

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 844**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2012 PCT/US2012/041905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12171007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012 E 12796051 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2717887**

54 Título: **Métodos de prevención o tratamiento de enfermedad injerto contra huésped**

30 Prioridad:

**09.06.2011 US 201161495342 P**

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

**17.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
223 Grinter Hall  
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**MCFADDEN, DOUGLAS, GRANT;  
BARTEE, ERIC, CARTER y  
COGLE, CHRISTOPHER, R.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 663 844 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 de prevención o tratamiento de enfermedad injerto contra huésped

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a métodos de prevención o tratamiento de enfermedad injerto contra huésped (EICH), además de a métodos de inhibición de la proliferación de linfocitos T en una muestra biológica, por ejemplo, una aplicación de células alógenas.

10

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es una complicación clínica potencialmente letal que surge de la transferencia de linfocitos T alorreactivos en pacientes inmunodeprimidos. Específicamente, un componente importante de la EICH incluye la transferencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> de donante maduros presentes en el producto trasplantado al receptor inmunodeprimido. Una vez infundidos, los linfocitos T del donante reconocen antígenos celulares del hospedador, produciendo una cascada inmunorreactiva que frecuentemente afecta al hígado, tubo gastrointestinal y la piel (1,2).

15

20

25

30

35

Los métodos actuales de prevención y tratamiento de EICH han incluido la inmunosupresión general tras el trasplante, acondicionamiento de intensidad reducida y agotamiento o inhibición de linfocitos T de donante alorreactivos antes de la transfusión (2, 3). La eficacia clínica de estos métodos, sin embargo, está limitada por una variedad de efectos secundarios. Por ejemplo, la inmunosupresión general conduce a un riesgo elevado de infecciones por virus reactivados e infecciones oportunistas, mientras que las pautas de acondicionamiento de intensidad reducida están asociadas a elevadas tasas de recaída (3). Actualmente, el tratamiento profiláctico más prometedor para EICH es el agotamiento o la inhibición de linfocitos T de donante. Esto puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos que incluyen agentes citotóxicos linfoablativos, inhibidores específicos de linfocitos T y agotamiento de linfocitos T seleccionando células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> (CMPH o CMPHs). Estos métodos han demostrado ser eficaces reduciendo las tasas de EICH; sin embargo, también están asociados a reconstitución más lenta del sistema inmunitario del receptor, riesgo elevado de infecciones potencialmente mortales y efecto injerto contra leucemia potencialmente limitado (4, 5). Además, se ha descrito que la infección por el virus del mixoma de conejos induce cambios significativos en la distribución de subconjuntos de linfocitos, particularmente el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> era significativamente reducido (22).

**Breve descripción de los dibujos**

40

45

FIG. 1: El tratamiento con virus del mixoma (VMIX) previene EICH letal. Se irradiaron subletalmente ratones NSG y luego se trasplantaron con o bien PBS (control, n=5), 1x10<sup>7</sup> médula ósea (MO) humana primaria (n=36) o bien 1x10<sup>7</sup> MO humana primaria pretratada con VMIX (n=36). Los ratones se pesaron dos veces por semana para monitorizar la condición corporal (A) y se sacrificaron o bien seis semanas después del trasplante o cuando alcanzaron una puntuación de condición corporal de 2 (B). Se determinaron diferencias significativas en la supervivencia usando la prueba del orden logarítmico (P < 0,05). N.S. = no significativa. En la autopsia, se extrajeron los órganos, se fijaron en formalina, se seccionaron y se tiñeron para la presencia de linfocitos CD3<sup>+</sup> humanos (C). Las imágenes de inmunohistoquímica mostradas son representativas de los resultados observados en cinco ratones separados.

50

55

60

FIG. 2: El tratamiento con VMIX previene la expansión *in vivo* de linfocitos T de donante después del trasplante y permite la incorporación del injerto de CMPH normales. Se irradiaron subletalmente ratones NSG y se trasplantaron con 1x10<sup>7</sup> células de MO completa. Seis semanas después del trasplante, se recogió la médula ósea de los ratones y se analizó la incorporación del injerto hematopoyético humano (células humanas dobles positivas CD45<sup>+</sup>/HLA-A,B,C<sup>+</sup>) por citometría de flujo. El tratamiento con VMIX no alteró la proporción de animales con incorporación del injerto hematopoyético humano satisfactoria (A) o el nivel de esta incorporación del injerto en médula ósea de ratones (B). Los ratones irradiados trasplantados con 1x10<sup>7</sup> médula ósea agotada en CD34 presentaron niveles globales más bajos de incorporación del injerto y esta incorporación del injerto se redujo significativamente por el tratamiento de VMIX *ex vivo* (C). Los ratones irradiados trasplantados con 1x10<sup>5</sup> células CD34<sup>+</sup> seleccionadas mostraron niveles de incorporación del injerto humano similares a aquellos observados en ratones trasplantados con MO completa. Los niveles de incorporación del injerto no estuvieron afectados por el tratamiento de VMIX *ex vivo* (D). Se determinó la significancia usando la prueba de la t de Student (P < 0,05). N.S = no significativa. Se irradiaron subletalmente ratones NSG y luego se trasplantaron con 5x10<sup>6</sup> células mononucleares de sangre periférica (CMSP) enriquecidas en Ficoll. Los ratones se pesaron dos veces por semana para monitorizar la condición corporal (E) y se sacrificaron o bien seis semanas después del trasplante o cuando su puntuación de condición corporal midió 2 (F). Se determinaron diferencias significativas en la supervivencia usando la prueba del orden logarítmico (P < 0,05).

65

FIG. 3: VMIX infecta un subconjunto de linfocitos T CD3<sup>+</sup> humanos primarios. Para determinar si VMIX podría infectar linfocitos T CD3<sup>+</sup> encontrados en MO, se trataron 1x10<sup>6</sup> células de MO completa con vMIX-GFP a una multiplicidad de infección (MOI)=10. Veinticuatro horas después de la exposición a VMIX, las células se tiñeron con

anticuerpos contra o bien CD3 o bien CD34 y se determinaron los niveles de células GFP+ en cada población usando citometría de flujo (A). Para determinar la variación en la infección de linfocitos CD3<sup>+</sup> entre diversos donantes de médula ósea, se infectaron 21 muestras de médula ósea distintas y se analizaron como antes. El porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup> que presentó expresión de GFP+ osciló del 1 % - 47 % (B). Para determinar si VMIX inhibió la expansión de linfocitos T tras la alo-estimulación, se incubaron células de MO tratadas con VMIX tratado con control durante 10 días con células nodrizas irradiadas incompatibles con antígeno leucocitario humano (HLA). La MO tratada con control estimulada con células nodrizas irradiadas mostró números significativamente elevados de células viables mientras que la MO tratada con VMIX no (C). Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

FIG. 4: El desarrollo de EICH se observa coherentemente entre donantes de médula ósea. Se irradiaron subletalmente ratones NSG y luego se trasplantaron con  $1 \times 10^7$  células MO de tres donantes diferentes (A). Los ratones se pesaron dos veces por semana para monitorizar la condición corporal y se sacrificaron o bien seis semanas después de la inyección o cuando alcanzaron una puntuación de condición corporal de 2. Se determinaron diferencias significativas en la supervivencia usando la prueba del orden logarítmico ( $P < 0,05$ ). Después de la autopsia, se extrajeron los órganos, se fijaron en formalina, se seccionaron y se tiñeron para la presencia de linfocitos CD3<sup>+</sup> humanos (B). Las imágenes de inmunohistoquímica mostradas son representativas de los resultados observados en cinco ratones separados.

FIG. 5: Ratones inyectados con células CD34<sup>+</sup> o médula ósea agotada en CD34<sup>+</sup> muestran la incorporación del injerto de distintos linajes linfocíticos. Se irradiaron subletalmente ratones NSG y luego se trasplantaron con o bien  $1 \times 10^7$  médula ósea agotada en CD34<sup>+</sup> o  $1 \times 10^5$  CMPH seleccionadas de CD34<sup>+</sup>. Seis semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y el linaje de células humanas encontrado en la médula ósea se determinó por co-tinción de médula ósea murina extraída con anticuerpos contra HLA-APC, CD3-PE, CD19-FitC, CD15-PERCP. Las células humanas en ratones inyectados con médula ósea agotada en CD34<sup>+</sup> fueron predominantemente células HLA<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD15<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup> (A) mientras que las células humanas en ratones inyectados con células seleccionadas de CD34<sup>+</sup> fueron predominantemente células HLA<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD15<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup> (B).

FIG. 6: El tratamiento de VMIX inhibe la expansión de linfocitos T. Para determinar si VMIX inhibió la expansión de linfocitos T de donante normales tras la alo-estimulación, se incubó MO tratada con VMIX tratado con control durante 10 días con células nodrizas irradiadas incompatibles con HLA. La MO tratada con control estimulada con células nodrizas irradiadas demostró un número significativamente elevado de células viables mientras que la MO tratada con VMIX no. Este efecto fue coherente a través de tres donantes de médula ósea separados.

