rojas.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el número de células sanguíneas rojas comprende menos de o igual a aproximadamente 50 ml en volumen empaquetado.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 20%.

5. El método de la reivindicación 1, con la condición adicional de que las células T CD4+ obtenidas del donante no se expanden intencionadamente o diferencian intencionadamente *ex vivo*.

6. Una composición de linfocitos alogénicos para administración a un receptor humano obtenida por el método de la reivindicación 1.

7. Una composición de linfocitos humanos alogénicos que comprende:

células T CD4+ y células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica de un donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al receptor en la dirección donante frente a receptor y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, y (ii) el receptor no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante; (iii) el número de células T CD4+ en la composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del receptor en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica;

con la condición de que las células T CD4+ de la composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.

8. La composición de linfocitos de la reivindicación 7, en la que la disparidad alélica de HLA Clase II es una disparidad de dos o más alelos de HLA Clase II seleccionados del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DPB1, y HLA-DQB1.

9. Una primera composición de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica de un donante humano alogénico para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en la que la primera composición de linfocitos alogénicos comprende un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica del donante, en la que (i) el donante comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante, y se ha administrado previamente al sujeto un tratamiento linforreductor no linfoablativo para inducir linfopenia transitoria, con la condición de que las células T CD4+ de la primera composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*, (iii) el número de células T CD4+ en la primera composición de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de

- 5 sangre periférica menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la primera composición de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica, y (vi) la primera composición de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica; con la condición de que las células T CD4+ de la primera composición de linfocitos alogénicos no se activan *ex vivo*.
10. La primera composición de linfocitos alogénicos para uso según la reivindicación 9, comprende además un anticuerpo monoclonal anti-tumor o conjugado anticuerpo monoclonal anti-tumor/fármaco administrada al sujeto posteriormente a la administración de la primera composición de linfocitos alogénicos al sujeto.
- 15 11. La primera composición de linfocitos alogénicos para uso según la reivindicación 10, en la que el anticuerpo monoclonal anti-tumor y el conjugado anticuerpo monoclonal anti-tumor/fármaco se selecciona del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, trastuzumab, pertuzumab, brentuximab vedotina, gemtuzumab ozogamicina, trastuzumab emtansina, inotuzumab ozogamicina, glembatumumab vedotina, lorvotuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, y milatuzumab-doxorrubicina.
- 20 12. La primera composición de linfocitos alogénicos para uso según la reivindicación 9 que comprende una composición sucesiva de linfocitos alogénicos derivada de una composición de células de sangre periférica adicional de un donante humano alogénico adicional, comprendiendo la composición sucesiva de linfocitos alogénicos un número de células T CD4+ y un número de células asesinas naturales de la composición de células de sangre periférica adicional del donante adicional, en la que (i) el donante adicional comprende al menos una disparidad alélica de antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II respecto al sujeto en la dirección donante adicional frente al sujeto y la disparidad alélica de HLA Clase II está en un gen seleccionado del grupo que consiste en HLA-DRB1, HLA-DQB1, y HLA-DPB1, (ii) el sujeto no tiene anticuerpos detectables reactivos frente a los antígenos leucocitarios humanos del donante adicional, (iii) el número de células T CD4+ en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos se diferencia del número de células T CD4+ en la composición de células de sangre periférica adicional menos de aproximadamente 50%, (iv) el número de células T CD4+ del donante adicional sobre la base de un peso corporal ideal del sujeto en kilogramos (kg) es entre aproximadamente 1×10^5 células T CD4+/kg y aproximadamente 1×10^9 células T CD4+/kg, (v) el número de células asesinas naturales en la composición sucesiva de linfocitos alogénicos es menor de o igual al número de células asesinas naturales en la composición de células de sangre periférica adicional, y (vi) la composición sucesiva de linfocitos alogénicos tiene al menos un orden de magnitud menos de células T CD8+ respecto a la composición de células de sangre periférica adicional para uso en el tratamiento de la enfermedad en la que se ha administrado al sujeto un tratamiento sucesivo linforreductor no linfoablatoivo.
- 30 13. La primera composición de linfocitos alogénicos para uso según la reivindicación 12, en la que la enfermedad o afección es un cáncer y el cáncer es síndrome mielodisplásico.
- 35

