

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 864 323**

(51) Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 31/675** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/IL2012/050542**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093920**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12859036 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2021 EP 2793914**

---

(54) Título: **Una terapia de combinación para un injerto estable y a largo plazo**

(30) Prioridad:

**22.12.2011 US 201161578917 P**

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

**13.10.2021**

(73) Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95  
76100 Rehovot, IL**

(72) Inventor/es:

**REISNER, YAIR y  
BACHAR-LUSTIG, ESTHER**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 864 323 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

Una terapia de combinación para un injerto estable y a largo plazo

5 Campo y antecedentes de la divulgación

La presente divulgación, en algunos aspectos de la misma, se refiere a una terapia combinada para lograr un trasplante estable de células o tejidos a largo plazo.

10 El uso de donantes haploidénticos no coincidentes con el haplotipo completo como una fuente alternativa para el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) es muy atractivo ya que prácticamente todos los pacientes tienen un familiar haploidéntico fácilmente disponible que puede servir como donante de TCMH. Los primeros intentos de evitar el riesgo fatal de enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) y de aplicar un trasplante de médula ósea rigurosamente haploidéntico con linfocitos T agotados (TDBMT) en pacientes con leucemia desvelaron que la ausencia de linfocitos T donantes en el injerto conduce a una alta tasa de rechazo del injerto, mediado por la radioterapia residual y los linfocitos T derivados del hospedador resistentes a la quimioterapia (HTC). Para superar este obstáculo, se contempló una 'mega dosis' de células TDBM que puede superar esta barrera inmunitaria mediada por HTC e injertarse con éxito incluso cuando se usan combinaciones de cepas murinas completamente incompatibles [Bachar-Lustig E *et al.*, Nat Med. (1995) 1:1268-1273]. Posteriormente, se demostró que en humanos, como en roedores, el escalado de la dosis de células madre hematopoyéticas CD34+ puede usarse para superar las barreras genéticas, permitiendo tasas de supervivencia satisfactorias después de HSCT haploidénticos purificados [Reisner Y y Martelli MF. Immunol Today. (1995) 16:437-440 y la Patente de EE.UU. N.º 5.806.529].

25 Si bien el uso de una 'mega dosis' purificada de HSCT CD34+ ha permitido el trasplante haploidéntico en pacientes con leucemia, un gran inconveniente, común a todos los trasplantes de linfocitos T agotados, es la lenta tasa de recuperación del sistema inmunitario del receptor. Esto se atribuye a los extensos protocolos de acondicionamiento de ablación inmunitaria antes del trasplante, el bajo número de linfocitos T donadores infundidos dentro del injerto y la disminución de la función tímica de los receptores adultos. Por lo tanto, en receptores adultos de un injerto haploidéntico de células madre CD34+, una tasa significativa de mortalidad relacionada con el trasplante (TRM) está provocada por infecciones oportunistas.

30 Se están desarrollando varios enfoques para abordar este desafío. Esto incluye novedosas modalidades para mejorar la función tímica, transferencia adoptiva posterior al trasplante de linfocitos T específicos antivíricos, transferencia de linfocitos T alo-agotados no reactivos para el hospedador parcialmente policlonales o transferencia de linfocitos T completamente policlonales transfectados con genes suicidas inducibles. Un enfoque alternativo y adicional para preservar la inmunidad del hospedador es el uso de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC). Este enfoque no mieloablutivo ahorra un nivel sustancial de células inmunitarias del hospedador y, por lo tanto, puede reducir TRM al mejorar la reconstitución inmunitaria posterior al trasplante y al reducir la toxicidad asociada a los agentes acondicionadores. El trasplante haploidéntico bajo RIC es aún más complejo debido a la barrera inmunológica sustancial presentada por las células T hospedadoras supervivientes. Los intentos recientes de superar esta barrera, en gran parte hicieron uso de injertos sin linfocitos T agotados, que permiten una alta tasa de injerto, pero en la extensión del aumento de las tasas de EICH. Otro enfoque para aplicar el trasplante haploidéntico bajo RIC usa injertos agotados CD3/CD19, que no solo contienen células madre CD34+ sino también progenitores negativos CD34, NK, células facilitadoras de injerto y células dendríticas, sin embargo, esto también está en la extensión de las tasas aumentadas de EICH y TRM.