FIG. 7: GFP que expresa virus del mixoma infecta selectivamente un subconjunto de linfocitos T primarios en médula ósea normal, pero no linfocitos B CD19<sup>+</sup> o células madre CD34<sup>+</sup>.

#### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han encontrado que el tratamiento de muestras biológicas, tales como células alógenas, con virus del mixoma purga o inhibe la expansión de linfocitos T presente en las muestras biológicas. De esta forma, un injerto alógeno tratado con virus del mixoma previene EICH. Sin el tratamiento con el virus del mixoma descrito en el presente documento, linfocitos T alorreactivos en el injerto pueden producir daño a varios órganos vitales, que incluyen el hígado, intestinos, piel y pulmones del receptor. Este daño puede oscilar de inflamación leve a destrucción de la mucosa del intestino a exfoliación mortal de células diana. La inflamación normalmente se presenta como fiebre, dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, hemorragia intestinal e ictericia.

La presente invención proporciona un método *ex vivo* de inhibición de la proliferación de linfocitos T en un injerto que comprende poner en contacto el injerto con una cantidad de virus del mixoma eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en el injerto, como se define en la reivindicación 1.

Como se usa en el presente documento, los términos "muestra biológica" o "muestra" se refieren a un material biológico que se aísla de su entorno natural. La muestra puede comprender una muestra de tejido, una muestra de fluido biológico (por ejemplo, sangre, plasma), o una muestra de células, por ejemplo, una muestra de células hematopoyéticas. La muestra puede obtenerse de un donante individual por cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, un banco de tejidos, u otra fuente antes del trasplante en un sujeto hospedador receptor.

Como se usa en el presente documento, el término "poner en contacto" se refiere a e incluye cualquier método de exponer o poner una muestra biológica al virus del mixoma.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" significa una cantidad eficaz a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad injerto contra huésped" o "EICH" se refiere a la reacción patológica que se produce entre el tejido injertado y el hospedador-receptor. La enfermedad injerto contra huésped (EICH) frecuentemente ocurre tras el trasplante de células hematopoyéticas y de órganos sólidos. En la

EICH, linfocitos T alorreactivos reconocen los tejidos del receptor como extraños. Así, atacan y organizan una respuesta inflamatoria y destructiva contra el receptor. La EICH tiene una predilección por tejidos epiteliales, especialmente piel, hígado y mucosa del tubo gastrointestinal. La propia EICH es un estado profundamente inmunodeprimido estado dado que el sistema inmunitario participa en una respuesta aloinmunitaria a gran escala. Además, los sujetos con EICH son frecuentemente tratados con poderosos agentes inmunosupresores, que los hace así incluso más susceptibles a agentes infecciosos oportunistas.

Como se usa en el presente documento, el término "injerto" se refiere a una muestra, por ejemplo, una muestra de células hematopoyéticas, que se introduce en un sujeto como se define en el presente documento. El injerto puede ser un injerto alógeno o un injerto autólogo.

Como se usa en el presente documento, el término "célula hematopoyética", como se usa en el presente documento, significa cualquier tipo de célula del sistema hematopoyético, que incluye, pero no se limita a, células no diferenciadas tales como células madre y células progenitoras hematopoyéticas (CMPH), y células diferenciadas tales como megacariocitos, plaquetas, eritrocitos, leucocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y linfocitos citolíticos espontáneos (NK).

Como se usa en el presente documento, el término "trasplante de célula hematopoyéticas" incluye y se refiere a sangre y trasplante de médula ósea, trasplante de células madre de sangre periférica, infusión de células de donante, trasplante de sangre del cordón umbilical, o cualquier otra fuente de células madre hematopoyéticas multipotentes.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto hospedador" o "sujeto" se refiere a cualquier miembro individual del reino animal, que incluye seres humanos. En una realización, el sujeto es cualquier mamífero que va a, o ha recibido, un injerto como se describe en el presente documento. Un sujeto mamífero puede incluir, pero no se limita a, seres humanos, monos, caballos, cerdos, vacas, perros, gatos, ratas y ratones. En una realización específica, los métodos de la presente invención se emplean para tratar un sujeto humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "inmunodeprimido," "sujeto inmunodeprimido" o "individuo inmunodeprimido" se refieren a un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas debido a que el sistema inmunitario del sujeto no está funcionando a capacidad óptima. En una realización, el sujeto está inmunodeprimido debido a una pauta de tratamiento diseñada para tratar una enfermedad subyacente y/o prevenir el rechazo de un injerto, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibir la proliferación de linfocitos T" se refiere a la purga o deleción de linfocitos T de la muestra biológica del sujeto y/o a la inhibición de la proliferación de linfocitos T en la muestra biológica.

Como se usa en el presente documento, el término "patógeno distinto de virus" significa que el virus, por ejemplo, virus del mixoma, no es patógeno a un sujeto de interés. En otras palabras, el virus del mixoma no produce enfermedad en el sujeto.

Como se usa en el presente documento, los términos "previenen" o "prevenir" se refiere a detener, retrasar y/o reducir la gravedad de los síntomas asociados a EICH.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratan" o "tratar" se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, reducción del grado de enfermedad, por ejemplo, EICH, estabilización del estado de enfermedad, prevención del desarrollo de la enfermedad, prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la aparición de enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratar" también puede significar prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento. Además, "tratar" también puede significar inhibir la progresión de la enfermedad, ralentizar la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferentemente, puede incluir detener la progresión de la enfermedad permanentemente. Como será entendido por un experto en la materia, los resultados pueden no ser beneficiosos o deseables si, aunque se mejora un estado de enfermedad específico, el tratamiento produce efectos adversos en el sujeto tratado que pesan más que cualquier beneficio producido por el tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "trasplantar", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier órgano o tejido del cuerpo que ha sido transferido de su sitio de origen a un sitio de receptor, o el acto de hacerlo. El término "trasplantar" incluye, pero no se limita a, transferir mediante inyección, administración tópica y/o llenado.

Se desvela en el presente documento un método de tratamiento o prevención de EICH en un sujeto que recibe un injerto que comprende células hematopoyéticas. El método comprende poner en contacto el injerto *ex vivo* con una

cantidad de un virus del mixoma eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en el injerto y para tratar o prevenir la EICH en el sujeto tras el trasplante del injerto en el sujeto. Además, el método comprende, después de poner en contacto el injerto con el virus del mixoma, trasplantar el injerto tratado con virus en el sujeto. El trasplante puede comprender cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, tal como trasplante de células hematopoyéticas alógenas, una infusión de células de donante, y una transfusión de hemoderivados complementarios. En una realización, la infusión se hace como un trasplante haploideéntico.

Se desvela en el presente documento un método de inhibición de la proliferación de linfocitos T en una muestra biológica. El método comprende poner en contacto la muestra biológica con una cantidad de virus del mixoma eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en la muestra biológica. En una realización, el virus del mixoma actúa inhibiendo la proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> de la muestra biológica o injerto.

La muestra biológica que comprende las células hematopoyéticas puede obtenerse de un sujeto mediante cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, biopsia y aspiración. Por ejemplo, pueden recogerse células hematopoyéticas por aféresis de pacientes con o sin movilización de citocinas. Normalmente, la muestra biológica se mantiene a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C durante un periodo de 30-120 minutos, y preferentemente 60 minutos para estabilizar la muestra antes de introducir el poxvirus a la muestra. Una vez tratado con los poxvirus no patógenos de la presente invención, las células hematopoyéticas tratadas pueden ser devueltas o administradas al paciente usando cualquier técnica conocida conocida en la técnica. Por ejemplo, pueden reinfundirse las células mediante administración intravascular o directamente de nuevo a la circulación sistémica del paciente.

También se desvela una población de células que comprende una pluralidad de células hematopoyéticas tratadas con una cantidad de un virus del mixoma.

El virus del mixoma usado en el presente documento puede ser cualquier virus que pertenece a la especie *Leporipoxvirus* de los poxvirus. El virus del mixoma puede ser una cepa natural del virus del mixoma o puede ser una cepa genéticamente modificada de virus del mixoma. El virus del mixoma puede prepararse y formularse según cualquier método conocido y formulación conocida en la técnica, que incluye como se expone en la solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 2006/026333. Por ejemplo, el virus del mixoma puede prepararse infectando células de conejo cultivadas con la cepa del virus del mixoma que va a usarse, permitiendo que la infección progrese de forma que el virus se replique en las células cultivadas y pueda ser liberado por métodos convencionales conocidos en la técnica para romper la superficie celular y así liberar las partículas de virus para la recogida. Una vez recogido, puede determinarse el título de virus infectando un césped confluyente de células de conejo y realizando un ensayo en placa (véase Mossman et al. (1996) Virology 215:17-30). Es importante tener en cuenta que el tropismo del hospedador del virus del mixoma está altamente restringido a conejos europeos, y es no patógeno para todas las otras especies de vertebrado probados, que incluyen seres humanos (McFadden, 2005). Su genoma no está segmentado y contiene una única molécula de ADN bicatenario lineal, 160.000 nucleótidos de longitud. El genoma tiene un contenido de G-C de ~40% con secuencias terminalmente redundantes que se repiten en ambos extremos.