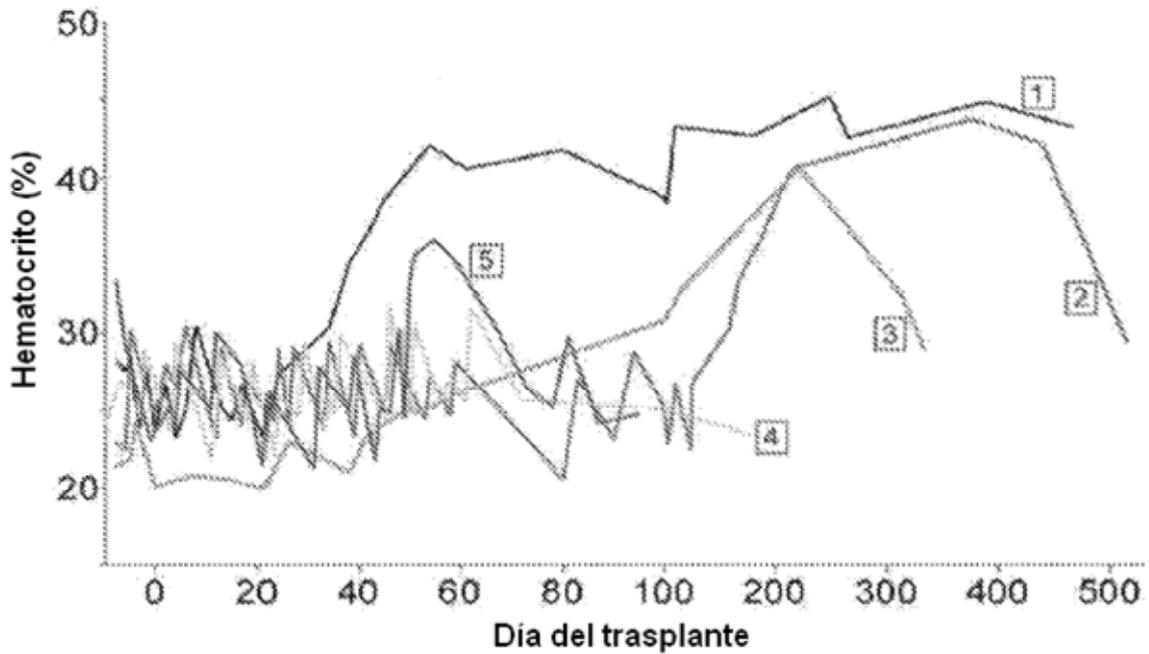


Figura 1. Valores de hematocrito en pacientes con SMD que experimentan rechazo de injerto después de acondicionamiento no mieloablativo y trasplante de médula de familiares con disparidades parciales de HLA.