40 En la década de 1970, George Santos demostró en roedores que un ciclo corto de ciclofosfamida (CY) en dosis altas poco después del trasplante de médula ósea (BMT) se dirigió a los linfocitos T alorreactivos del donante o del hospedador activados [Owens AH Jr y GW. S. Transplantation. (1971) 11:378-382]. Se observó que la ciclofosfamida no es tóxica para las células madre hematopoyéticas debido a su alta expresión de la enzima desintoxicante aldehído deshidrogenasa y Slavin *et al.* demostraron además que la administración de dosis altas de ciclofosfamida puede reducir la EICH y el rechazo del injerto en ratones, sin efectos adversos sobre el injerto de células madre [Brodsky RA y RJ. J. Lancet. (2005) 365:1647-1656]. Las pruebas clínicas de los grupos del John Hopkins and Fred Hutchinson Cancer Research Center, evaluaron un protocolo no mieloablutivo de ciclofosfamida, fludarabina y 2Gy TBI, y profilaxis de EICH posterior al trasplante con ciclofosfamida (50 mg/kg días +3 y +4), MMF (días +5 a +35) y tacrolimus (días +5 a +180) [Luznik L *et al.*, Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. (2008) 14:641]. De acuerdo con lo evidente de sus enseñanzas, este protocolo resultó en una alta tasa de recaída, lo que probablemente se debió a la disminución de la enfermedad por el acondicionamiento no mieloablutivo y a la falta de efecto de injerto contra leucemia (GVL) relacionado con la EICH [Munchel A *et al.*, Pediatric Reports (2011) 3:43-47].

50 Se han intentado enfoques adicionales para lograr un injerto estable de células madre hematopoyéticas alogénicas, algunos se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20110110909, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20050118142, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20070098693, la Patente de EE.UU. N.º 5.876.692, la Patente de EE.UU. N.º 5.514.364, la Patente de EE.UU. N.º 6.217.867, la Patente de EE.UU. N.º 5.635.156, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20060140912, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20040005300, la Solicitud de Patente de

EE.UU. N.º 20070141027, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20030017152, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20030165475 y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20010009663.

5 La Patente de EE.UU. 5.806.529 proporciona un método para el trasplante de médula ósea de una dosis muy grande de células madre con linfocitos T agotados (de un donante no compatible con HLA a un paciente), después de un protocolo de acondicionamiento pre-trasplante que comprende irradiación corporal total (TBI) y agentes mieloablativos e inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida).

10 Bomberger et al., Blood (1988)91(7): 2588-2600 proporciona un protocolo para el trasplante de células madre de linfocitos T agotados que comprende una dosis alta de quimioterapia mieloablativa (por ejemplo, ciclofosfamida) antes del trasplante de las células madre.

#### Sumario de la invención

15 La ciclofosfamida para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que necesite un injerto de células o tejidos no singénicos tratado con una dosis de células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados comprenden menos de  $5 \times 10^5$  células CD3+ por kilogramo de peso corporal de un sujeto y en donde dicha dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal de dicho sujeto, en donde dicha ciclofosfamida ha de administrarse al sujeto 20 después del trasplante de un injerto de células o de tejido en una cantidad terapéuticamente eficaz que comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde además dicho sujeto no está tratado con profilaxis de EICH durante más de 10 días después del trasplante.

Preferentemente, el sujeto es un sujeto acondicionado.

25 Preferentemente, el acondicionamiento de dicho sujeto acondicionado:

30 (I) está bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida que comprende un protocolo de acondicionamiento no mieloablativo, en donde dicho protocolo de acondicionamiento no mieloablativo comprende al menos uno de una irradiación corporal total (TBI), una irradiación linfoide total (TLI), un agente quimioterapéutico y/o una immunoterapia con anticuerpos, y opcionalmente en donde:

35 (i) dicho TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-4 Gy; o  
(ii) dicho agente quimioterapéutico comprende al menos uno de Busulfán, Fludarabina, Melfalán y Tiótepa; o  
(iii) dicho anticuerpo comprende al menos uno de un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo antitimocito globulina (ATG) y un anticuerpo anti-CD3 (OKT3);  
O

40 (II) en donde el sujeto se ha sometido a una reducción en volumen de linfocitos T *in vivo*, en donde dicha reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* se efectúa mediante anticuerpos.