Cuando se pone en contacto una muestra biológica con el virus del mixoma, un experto en la materia sería fácilmente capaz de determinar la cantidad y duración del tratamiento adecuado para lograr el resultado deseado. En una realización, la muestra biológica es un injerto alógeno y se trata con un virus del mixoma durante un periodo de al menos una hora, por ejemplo tres horas. Además, la muestra biológica puede tratarse con una cantidad eficaz del virus del mixoma, que puede medirse por la multiplicidad de infección (MOI) en la muestra. La MOI es la relación de agentes infecciosos (por ejemplo, fago o virus) con respecto a dianas de infección (por ejemplo, célula). Por ejemplo, cuando se refiere a un grupo de células inoculadas con partículas de virus infecciosas, la MOI es la relación definida por el número de partículas de virus infecciosas depositadas en un pocillo dividido entre el número de células diana presentes en ese pocillo. En una realización, la MOI usada cuando se pone en contacto una muestra, por ejemplo, un injerto alógeno, con el virus del mixoma es aproximadamente 10.

En una realización, el injerto que va a tratarse con el virus del mixoma puede comprender médula ósea o células de sangre periférica huma que tienen una pluralidad de células hematopoyéticas. En una realización particular, el injerto es un injerto alógeno.

Se aprecia además que el tratamiento *ex vivo* del injerto que va a introducirse en un paciente puede realizarse en combinación con otras terapias, que incluyen quimioterapia, radioterapia u otras terapias antivirales. En una realización, el injerto tratado con el virus del mixoma puede trasplantarse en un sujeto en combinación con, o en un modo secuencial con, otros virus oncolíticos, que pueden demostrar especificidad por tipos de células tumorales variables.

También se desvela un método de tratamiento de cáncer en un sujeto. El método comprende poner en contacto un injerto que comprende una pluralidad de células hematopoyéticas con una cantidad de un virus del mixoma *ex vivo* eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en el injerto. Además, el método comprende administrar al sujeto hospedador al menos un tratamiento del grupo que consiste en quimioterapia, bioterapia, inmunosupresión y

radioterapia al sujeto hospedador. A partir de aquí, el método comprende trasplantar el injerto tratado con virus en el sujeto. En una realización, el injerto comprende médula ósea o células de sangre periférica humana.

5 Cánceres y/o células cancerosas a modo de ejemplo tratables por la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, células derivadas de pacientes que tienen tumores malignos hematopoyéticos tales como linfomas, mielomas, leucemias, síndromes mielodisplásicos, neuroblastoma, sarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer cerebral, cáncer de ovario y cáncer gástrico. En una realización, los métodos descritos en el presente documento se usan con sujetos que tienen un tumor maligno hematológico. El tumor maligno hematológico puede ser una leucemia, un síndrome mielodisplásico, un linfoma, o un mieloma. En una realización particular, el cáncer es uno de leucemia mieloide aguda (LMA) o mieloma múltiple (MM). En una realización, el cáncer es cáncer resistente al tratamiento, por ejemplo, un cáncer que no responde al tratamiento o se ha vuelto resistente al tratamiento.

15 En los métodos descritos en el presente documento, puede usarse cualquier técnica adecuada para quimioterapia, bioterapia, inmunosupresión y radioterapia conocida en la técnica. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente que presente un efecto oncolítico contra células cancerosas o células neoplásicas del sujeto. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser, sin limitación, una antraciclina, un agente alquilante, un sulfonato de alquilo, una aziridina, una etilenimina, una metilamina, una mostaza nitrogenada, una nitrosourea, un antibiótico, un antimetabolito, un análogo de ácido fólico, un análogo de purina, un análogo de pirimidina, una enzima, una podofilotoxina, un agente que contiene platino o una citocina. Preferentemente, el agente quimioterapéutico es uno que se sabe que es eficaz contra el tipo particular de célula que es cancerosa o neoplásica. En una divulgación, el agente quimioterapéutico es eficaz en el tratamiento de tumores malignos hematopoyéticos, tales como tiotepa, compuestos basados en cisplatino y ciclofosfamida. Las citocinas incluirían interferones, G-CSF, eritropoyetina, GM-CSF, interleucinas, hormona paratiroidea, y similares. Las bioterapias incluyen rituximab, bevacizumab, agentes de interrupción vascular, lenalidomida, y similares. Los radiosensibilizadores incluyen nicotinamida, y similares.

30 Aunque los aspectos de la presente divulgación se refieren al tratamiento *ex vivo* de una muestra biológica, por ejemplo, injerto, se aprecia que el virus del mixoma también puede administrarse a un sujeto *in vivo* como se exponen en la solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 20090317362 a McFadden et al. Con el uso *in vivo*, el virus del mixoma puede formularse como un componente en una composición farmacéutica. Se entiende que las composiciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes y diversos vehículos compatibles. Para todas las formas de administración, el virus del mixoma puede formularse en una solución salina fisiológica. Las composiciones farmacéuticas pueden contener además otros agentes terapéuticos, tales como agentes antineoplásicos. En diversas realizaciones, las composiciones incluyen agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes bioterapéuticos, y radiosensibilizadores.

40 Se aprecia además que los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar trastornos no malignos caracterizados por linfocitos T patógenos y/o auto-reactivos, tales como trastornos autoinmunitarios. Así, también se desvela un método de tratamiento de un trastorno autoinmunitario mediado por linfocitos T. El método comprende poner en contacto un injerto que comprende una pluralidad de células hematopoyéticas con una cantidad de un virus del mixoma *ex vivo* eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en el injerto. Además, el método comprende además trasplantar el injerto tratado con virus en el sujeto. De esta forma, el método tiene el potencial de ser usado para suprimir y/o inhibir linfocitos T auto-reactivos patógenos que producen trastornos autoinmunitarios, tales como esclerosis múltiple.

50 El (Los) siguiente(s) ejemplo(s) están previstos con el fin de ilustración de la presente invención. Sin embargo, el alcance de la presente invención debe definirse como las reivindicaciones adjuntas a la misma, y el (los) siguiente(s) ejemplo(s) no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

En el siguiente ejemplo, se usaron los siguientes materiales y métodos.

55 Células humanas normales: Se obtuvieron células de aspirado de médula ósea humana normal frescas y células mononucleares de sangre periférica de Lonza. Las células mononucleares de médula ósea se enriquecieron entonces en un gradiente de Ficoll usando un dispositivo clínico Sepax (Biosafe Inc.) según recomendaciones del fabricante.

60 Virus del mixoma e infecciones virales: Todas las infecciones virales se llevaron a cabo incubando células con vMIX-GFP, una construcción de VMIX que expresa eGFP en una localización intergénica en el genoma viral de un promotor sintético viral temprano/tardío (21). Esta construcción permite que las fases tempranas de replicación viral sean detectadas basándose en la expresión de GFP dentro de células de prueba. Se expusieron células de la médula ósea humanas a vMIX-GFP a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante 3 horas en PBS + 10 % de FBS en una cámara humidificada a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se incubaron células tratadas con control en PBS más 10 % de FBS que no contenía virus en las mismas condiciones de incubación.

Xenoinjertos de células madre: Para estudios de EICH, se irradiaron subletalmente ratones NOD/Scid/IL2Rγ<sup>-/-</sup> (NSG) usando 200 cGy de irradiación corporal total de una fuente de Cs<sup>137</sup>. En el plazo de veinticuatro horas después de la irradiación, los ratones se inyectaron a través de la vena de la cola con 1x10<sup>6</sup> - 10x10<sup>6</sup> células que habían sido o bien tratadas con control, tratadas, o bien puestas en contacto con vMIX-GFP. Se administraron antibióticos profilácticos en el agua de beber durante dos semanas después del trasplante para prevenir infección bacteriana oportunista. Seis semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y se recogió médula ósea. Se cuantificó la incorporación del injerto de células madre humanas usando citometría de flujo (BD FACSCalibur) para células CD45<sup>+</sup> y HLA-A,B,C<sup>+</sup> humanas. Los ratones se puntuaron como injertados si la citometría de flujo confirmó las poblaciones de células presentes en la médula ósea que fueron CD45<sup>+</sup>/HLA-A,B,C<sup>+</sup> dobles positivas humanas. El número de células CD45<sup>+</sup>/HLA-A,B,C<sup>+</sup> en cada muestra de médula ósea se presenta como el nivel de incorporación del injerto. Se determinó el análisis del linaje de células injertadas por co-tinción de médula ósea murina extraída con los siguientes anticuerpos: HLA-APC, CD3-PE, CD19-FitC, CD15-PERCP.