FIG. 1

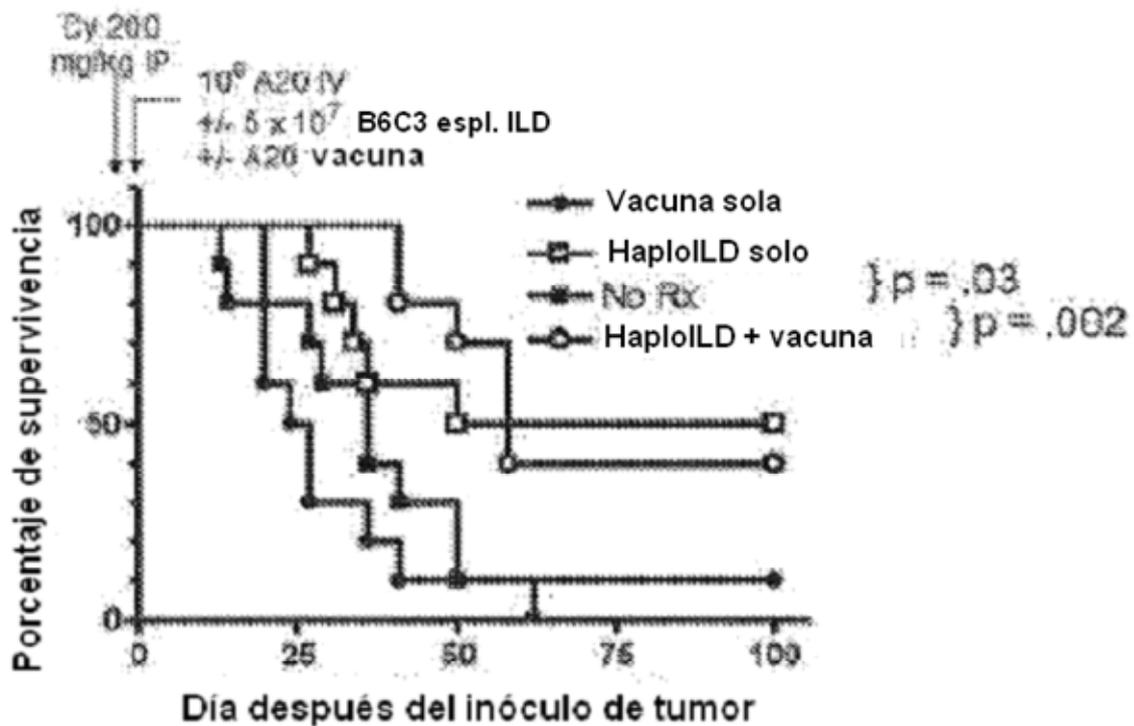


Figura 2. ILD no prendido induce inmunidad anti-tumor. Se acondicionaron ratones BALB/c x C57BL/6 F₁ (H-2^{b/d}, n = 10/grupo) con Cy 200 mg/kg IP en el día -1. En el día 0, recibieron 10⁶ células de linfoma A20 IV +/- 5 x 10⁷ células de bazo de donantes con disparidad parcial de MHC B6 x C3H F₁ (H-2^{b/k}) +/- vacuna de células tumorales autólogas sc (10⁶ A20 irradiadas + 2 x 10⁵ B78H1-GM-CSF irr.).