Preferentemente, el sujeto:

45 (i) tiene una enfermedad maligna y opcionalmente en donde dicha enfermedad maligna es un cáncer hematopoyético; o  
(ii) tiene una enfermedad no maligna y opcionalmente en donde dicha enfermedad no maligna es una enfermedad o trastorno genético, una anomalía hematopoyética, una enfermedad autoinmune o un trastorno metabólico.

50 Preferentemente, dicho sujeto necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras

Preferentemente, una dosis de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprende aproximadamente  $5 - 40 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

55 Preferentemente, dicha concentración de dicha ciclofosfamida es de aproximadamente 100 - 200 por kg de peso corporal.

60 Preferentemente, comprende además un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, en donde dicho acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterapéutico y además en donde dicho sujeto necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.

Preferentemente, dicha TBI:

65 (i) comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-4 Gy; o  
(ii) se efectúa en una dosis única 1 o 2 días antes de dicha dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.

Preferentemente, dicho agente quimioterapéutico comprende Fludarabina y opcionalmente en donde dicha Fludarabina se efectúa a una dosis de 30 mg/m<sup>2</sup>/día.

- 5 Preferentemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T:
- (i) se obtienen mediante reducción en volumen de linfocitos T y opcionalmente en donde dicha reducción en volumen de células T se efectúa mediante anticuerpos; o
  - (ii) se obtienen de un donante no singénico.
- 10 Preferentemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras se tratan mediante reducción en volumen de linfocitos B.
- 15 La presente invención también se refiere a ciclofosfamida para su uso para inducir tolerancia específica de donante en dicho sujeto en necesidad de dicho injerto de células o tejido no singénicos.
- 20 Preferentemente, dicho injerto de células o tejidos:
- (i) se selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas inmaduras, un órgano o tejido de hígado, de páncreas, de bazo, de riñón, de corazón, de pulmón, de piel, de intestino y linfoide/hematopoyético; o
  - (ii) comprende un co-trasplante de varios órganos.
- 25 Preferentemente, dicho injerto de células o tejidos y dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen del mismo donante.
- 30 Preferentemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta$  negativas por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 35 Preferentemente, dicha ciclofosfamida ha de administrarse al sujeto en dos dosis 3 y 4 días después del trasplante.
- 40 Preferentemente, cada una de dichas dos dosis comprende una concentración de aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal.
- Breve descripción de los dibujos
- 45 Algunos aspectos de la divulgación se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles que se muestran son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de aspectos de la divulgación. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica aspectos de la divulgación.
- 50 En los dibujos:
- 55 Las FIGURAS 1A-B son gráficos que ilustran el injerto duradero de médula ósea (BM) de un donante no compatible después del trasplante de 'mega dosis' de BM rigurosamente agotada de linfocitos T y ciclofosfamida post-trasplante. Los ratones se acondicionaron con reducción en volumen de linfocitos T (TCD), usando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. Se administraron altas dosis de Ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) en los días +3 y +4 después del trasplante. El quimerismo del tipo de donante se evaluó 35 días (Figura 1A) y 95 días (Figura 1B) después del trasplante.
- 60 Las FIGURAS 2A-C son gráficos de puntos que ilustran un análisis de quimerismo FACS típico. La Figura 2C muestra que se logró quimerismo mixto en receptores que fueron trasplantados con 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM rigurosamente agotada de linfocitos T y se trataron con dosis altas de CY. Por el contrario, los ratones receptores que recibieron solo el protocolo de acondicionamiento (Figura 2A) o que fueron inoculados con solo  $5 \times 10^6$  células de BM y CY no exhibieron quimerismo de tipo donante (Figura 2B).
- 65 La FIGURA 3 es un gráfico que ilustra el quimerismo mixto duradero 180 y 225 días después del trasplante en ratones receptores que fueron trasplantados con 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de células de BM agotadas de linfocitos T y se trataron con dosis altas de CY. Cabe observar que, los ratones que fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  BM agotadas de linfocitos T y CY no exhibieron quimerismo mixto.
- Las FIGURAS 4A-B ilustran el trasplante de tipo donante o injertos de piel de terceros en ratones químéricos. La FIGURA 4A es un injerto que ilustra la aceptación (marcada con "+") o el rechazo (marcado con "-") de injertos de piel del tipo donante (Balb/c) o de terceros (C57BL/6) en receptores de dosis regular ( $5 \times 10^6$ ) o 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada en T, tratada con dosis altas de CY en los días +3 y +4 después del trasplante. La Figura 4B es una fotografía de injerto de piel del tipo donante (Balb/c) (pelaje blanco) o de terceros (C57BL/6) (pelaje negro) en receptores de 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada en T, tratada con dosis altas de CY en los días +3 y +4 después del trasplante.
- La FIGURA 5 es un gráfico que ilustra el efecto de diferentes dosis de irradiación sobre el quimerismo de tipo de