Inmunohistoquímica: Se llevaron a cabo análisis de infiltración de células humanas en tejidos periféricos murinos eliminando quirúrgicamente seis tejidos después de la autopsia: pulmón, hígado, riñón, bazo, piel e intestino. Los tejidos se fijaron en 10 % de formalina tamponada con PBS durante 24 horas y luego se lavaron en 70 % de EtOH durante 24 horas adicionales. Se cortaron secciones de cinco micrómetros de bloques incorporados en parafina fijados en formalina y se recogieron sobre portaobjetos cargados Plus (Fisher Scientific). Los portaobjetos se desparafinaron y se rehidrataron mediante una serie de xilenos y alcoholes graduados y se bloquearon en 3 % de peróxido/metanol durante 10 minutos a TA. La recuperación de antígeno mediada por calor se realizó en tampón citrato a pH 6,0 durante 25 minutos. Esto fue inmediatamente seguido de bloqueo con suero de cabra normal y avidina/biotina usando un kit comercialmente disponible (Vector Labs). Se aplicó anti-CD3 de conejo a las secciones a 1:100 durante la noche a 4 °C. La tinción se completó usando un kit ABC-Elite (Vector Laboratories). Se observó el complejo antígeno-anticuerpo mediante reacción con DAB (Vector Labs) y los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina antes de cubrir con cubreobjetos.

Clasificación de células por activación magnética: Se fraccionaron células CD3<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup> de aspirados de médula ósea normal purificada en SEPAX usando los kit de separación de microperlas de CD3<sup>+</sup> (Cat. N.º 130-050-101) y CD34<sup>+</sup> (Cat. N.º 130-046-702) de Miltenyi Biotec según las recomendaciones del fabricante. Las células se separaron entonces en un separador autoMACS Pro (Miltenyi Biotec) según recomendaciones del fabricante. La pureza relativa de cada población fraccionada se confirmó después de la separación usando citometría de flujo. Se determinó el número total de células fraccionadas después de la separación usando un hemocitómetro.

Ensayos de reacción de linfocitos mixtos: Se sembraron 1x10<sup>6</sup> células de MOn purificadas en SEPAX por triplicado en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las células se irradiaron entonces usando 1000 cGy de una fuente de Cs<sup>137</sup> para crear células nodrizas incompetentes en la replicación. Células MOn purificadas en SEPAX de un segundo donante incompatible de HLA fueron o bien tratadas con control o bien se trataron con VMIX y luego se sembraron 1x10<sup>6</sup> células por triplicado en pocillos vacíos o pocillos que contenían células nodrizas irradiadas. En los momentos de tiempo indicados, se determinó el número total de células viables en cada pocillo usando un ensayo de MTT comercial (Pierce) según las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico: Se determinaron diferencias estadísticas entre diferentes grupos experimentales por orden logarítmico y prueba de la t de Student. Los valores informados representan la media más o menos el error estándar de la media. Un valor de *P* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Como se expone anteriormente, la EICH es una complicación clínica potencialmente letal que surge de la transferencia de linfocitos T alorreactivos a pacientes inmunodeprimidos. A pesar de los métodos convencionales de agotamiento de linfocitos T, la EICH sigue siendo un reto importante en el trasplante de células hematopoyéticas alogénas. En los siguientes ejemplos, los inventores demuestran un novedoso método para prevenir EICH por tratamiento *ex vivo* de células hematopoyéticas humanas primarias con virus del mixoma (VMIX). VMIX es conocido por tener estrecha especificidad de hospedador por el conejo europeo, y no por otras especies como ratones y seres humanos. Los presentes inventores han encontrado que el tratamiento con VMIX de células humanas de médula ósea y mononucleares de sangre periférica, por ejemplo, no inhibieron la incorporación del injerto hematopoyético humano en ratones inmunodeprimidos; más bien, la exposición *ex vivo* del virus del mixoma a injertos humanos aumentó la incorporación del injerto hematopoyético humano y aumentó la supervivencia después del trasplante eliminando la enfermedad injerto contra huésped. El examen de los órganos importantes mostró evidencia de eliminación de proliferación de linfocitos T humanos. VMIX también sofocó las reacciones de linfocitos mixtos por medio de purga de los linfocitos T alorreactivos. También se observa que ninguno de los ratones profundamente inmunodeprimidos tuvo erupción de VMIX. Los siguientes datos sugieren que la viroterapia *ex vivo* con VMIX es un método simple y eficaz para prevenir EICH tras la infusión de productos hematopoyéticos que posiblemente contienen linfocitos alorreactivos, tales como células madre y progenitoras hematopoyéticas (CMPH) alogénas, infusiones de leucocitos de donante y transfusiones de sangre.

Los presentes inventores han demostrado previamente el uso de VMIX como un novedoso agente oncolítico viral para el tratamiento de una variedad de cánceres humanos, mientras que ahorra tejidos humanos normales (6-8). VMIX tiene varias ventajas como viroterapéutico en seres humanos. Primera, el intervalo de hospedadores naturales

para VMIX está estrictamente limitado a conejos. No se ha documentado ningún ejemplo de infección por VMIX en ninguna especie distinta de conejo, incluso después de la inyección de virus vivos en sujetos humanos y ratones inmunodeprimidos (9, 10). Segunda, VMIX no depende de receptores específicos de la superficie celular para la oncólisis, más bien depende de vías intracelulares únicas tales como AKT para tolerancia. Esta característica permite que VMIX se una eficazmente y purgue una amplia variedad de cánceres humanos. Finalmente, la aplicación terapéutica de VMIX es relativamente poco complicada y rápida, que lo hace un agente atractivo para administración clínica.

Recientemente, los presentes inventores demostraron que el tratamiento *ex vivo* de células hematopoyéticas humanas primarias contaminadas con células de leucemia mieloide aguda (LMA) produjeron la purga del clon leucémico mientras que se ahorran CMPH humanas normales (11). Esta purga selectiva, no dependía de la expresión de ningún transgén, la adición de cualquier agente quimioterapéutico, y solo requirió una breve incubación de la muestra de injerto con VMIX *ex vivo* antes del trasplante en ratones NOD/scid/IL2R(gamma) (NSG) inmunodeprimidos (11).

Durante el transcurso de los experimentos de seguimiento en el uso de VMIX como agente clínico para purgar diversos otros tumores malignos hematológicos humanos que contaminaban los injertos de CMPH, se observó que el 50-70 % de los ratones NSG subletalmente irradiados inyectados con médula ósea (MO) humana sana desarrollaron una enfermedad consuntiva letal 4-6 semanas después del trasplante (FIG. 1A y 1B). Esta enfermedad no se observó en los ratones de control irradiados tratados con control o en ratones inyectados con líneas de células cancerosas establecidas, pero se observó coherentemente tras la inyección de MO obtenida de tres donantes sanos distintos (Tabla 1 y FIG. 4). Esta enfermedad fue reminiscente de la "enfermedad secundaria" descrita por Barnes y Loutit en los años 60 [PMID 13517181], que fue después definida como EICH. De acuerdo con EICH, la histología cadavérica de tejidos periféricos de ratones enfermos reveló edema significativo, además de infiltración de linfocitos T CD3<sup>+</sup> humanos en varios órganos, que incluyen el hígado, intestinos, piel, pulmón, riñón y bazo (FIG. 1C) (FIG. 4).

Inesperadamente, sin embargo, los presentes inventores han encontrado que los ratones inyectados con MO sana que habían sido pretratados *ex vivo* con VMIX sobrevivieron universalmente sin muestras de debilitamiento (FIG. 1A y 1B). Histología cadavérica adicional reveló que los ratones inyectados con médula ósea (MO) tratada con VMIX prácticamente no presentaron infiltración de linfocitos T CD3<sup>+</sup> humanos en ningún órgano importante, por ejemplo, bazo, pulmón, hígado, riñón (véase, por ejemplo, FIG. 1C y FIG. 4). Estos datos soportan la novedosa observación de que el tratamiento *ex vivo* de injertos de células hematopoyéticas humanas alógenas con VMIX puede prevenir EICH y permitir la eficiente incorporación del injerto de CMPH humanas normales.

MO humana primaria contiene linfocitos T CD3<sup>+</sup> y CMPH CD34<sup>+</sup>. Para determinar si VMIX previno el desarrollo de EICH afectando la expansión de linfocitos T de donante o alterando la incorporación del injerto a largo plazo de células madre hematopoyéticas, los presentes inventores usaron enriquecimiento o agotamiento inmunomagnético de linfocitos T CD3<sup>+</sup> o CMPH CD34<sup>+</sup> de MO humana primaria. De acuerdo con el diagnóstico de los presentes inventores de EICH, ratones xenotrasplantados con o bien linfocitos CD3<sup>+</sup> positivamente seleccionados o bien MO agotada de células CD34<sup>+</sup> sucumbieron a EICH con cinética similar a la de los ratones trasplantados con MO no fraccionada (Tabla 1). A diferencia, los ratones trasplantados con MO agotada de linfocitos CD3<sup>+</sup> o CMPH CD34<sup>+</sup> positivamente seleccionadas dejaron de desarrollar EICH (Tabla 1). En todas las cohortes, los ratones NSG trasplantados con células hematopoyéticas humanas pretratadas con VMIX sobrevivieron universalmente y no presentaron evidencia de EICH.