FIG. 2

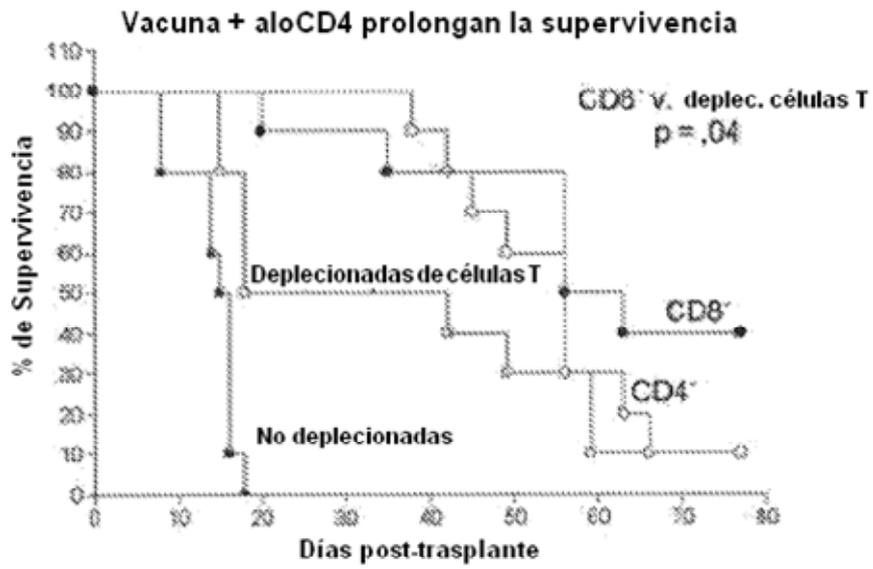


FIG. 3A

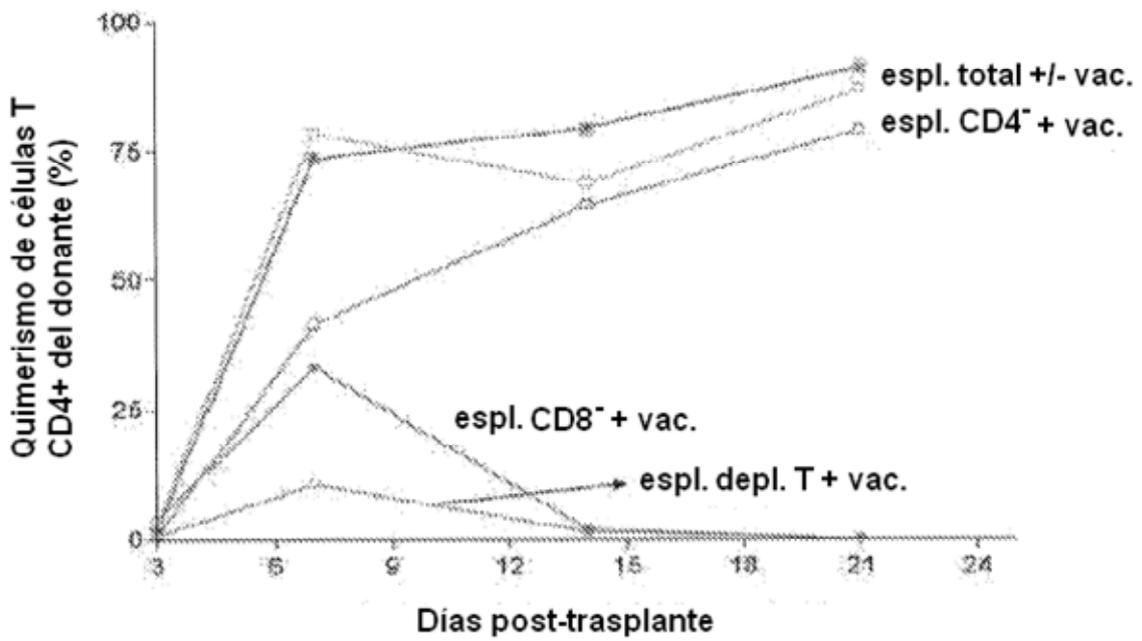


FIG. 3B

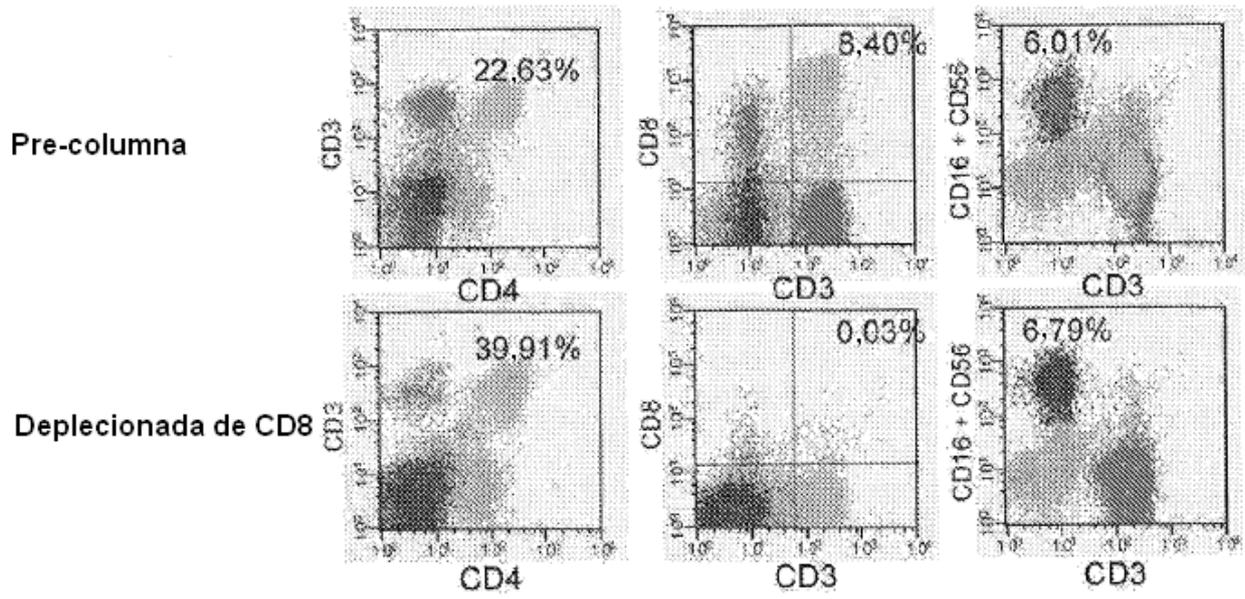


FIG. 4