donante en ratones receptores de 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada en T y se trató con dosis altas de CY después del trasplante.

La FIGURA 6 es un gráfico que ilustra el efecto del aumento de dosis de Ciclofosfamida (CY) sobre el quimerismo de tipo de donante en receptores de 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada en T y 2 Gy TBI.

La FIGURA 7 es un gráfico que ilustra el injerto de BM de donante no coincidente logrado mediante la combinación de 'mega dosis' de BM agotada de linfocitos T CD8+ y CY después del trasplante. Cabe observar que, el agotamiento de los linfocitos T CD8+ residuales de la preparación de BM no tuvo ningún impacto adverso en el nivel de quimerismo logrado al combinar la 'mega dosis' de células BM agotadas de linfocitos T con CY posterior al trasplante.

#### 10 Descripción de aspectos específicos de la divulgación

La presente divulgación, en algunos aspectos de la misma, se refiere a una terapia combinada para lograr un trasplante estable de células o tejidos a largo plazo.

15 Los principios y el funcionamiento de la presente divulgación pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

20 Antes de explicar al menos una realización de la divulgación en detalle, ha de comprenderse que la divulgación no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o exemplificados mediante los Ejemplos. La divulgación es susceptible de otros aspectos o de ponerse en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras. También, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son para el fin de descripción y no deberían interpretarse como limitantes.

25 La aplicación del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) se ha visto limitada por la falta de donantes compatibles con HLA disponibles dentro de la familia o en los registros internacionales de donantes voluntarios no relacionados. En cambio, Prácticamente todos los pacientes que necesitan un trasplante tienen un donante familiar con haplotipo completo incompatible.

30 Los principales obstáculos para el trasplante de médula ósea de donantes relacionados con el haplotipo completo no coincidentes fueron la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) y el rechazo del injerto. El uso de un gran número de células madre hematopoyéticas con una mínima contaminación residual de linfocitos T y un régimen inmunosupresor agresivo y mieloablativo ha dado como resultado altas tasas de injerto con EICH poco grave. Sin embargo, la reconstitución inmunitaria se ha retrasado y no completado después de este enfoque y una tasa significativa de mortalidad relacionada con el trasplante (TRM) está provocada por infecciones oportunistas.

35 Mientras se reduce la divulgación actual a la práctica, los presentes inventores han descubierto que puede lograrse un injerto exitoso de médula ósea no coincidente mediante el trasplante de 'mega dosis' de médula ósea rigurosamente agotada de linfocitos T y posteriormente administrar al sujeto una ciclofosfamida de alta dosis poco después del trasplante. Los presentes inventores han demostrado que dicho régimen requiere solo un breve régimen de acondicionamiento inmunomeloablativo. Los presentes inventores han demostrado además que dicho procedimiento de trasplante conduce a un quimerismo largo y estable y que se ha logrado la tolerancia.

40 Como se muestra a continuación y en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han descubierto a través de una laboriosa experimentación que la combinación de 'mega dosis' de trasplante de médula ósea empobrecida de linfocitos T (TDBMT) y ciclofosfamida (CY) de dosis alta después del trasplante permite un injerto duradero de médula ósea de donante no compatible (véanse las Figuras 1A-B y 2A-C). El quimerismo mixto duradero se exhibió durante períodos prolongados de tiempo después del trasplante (180 y 225 días después del trasplante en ratones, véase la Figura 3). De forma importante, la combinación de 'mega dosis' de TDBMT y dosis altas de CY después del trasplante permitió el injerto de células madre hematopoyéticas bajo acondicionamiento de intensidad reducida (véase la Figura 5) y dio como resultado la inducción de tolerancia, como lo indica la aceptación de los injertos de piel del donante (véase la Figura 4B).