Con evidencia de que VMIX previno la alorreactividad de linfocitos T de donante, se probó a continuación si el tratamiento de VMIX *ex vivo* alteró la incorporación del injerto de CMPH. Específicamente, se usaron modelos de xenotrasplante que recibieron MO completa, CMPH CD34<sup>+</sup> positivamente seleccionadas e injertos agotados en CD34<sup>+</sup>. De acuerdo con observaciones previas (11), el pretratamiento de injertos hematopoyéticos humanos con VMIX no alteró significativamente la proporción de ratones con incorporación del injerto hematopoyético humano seis semanas después del trasplante (FIG. 2A). En ratones trasplantados con MO completa tratada *ex vivo*, hubo una tendencia hacia un porcentaje reducido de incorporación del injerto hematopoyético humano en la médula ósea de ratones. Sin embargo, esta tendencia no alcanzó la significación estadística (FIG. 2B). En ratones trasplantados con CMPH CD34<sup>+</sup> tratadas *ex vivo*, no hubo diferencia en el porcentaje de incorporación del injerto hematopoyético humano (FIG. 2D) y el análisis de linaje reveló incorporación del injerto de multilinaje con desviación de linfocitos B que normalmente se observa en ratones inmunodeprimidos xenotrasplantados (FIG. 5). Ratones trasplantados con MO agotada en CD34<sup>+</sup> también mostraron evidencia de incorporación del injerto de células hematopoyéticas humanas en la médula ósea seis semanas después del trasplante. Sin embargo, como era de esperar, en comparación con las cohortes que recibieron MO completa y CMPH CD34<sup>+</sup>, la cohorte agotada en CD34<sup>+</sup> mostró niveles más bajos de incorporación del injerto (FIG. 2C). El análisis de linaje reveló la incorporación del injerto multilinaje con desviación de linfocitos T (FIG. 6). Estos datos demuestran que el tratamiento de VMIX *ex vivo* de injertos hematopoyéticos humanos no altera la incorporación del injerto de CMPH humanas en receptores inmunodeprimidos.

Los resultados de EICH en ratones NSG después del xenotrasplante de MO humana corrobora un informe reciente que muestra la evidencia de EICH en ratones NSG después del xenotrasplante de mononucleares de sangre

periférica humana (CMSP) (15). Injertos de CMSP inmovilizadas contienen altos niveles de linfocitos T CD3<sup>+</sup> y se usan como tratamiento suplementario de linfocitos T en protocolos de trasplantes haploidenticos e infusiones de leucocitos de donante. Clínicamente, el intento con infusiones de CMSP es provocar el injerto contra leucemia (ICL) y proporcionar inmunidad anti-infección; sin embargo, las infusiones de CMSP alógenas conllevan un alto riesgo de EICH. Dados los resultados de los presentes inventores de virus del mixoma que previene EICH después del trasplante de MO humana en ratones inmunodeprimidos, se probó a continuación si el virus del mixoma previno la EICH asociada a infusiones de CMSP. De acuerdo con hallazgos previamente publicados (15), ratones NSG trasplantados con CMSP humanas mostraron pérdida de peso significativa (FIG. 2E) y sucumbieron a la EICH aproximadamente 40 días después del trasplante (FIG. 2F). A diferencia, los ratones trasplantados con CMSP humanas tratadas *ex vivo* con VMIX sobrevivieron universalmente. Estos ratones tuvieron una pérdida de peso pequeña, pero estadísticamente significativa, sugiriendo que el tratamiento con virus podría solo eliminar parcialmente los linfocitos T potencialmente alorreactivos en este modelo.

Con la evidencia *in vivo* de que VMIX previno la EICH después del trasplante de MO y redujo la EICH después de la infusión de CMSP, se buscó la definición del mecanismo tratando o poniendo en contacto MO humana con VMIX que expresó GFP de un promotor viral temprano/tardío sintético (21). Se observó expresión de GFP, que indica infección de VMIX, en un pequeño subconjunto de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, pero no se encontró en ningún linfocito B CD19<sup>+</sup> o CMPH CD34<sup>+</sup> (FIG. 3A y FIG. 7). Como el tratamiento con VMIX había demostrado ser sorprendentemente coherente en su capacidad para prevenir EICH *in vivo* (FIG. 4), los presentes inventores se sorprendieron de observar que el porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup> que presentaba evidencia de infección de VMIX varió enormemente entre diversas muestras de médula ósea de paciente (FIG. 3B). Así, se probó si el tratamiento con VMIX podría tener un efecto más coherente sobre la expansión de linfocitos T inducida por estimulación de aloantígenos en una reacción de linfocitos mixtos unidireccional. Se encontró que la MO humana tratada con control mostró un aumento significativo en las células viables cuando se añadieron a células nodrizas humanas incompatibles con HLA letalmente irradiadas. A diferencia, el pretratamiento de MO con VMIX previno esta proliferación de MLR (FIG. 3C). Esta observación fue coherente a través de tres diferentes muestras de médula ósea de pacientes (FIG. 6). Estos datos indican que VMIX inhibe coherentemente la expansión de linfocitos T alorreactivos de múltiples donantes primarios aún cuando las tasas de infección por VMIX de linfocitos CD3<sup>+</sup> en estas muestras parezcan ser altamente variables.

Previamente, se demostró que el tratamiento con VMIX prevenía la incorporación del injerto de células madre y progenitoras de LMA humana primaria mientras que ahorra CMPH humanas normales (11). Los datos aquí presentan una aplicación completamente novedosa de VMIX, posiblemente administrada en el entorno donde las células alógenas hematopoyéticas se infunden tales como alo-HCT, infusiones de CMSP y transfusiones de hemoderivados complementarios. Los datos que demuestran la prevención de EICH por el tratamiento con virus del mixoma es el primer informe de una estrategia tal que explota un virus oncolítico replicante intacto para prevenir el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria. Debe observarse que la eliminación de linfocitos T alorreactivos de muestras de alo-HCT es un proceso fundamentalmente similar a la purga de células cancerosas de injertos de células hematopoyéticas autólogas. Ambos se basan en la capacidad del agente de purga (virus del mixoma) para distinguir las células contaminantes (o bien las células cancerosas en injertos autólogos o linfocitos T de donante en injertos alógenos) de las células madre cuya función debe mantenerse (en este caso, células madre hematopoyéticas). Una variedad de virus actualmente en investigación para su uso como agentes oncolíticos han desarrollado diversos métodos para distinguir un tipo de célula de otra. Los datos presentados aquí sugieren que los posibles usos terapéuticos de algunos virus oncolíticos, como VMIX, podrían ser ampliados al tratamiento de enfermedad no maligna tal como trastornos autoinmunitarios mediados por linfocitos T o linfocitos B. Se han intentado previamente diversos métodos de purga de linfocitos, que incluyen separación de células positivas o negativas, además de tratamiento con agentes citotóxicos específicos, para mejorar alo-HCT para el tratamiento de tumores malignos hematológicos. Estos métodos, sin embargo, conllevan altos riesgos de infecciones potencialmente mortales debido a la recuperación inmunológica retardada y fallo del injerto (4, 5). Los datos aquí muestran que el tratamiento con VMIX parece no tener efectos adversos sobre la incorporación del injerto de CMPH normales y, debido a la infección de un subconjunto de linfocitos T CD3<sup>+</sup> alorreactivos, podría todavía permitir la transferencia adoptiva de un subconjunto de linfocitos funcionales para intención antiinfecciosa y anticancerígena inmediata en el receptor. Adicionalmente, el tratamiento con VMIX requiere solo una única etapa de adsorción de virus breve antes de la infusión del injerto que podría realizarse en las actuales condiciones clínicas de la buena práctica de tejidos (GTP) (11). Por tanto, el traducir la observación de que el tratamiento con VMIX previene EICH a un entorno clínico no requeriría la significativa desviación del actual tratamiento habitual para alo-HCT, infusiones de CMSP y transfusiones de sangre.

Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que el mecanismo de la capacidad de VMIX para discriminar linfocitos T alorreactivos de otros subconjuntos de linfocitos T y CMPH y su seguridad para VMIX en términos de incorporación del injerto hematopoyético humano podría basarse en un fallo de VMIX para unirse a CMPH CD34<sup>+</sup> humanas normales. Debido a la naturaleza extremadamente amplia de la unión de poxvirus para la mayoría de las células de mamífero (18), esto sugiere que VMIX podría ser un agente eficaz para suprimir funcionalmente una amplia variedad de células distintas de madre de injerto hematopoyético que incluyen linfocitos T de donante, además de células cancerosas contaminantes de una amplia variedad de tumores malignos hematopoyéticos. De forma interesante, en el actual estudio, los presentes inventores observaron que mientras que solo un pequeño

subconjunto de linfocitos T CD3<sup>+</sup> se infectaron por VMIX, el virus suprimió completamente la EICH en cada xenotrasplante. Esta infección selectiva podría permitir que VMIX inhibiera EICH, aunque todavía permite la transferencia adoptiva de algunos linfocitos T funcionales en el receptor de alo-HCT, proporcionando así la beneficiosa inmunidad antimicrobiana y anticancerígena (19). Considerando que VMIX puede provocar actividad oncolítica simplemente por unión y no infectando necesariamente células cancerosas (20), también es posible que VMIX pueda prevenir la EICH inhibiendo simplemente la expansión después del trasplante de una subpoblación selectiva de linfocitos CD3<sup>+</sup> en ausencia de una infección por virus completamente productiva. En cualquier caso, la viroterapia con VMIX *ex vivo* antes de la infusión de células alógenas hematopoyéticas ofrece no solo la esperanza de prevenir la aparición de EICH y reducir los riesgos de enfermedad grave, sino que también permite la oportunidad de trasplantar injertos alógenos con mayor disparidad de HLA tales como aquellos de donantes no emparentados incompatibles y donantes haploidénticos, abriendo así el alo-HCT a un mayor número de pacientes.

Aunque se han mostrado y descrito diversas realizaciones de la presente invención en el presente documento, será obvio que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo. Pueden hacerse numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención en el presente documento. Por consiguiente, se pretende que la invención esté limitada solo por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## Referencias

1. S. W. Choi, J. E. Levine, J. L. Ferrara, *Immunol Allergy Clin North Am* **30**, 75 (Febrero).
2. B. R. Blazar, R. Korngold, D. A. Vallera, *Immunol Rev* **157**, 79 (Junio de 1997).
3. S. Paczesny, S. W. Choi, J. L. Ferrara, *Curr Opin Hematol* **16**, 427 (Noviembre de 2009).
4. P. J. Martin et al., *Bone Marrow Transplant* **3**, 445 (Septiembre de 1988).
5. M. Delain et al., *Leuk Lymphoma* **11**, 359 (Noviembre de 1993).
6. M. M. Stanford et al., *Mol Ther* **16**, 52 (Enero de 2008).
7. Y. Woo et al., *Ann Surg Oncol* **15**, 2329 (Agosto de 2008).
8. X. Q. Lun et al., *Cancer Res* **67**, 8818 (15 de Septiembre de 2007).
9. F. Fenner, F. N. Ratcliffe, *Myxomatosis*. (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1965).
10. M. M. Stanford, G. McFadden, *Expert Opin Biol Ther* **7**, 1415 (Septiembre de 2007).
11. M. Kim et al., *Leukemia* **23**, 2313 (Diciembre de 2009).
12. A. Gratwohl et al., *Bone Marrow Transplant* **41**, 687 (Abril de 2008).
13. D. Gallardo et al., *Haematologica* **94**, 1282 (Septiembre de 2009).
14. J. Tanaka, *Rinsho Ketsueki* **43**, 442 (Junio de 2002).
15. R. Ito et al., *Transplantation* **87**, 1654 (15 de Junio de 2009).
16. R. K. Burt et al., *J Autoimmun* **30**, 116 (Mayo de 2008).
17. C. Annaloro, F. Onida, G. Lambertenghi Dellilieri, *Expert Rev Hematol* **2**, 699 (Diciembre de 2009).
18. B. Moss, in *Fields Virology*, D. M. K. a. P. M. Howley, Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins, New York 2007), vol. **2**, pp. p. 2849-2855.
19. J. W. Hiemenz, *Semin Hematol* **46**, 289 (Julio de 2009).
20. G. Madlambayan et al., *Cancer Res* **Submitted**, (2011).
21. J. B. Johnston et al., *J Virol* **77**, 5877 (Mayo de 2003).
22. Jeklova et al., *Veterinary Microbiology*, vol. **129**, no. 1-2, páginas 117-130 (Mayo de 2008),

Referencia a tampones particulares, medios, reactivos, células, condiciones de cultivo y similares, o a alguna subclase de los mismos, no pretende ser limitante, pero debe interpretarse que incluye todos de tales materiales relacionados que un experto habitual en la materia reconocería como que son de interés o valor en el contexto particular en el que esa discusión se presenta. Por ejemplo, es frecuentemente posible sustituir un sistema de tampón o medio de cultivo por otro, de forma que se use una forma diferente, pero conocida, para lograr los mismos objetivos que aquellos a los que se refiere el uso de un método sugerido, material o composición.

Es importante para un entendimiento de la presente invención tener en cuenta que todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento, a menos que se definan en el presente documento, pretenden tener el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia. Las técnicas empleadas en el presente documento también son aquellas que son conocidas para un experto habitual en la materia, a menos que se establezca de otro modo. Para los fines de facilitar más claramente un entendimiento de la invención como se desvela y reivindica en el presente documento, se proporcionan las siguientes definiciones.

Aunque se han mostrado y descrito varias realizaciones de la presente invención en el presente documento en el presente contexto, tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solo, y no de limitación. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán a aquellos expertos en la materia sin apartarse materialmente de la invención en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención no necesita limitarse al mejor modo desvelado en el presente documento, ya que otras aplicaciones pueden igualmente beneficiarse de las enseñanzas de la presente invención. Por tanto, en las reivindicaciones, oraciones de medios más función y etapa más función pretenden cubrir las estructuras y actos, respectivamente, descritos en el presente documento como que realizan la función citada y no solo equivalentes estructurales o equivalentes de acto, sino también estructuras equivalentes o actos equivalentes, respectivamente. Por consiguiente, todas aquellas modificaciones pretenden estar incluidas

dentro del alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones, según la ley relevante en cuanto a su interpretación.

TABLA 1

	<b>Irradiación</b>	<b>N.º de células trasplantadas</b>	<b>Células CD3+</b>	<b>N</b>	<b>Muertes</b>	<b>Muerte significativa</b>	<b>Días hasta la muerte</b>
Control	No	Ninguna	No	20	0	N/A	N/A
MO	No	1,00E+07	Sí	15	0	NS	N/A
MO + VMIX	No	1,00E+07	Sí	17	0	NS	N/A
Control	Sí	Ninguna	No	13	1	N/A	14+/-0
Células cancerosas	Sí	1,00E+07	No	20	0	NS	N/A
Células cancerosas + VMIX	Sí	1,00E+07	No	20	0	NS	N/A
MO	Sí	1,00E+07	Sí	36	25	p = 0,0001	31,3 +/-3,9
MO + VMIX	Sí	1,00E+07	Sí	36	0	NS	N/A
CD34- MO	Sí	1,00E+07	Sí	10	8	p = 0,0005	41,2 +/-3,4
CD34- MO + VMIX	Sí	1,00E+07	Sí	10	0	NS	N/A
CD34+	Sí	1,00E+05	No	10	0	NS	N/A
CD34+ + VMIX	Sí	1,00E+05	No	10	0	NS	N/A
CD3- MO	Sí	1,00E+07	No	8	0	NS	N/A
CD3- MO + VMIX	Sí	1,00E+07	No	9	0	NS	N/A
CD3+	Sí	1,00E+06	Sí	6	5	p = 0,001	42,6 +/-6,2
CD3+ +VMIX	Sí	1,00E+06	Sí	6	0	NS	N/A
PBMC	Sí	5,00E+06	Sí	5	4	p = 0,002	40,7 +/-0,5
PBMC + VMIX	Sí	5,00E+06	Sí	5	0	NS	N/A

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *ex vivo* para inhibir la proliferación de linfocitos T en un injerto que comprende poner en contacto el injerto con una cantidad de virus del mixoma eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos T en el injerto.

5

2. Método según la reivindicación 1, en el que los linfocitos T comprenden linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el injerto comprende médula ósea o células de sangre periférica humana que tienen una pluralidad de células hematopoyéticas.