45 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita un injerto de células o tejidos no singénicos, comprendiendo el método: (a) trasplantar en un sujeto una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $5 \times 10^5$  linfocitos T CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.

50 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

- Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, hombre o mujer a cualquier edad que necesite un trasplante de células o tejidos. Por lo general, el sujeto necesita un trasplante de células o tejidos (también denominado en el presente documento receptor) debido a un trastorno o una afección, estado, o síndrome patológicos o no deseados o una anormalidad física, morfológica o fisiológica que es susceptible de tratamiento mediante trasplante de células o tejidos.
- De acuerdo con un aspecto el sujeto necesita regeneración de tejidos (tejido sólido o blando) tales como debido al envejecimiento, traumatismo, herida o cualquier afección patológica que dé como resultado la pérdida de la funcionalidad del órgano.
- De acuerdo con un aspecto, el sujeto tiene una enfermedad maligna.
- De acuerdo con un aspecto, la enfermedad maligna es un cáncer hematopoyético.
- Los cánceres hematopoyéticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (T-ALL), leucemia mielocítica aguda (AML), leucemia no linfoblástica aguda (ANLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, Leucemia mielomonocítica juvenil, Linfoma de Hodgkin, Linfoma no Hodgkin, Linfoma extranodal de linfocitos citolíticos naturales/T, Linfoma cutáneo de linfocitos T, Enteropatía tipo linfoma de linfocitos T, Linfoma angioinmunoblastico de linfocitos T, Linfoma anaplásico de células grandes T/células nulas, Linfoma subcutáneo de linfocitos T tipo panículitis, Linfoma de linfocitos T no especificado, Linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL)/leucemia linfocítica crónica (CLL), Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, Linfomas de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar - linfomas de tejido linfocítico asociados a la mucosa, Linfoma folicular, Linfoma de células del manto, Linfoma nodal de la zona marginal de linfocitos B, linfoma de Burkitt, Tricoleucemia, Linfoma primario del sistema nervioso central, Linfoma esplénico de la zona marginal de linfocitos B, Linfoma linfoplasmocítico, linfoma mediastinal primario de linfocitos B, leucemia/linfoma de linfocitos T precursores, Linfoma MALT, Micosis fungoide y mieloma múltiple.
- De acuerdo con un aspecto, el cáncer hematopoyético comprende una leucemia o un linfoma.
- De acuerdo con un aspecto, el sujeto tiene una enfermedad no maligna.
- De acuerdo con un aspecto, la enfermedad no maligna es una enfermedad o trastorno genético, una enfermedad autoinmune o un trastorno metabólico.
- Las enfermedades no malignas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), anemia de células falciformes (anemia de células falciformes), neutropenia congénita, trombocitopenia, anemia aplásica (por ejemplo, anemia aplásica grave), síndrome mielodisplásico, monosomía 7, osteopetrosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, leucodistrofia metacromática, leucodistrofia suprarrenal, talasemia, anormalidad hematopoyética congénita o genéticamente determinada, adenosina desaminasa (ADA), lupus, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, diabetes mellitus de tipo I, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barr, miastenia grave, artritis reumatoide, esclerodermia y psoriasis.
- De acuerdo con un aspecto, el tema de la presente divulgación puede sufrir alguna enfermedad cardiovascular, una enfermedad reumatoide, una enfermedad glandular, una enfermedad gastrointestinal, una enfermedad cutánea, una enfermedad hepática, una enfermedad neurológica, una enfermedad muscular, una enfermedad nefrítica, una enfermedad del tejido conectivo, una enfermedad sistémica y/o una enfermedad relacionada con la reproducción, tratable por trasplante de células o tejidos.
- Como se usa en el presente documento, la frase "injerto de células o tejidos" se refiere a una célula corporal (por ejemplo, una sola célula o un grupo de células) o tejido (por ejemplo, tejidos sólidos o tejidos blandos, que pueden transplantarse en su totalidad o en parte). Los tejidos ejemplares que pueden transplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y tejidos linfoides/hematopoyéticos (por ejemplo, ganglios linfáticos, parches de Peyer, timo o médula ósea). Las células ejemplares que pueden transplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, células hematopoyéticas inmaduras incluyendo células madre. La presente divulgación también contempla el trasplante de órganos completos, tales como, por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas o bazo.
- De acuerdo con un aspecto, el injerto celular o tisular comprende células hematopoyéticas inmaduras.
- De acuerdo con un aspecto, el método se efectúa usando una célula o tejido, que no es singénico con el sujeto. Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse usando un injerto celular o tisular que sea alogénico o xenogénico con el sujeto.
- Como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a una célula o tejido que deriva de un donante

que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Normalmente, los mamíferos gemelos exogámicos no cigóticos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que un donante alogénico puede ser HLA idéntico o HLA no idéntico (es decir, mostrar uno o más determinantes HLA dispares) con respecto al sujeto.

- 5 De acuerdo con un aspecto, el donante alogénico es un hermano compatible con HLA, un donante no relacionado con HLA compatible, un donante relacionado con HLA haploidéntico o un donante que muestra uno o más determinantes HLA dispares.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "xenogénico" se refiere a una célula o tejido que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente con respecto la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Normalmente, los mamíferos exogámicos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.
- 15 La presente descripción prevé que las células o tejidos xenogénicos derivan de una diversidad de especies tales como, pero no limitado a, bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), porcinos (por ejemplo, cerdo), óvidos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domesticus*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, macaco de la india, mono macaco, tití).
- 20 Las células o tejidos de origen xenogénico (por ejemplo, origen porcino) se obtienen preferentemente de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tales como los retrovirus endógenos porcinos. De forma similar, las células o tejidos derivados de humanos se obtienen preferentemente de fuentes sustancialmente libres de patógenos.
- 25 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, tanto el sujeto como el donante son humanos.
- 30 Dependiendo de la aplicación y las fuentes disponibles, el injerto celular o tisular de la presente divulgación puede obtenerse de un organismo prenatal, un organismo postnatal, un adulto o un donante cadáver. Además, dependiendo de la aplicación necesaria, la célula o el injerto de tejido pueden estar sin exposición previa o estar genéticamente modificados. La determinación del tipo de injerto de células o tejidos a usar está dentro de la capacidad de un experto en la materia. Adicionalmente, Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para obtener un injerto de células o tejidos (por ejemplo, para trasplante).
- 35 Como se ha mencionado, una dosis de células o tejido hematopoyético agotados en linfocitos T que comprende células hematopoyéticas inmaduras (incluyendo, por ejemplo, CD34+), se trasplanta a un sujeto.
- 40 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T no son singénicas (por ejemplo, alogénicas o xenogénicas) con el sujeto.
- 45 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T y la célula o el injerto de tejido son singénicos (por ejemplo, obtenidos del mismo donante).
- 50 Como se usa en el presente documento la frase "células hematopoyéticas inmaduras" se refiere a un tejido hematopoyético o preparación celular que comprende células hematopoyéticas precursoras. Tal preparación de tejido/célula incluye o deriva de una muestra biológica, por ejemplo, médula ósea, sangre periférica movilizada (por ejemplo, movilización de células CD34 para mejorar su concentración), sangre del cordón umbilical (por ejemplo, cordón umbilical), hígado fetal, saco vitelino y/o placenta. Adicionalmente, las células CD34+ purificadas u otras células madre hematopoyéticas tales como las células CD131+ pueden usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas, ya sea con o sin expansión *ex vivo*.
- 55 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.
- 60 Como se usa en el presente documento, la frase "células hematopoyéticas inmaduras agotadas en linfocitos T" se refiere a una población de células hematopoyéticas que están agotadas en linfocitos T. Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, puede incluir, por ejemplo, células CD34+, CD33+ y/o CD56+. Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T pueden estar agotadas de células CD3+, células CD2+, células CD8+, células CD4+, linfocitos T α/β y/o linfocitos T γ/δ.
- 65 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden células sanguíneas movilizadas G-CSF agotadas en linfocitos T enriquecidas para células hematopoyéticas inmaduras CD34+.
- 70 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos T CD3+.
- 75 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $50 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $40 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $30 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $20 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $15 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $10 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $9 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $8 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $7 \times 10^5$  linfocitos T