10

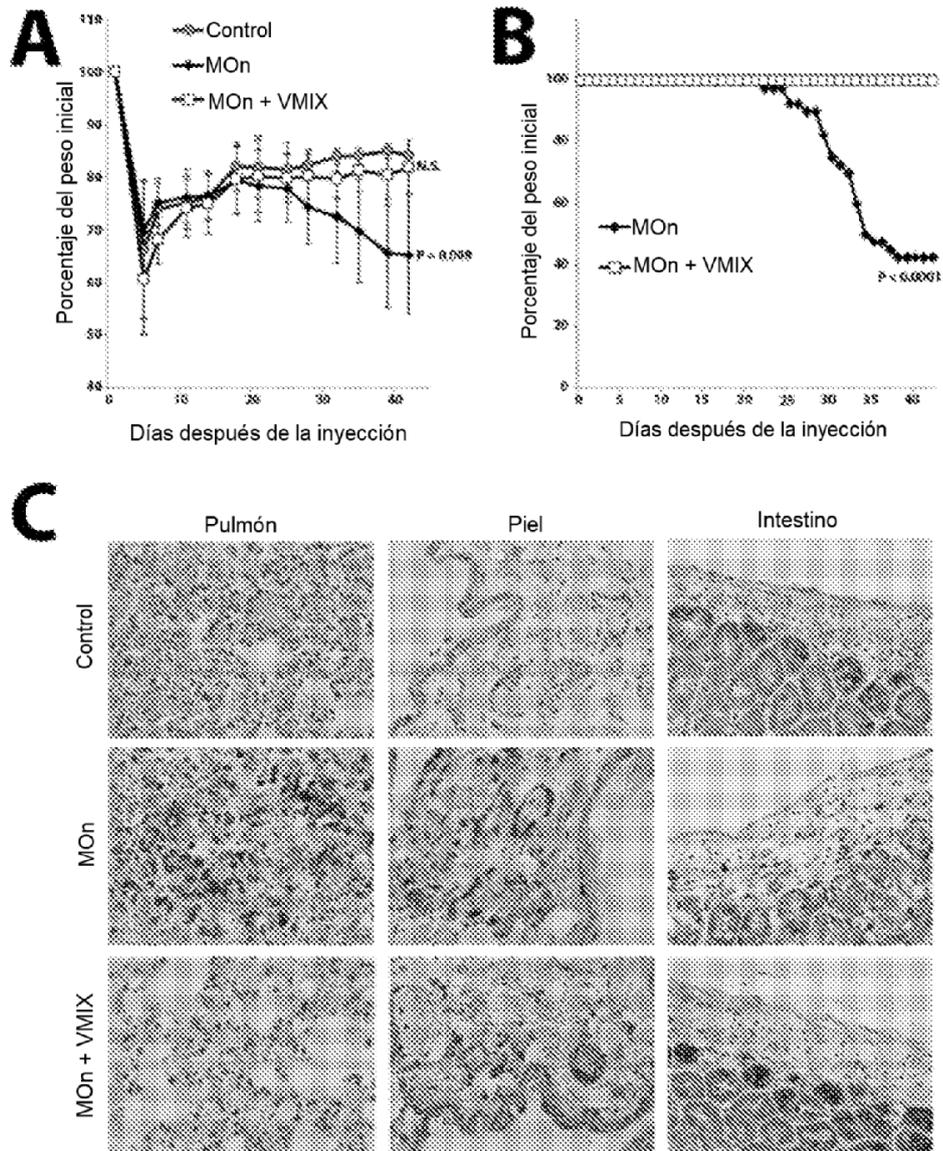


FIG. 1

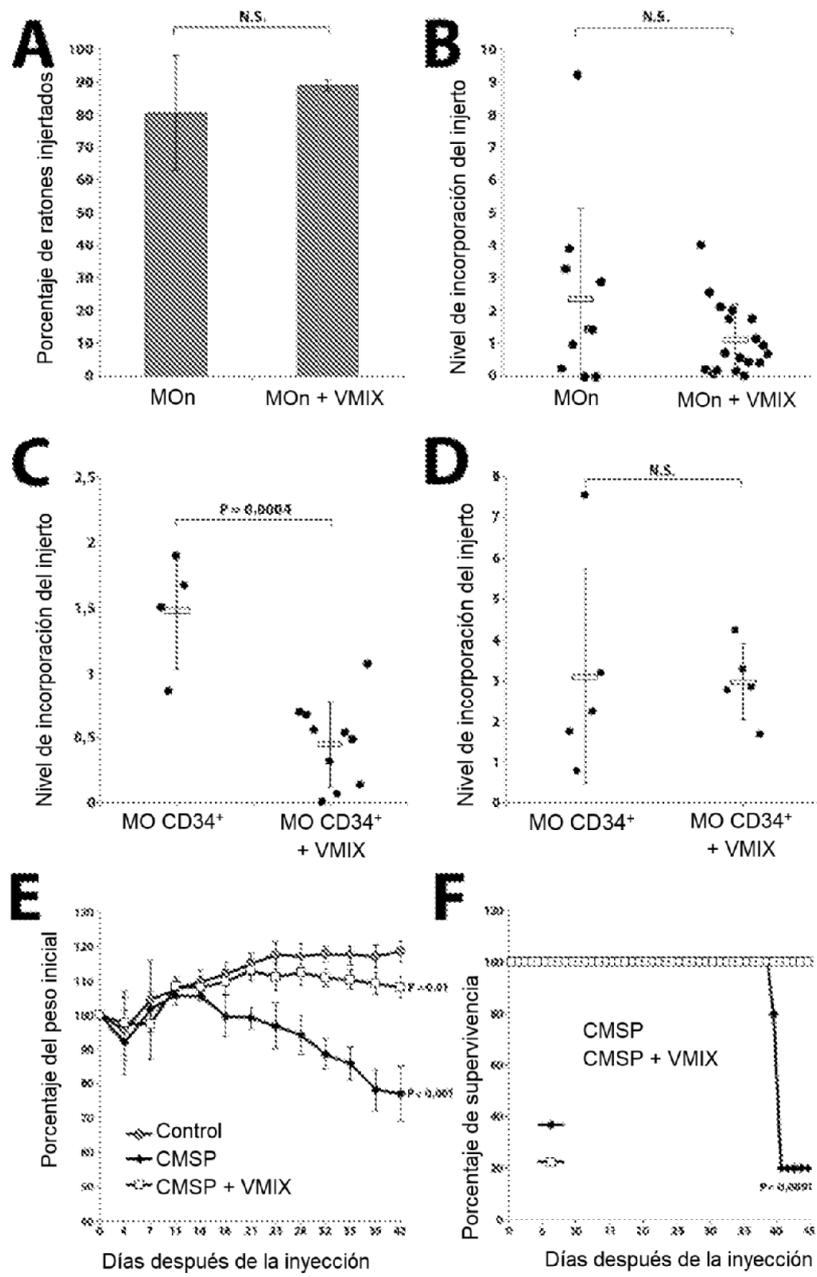


FIG. 2

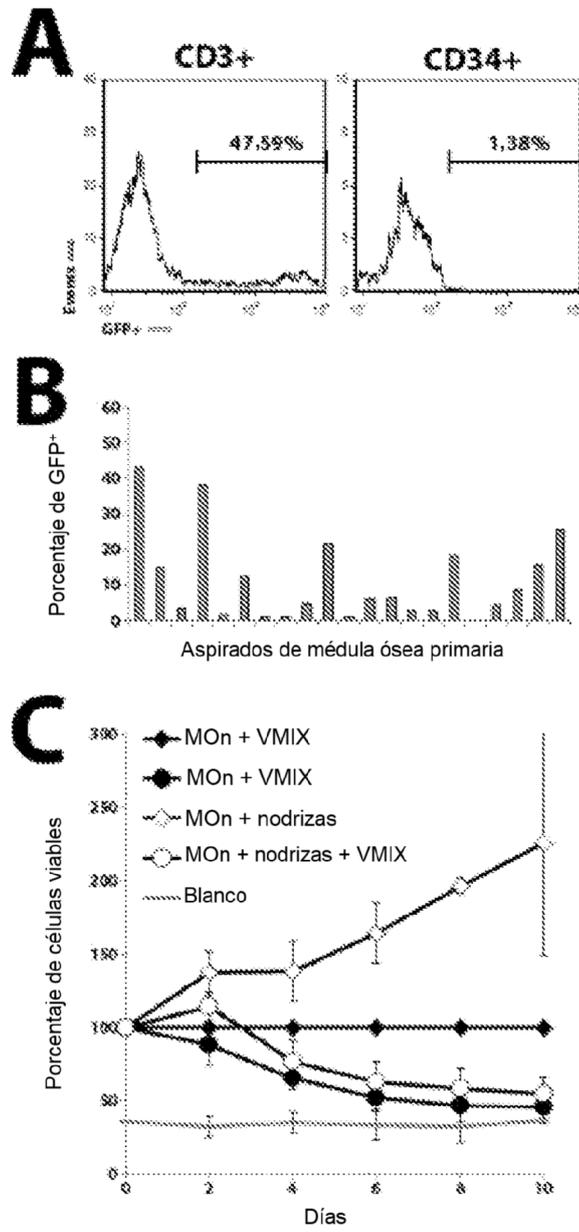


FIG. 3

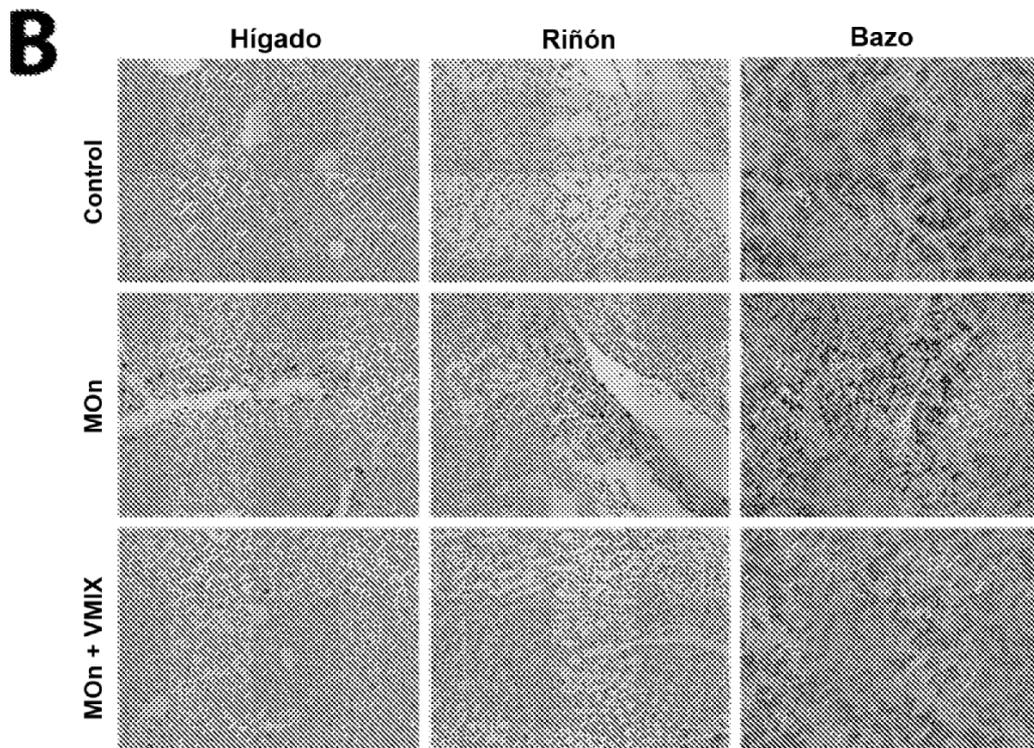