- CD3+,  $6 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $5 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $4 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $3 \times 10^5$  linfocitos T CD3+,  $2 \times 10^5$  linfocitos T CD3+ o  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 5 De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $5 \times 10^5$  linfocitos T CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $20 \times 10^5$  linfocitos T CD3+ pero más de  $10$  linfocitos T CD3+.
- 10 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden al menos  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD3+.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de células CD8+.
- 15 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^4$  -  $4 \times 10^5$  células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $50 \times 10^5$  células CD8+,  $25 \times 10^5$  células CD8+,  $15 \times 10^5$  células CD8+,  $10 \times 10^5$  células CD8+,  $9 \times 10^5$  células CD8+,  $8 \times 10^5$  células CD8+,  $7 \times 10^5$  células CD8+,  $6 \times 10^5$  células CD8+,  $5 \times 10^5$  células CD8+,  $4 \times 10^5$  células CD8+,  $3 \times 10^5$  células CD8+,  $2 \times 10^5$  células CD8+,  $1 \times 10^5$  células CD8+,  $9 \times 10^4$  células CD8+,  $8 \times 10^4$  células CD8+,  $7 \times 10^4$  células CD8+,  $6 \times 10^4$  células CD8+,  $5 \times 10^4$  células CD8+,  $4 \times 10^4$  células CD8+,  $3 \times 10^4$  células CD8+,  $2 \times 10^4$  células CD8+ o  $1 \times 10^4$  células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 20 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $4 \times 10^5$  células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 25 De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $4 \times 10^5$  células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $4 \times 10^5$  células CD8+ pero más de  $10$  células CD8+.
- 30 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$  por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 35 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $0,5 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $1 \times 10^5$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $0,5 \times 10^5$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $1 \times 10^4$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $0,5 \times 10^4$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ ,  $1 \times 10^3$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$  o  $0,5 \times 10^3$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$  por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 40 De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$  por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$  pero más de  $10$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta^-$ .
- 45 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos B.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos B (linfocitos B CD19+ y/o CD20+).
- 50 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de  $50 \times 10^5$  linfocitos B,  $40 \times 10^5$  linfocitos B,  $30 \times 10^5$  linfocitos B,  $20 \times 10^5$  linfocitos B,  $10 \times 10^5$  linfocitos B,  $9 \times 10^5$  linfocitos B,  $8 \times 10^5$  linfocitos B,  $7 \times 10^5$  linfocitos B,  $6 \times 10^5$  linfocitos B,  $5 \times 10^5$  linfocitos B,  $4 \times 10^5$  linfocitos B,  $3 \times 10^5$  linfocitos B,  $2 \times 10^5$  linfocitos B o  $1 \times 10^5$  linfocitos B por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- 55 De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de  $4 \times 10^5$  linfocitos B por kilogramo de peso corporal del sujeto. De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de  $50 \times 10^5$  linfocitos B pero más de  $10$  linfocitos B.
- 60 El agotamiento de los linfocitos T, por ejemplo, CD3+, CD2+, TCR $\alpha/\beta^+$ , células CD4+ y/o CD8+, o linfocitos B, por ejemplo, células CD19+ y/o CD20+, puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica, tales como por erradicación (por ejemplo, matar) con anticuerpos específicos o por purificación basada en afinidad, por ejemplo, tal como mediante el uso de técnicas de separación celular magnética, clasificador FACS y/o captura de marcado ELISA.
- 65 Dichos métodos se describen en el presente documento y en THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volúmenes 1 a 4, (D.N. Weir, editor) y FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer