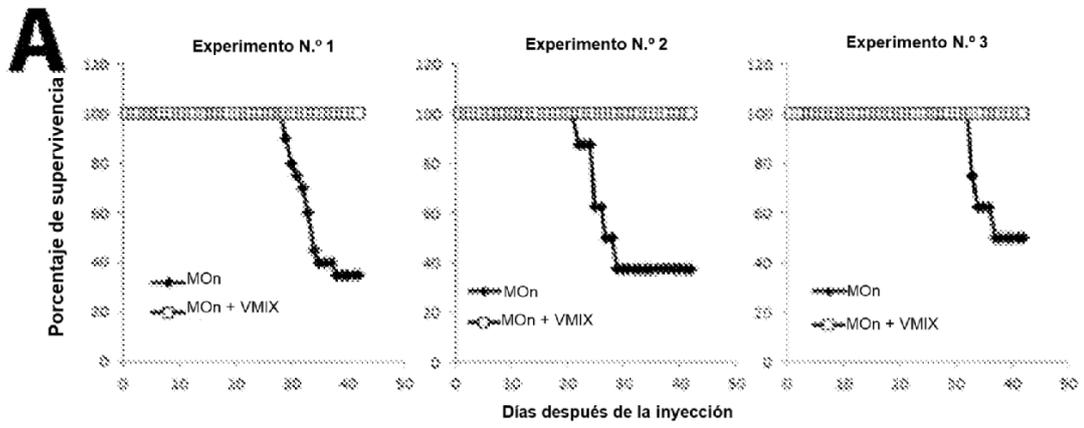


FIG. 4

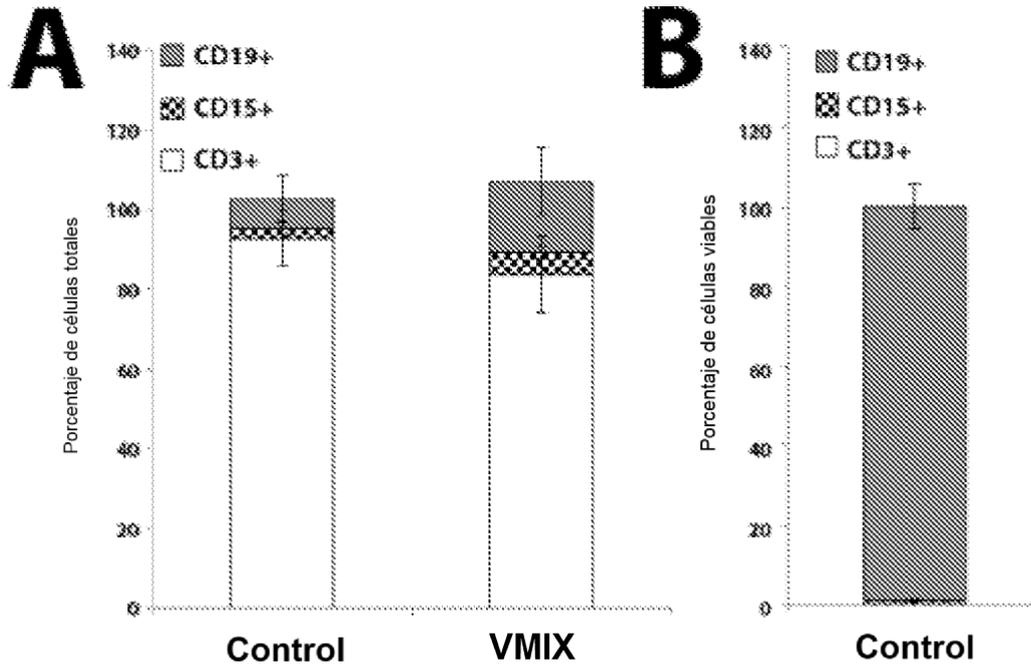


FIG. 5

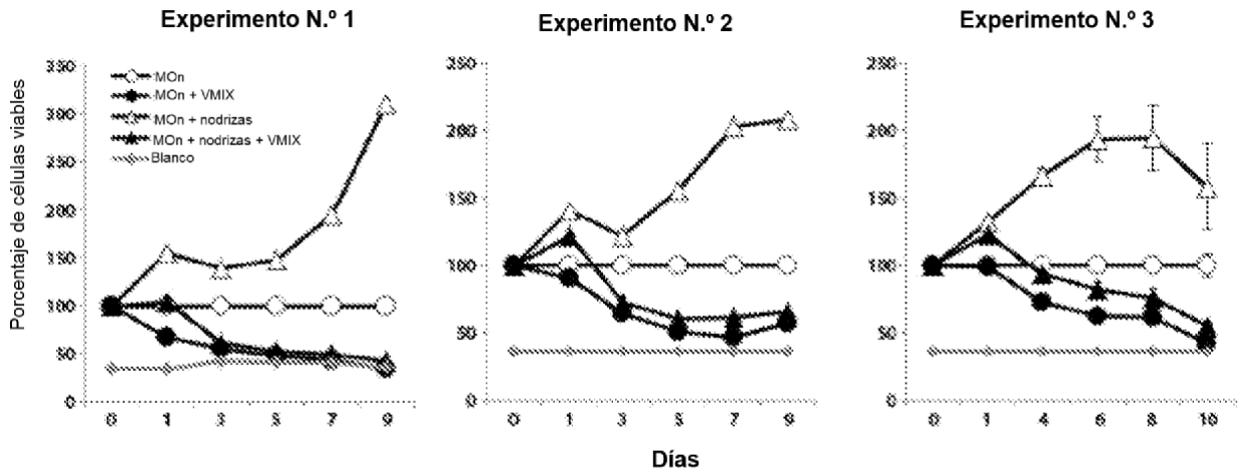


FIG. 6

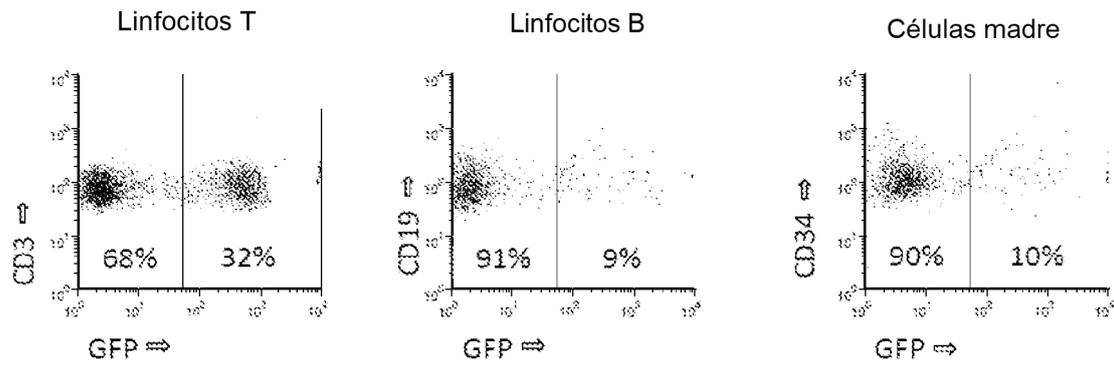


FIG. 7