- Verlag, 1992). Por ejemplo, las células pueden clasificarse por, por ejemplo, citometría de flujo o FACS. Por lo tanto, puede usarse la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y puede tener diversos grados de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, y canales de impedancia. Cualquier técnica de separación dependiente de ligando conocida en la técnica puede usarse junto con técnicas de separación tanto positivas como negativas que se basan en las propiedades físicas de las células en lugar de la afinidad de anticuerpos, incluyendo pero no limitado a elutriación y centrifugación en gradiente de densidad.
- Otros métodos para la clasificación celular incluyen, por ejemplo, selección y separación usando técnicas de afinidad, incluyendo aquellas técnicas que usan soportes sólidos tales como placas, perlas y columnas. Por lo tanto, las muestras biológicas pueden separarse mediante "barrido" con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, a una placa.
- De manera alternativa, las células pueden clasificarse/separarse mediante técnicas de separación magnética, y algunos de estos métodos utilizan perlas magnéticas. Hay diferentes perlas magnéticas disponibles de varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Dynal (Noruega), Advanced Magnetics (Cambridge, MA, EE.UU.), Immuncon (Filadelfia, EE.UU.), Immunotec (Marsella, Francia), Invitrogen, Stem cell Technologies (EE.UU.) y Cellpro (EE.UU.). De manera alternativa, los anticuerpos pueden biotinilarse o conjugarse con digoxigenina y usarse junto con columnas de afinidad recubiertas con avidina o anti-digoxigenina.
- De acuerdo con un aspecto, pueden combinarse diferentes métodos de agotamiento/separación, por ejemplo, la clasificación celular magnética puede combinarse con FACS, para aumentar la calidad de separación o permitir la clasificación por múltiples parámetros.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen mediante reducción en volumen de linfocitos T (TCD).
- La reducción en volumen de linfocitos T puede efectuarse usando anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD8, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD2, anticuerpos anti-TCR $\alpha/\beta$  y/o anticuerpos anti-TCR $\gamma/\delta$ .
- De acuerdo con un aspecto, el agotamiento de los linfocitos B se efectúa mediante reducción en volumen de linfocitos B.
- La reducción en volumen de linfocitos B puede efectuarse usando anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD19 o anti-CD20. De manera alternativa, la reducción en volumen *in vivo* de los linfocitos B puede lograrse mediante la infusión de anticuerpos anti-CD20.
- De manera alternativa, la selección positiva de células madre CD34+ o CD131+ puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, técnicas de separación celular magnética, clasificador FACS y/o captura de marcado ELISA como se describe en más detalle anteriormente.
- Como se ha mencionado, la reducción en volumen de linfocitos T o linfocitos B puede realizarse *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en un donante antes de adquirir células hematopoyéticas inmaduras a partir del mismo).
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T (por ejemplo, que comprenden células CD34+) comprenden células de médula ósea agotadas de linfocitos T, células progenitoras de sangre periférica movilizadas agotadas de linfocitos T (por ejemplo, movilizadas por G-CSF), sangre del cordón umbilical/hígado fetal/saco vitelino agotada de linfocitos T y/o, células CD34+ purificadas (recolectadas de todas las fuentes mencionadas anteriormente, por ejemplo, de médula ósea y/o células progenitoras de sangre periférica movilizadas con G-CSF) y seleccionadas por selección positiva (por ejemplo, con perlas magnéticas usando un anticuerpo anti-CD34). Además, los presentes métodos también contemplan células CD34+ purificadas expandidas *ex vivo* para aumentar el número de células.
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el sujeto se administra con una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprende al menos aproximadamente,  $4 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9,5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $12,5 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$ ,  $30 \times 10^6$ ,  $35 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$ ,  $45 \times 10^6$ ,  $50 \times 10^6$ ,  $60 \times 10^6$ ,  $70 \times 10^6$ ,  $80 \times 10^6$ ,  $90 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal.
- De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden al menos aproximadamente  $10 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal.
- De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal.

- De acuerdo con un aspecto, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprende un intervalo de aproximadamente  $4-30 \times 10^6$ ,  $4-40 \times 10^6$ ,  $4-50 \times 10^6$ ,  $4-60 \times 10^6$ ,  $4-70 \times 10^6$ ,  $4-80 \times 10^6$ ,  $4-90 \times 10^6$ ,  $4-100 \times 10^6$ ,  $5-10 \times 10^6$ ,  $5-20 \times 10^6$ ,  $5-30 \times 10^6$ ,  $5-40 \times 10^6$ ,  $5-50 \times 10^6$ ,  $5-60 \times 10^6$ ,  $5-70 \times 10^6$ ,  $5-80 \times 10^6$ ,  $5-90 \times 10^6$ ,  $5-100 \times 10^6$ ,  $10-20 \times 10^6$ ,  $10-30 \times 10^6$ ,  $10-40 \times 10^6$ ,  $10-50 \times 10^6$ ,  $10-60 \times 10^6$ ,  $10-70 \times 10^6$ ,  $10-80 \times 10^6$ ,  $10-90 \times 10^6$ ,  $10-100 \times 10^6$ ,  $20-30 \times 10^6$ ,  $20-40 \times 10^6$ ,  $20-50 \times 10^6$ ,  $20-60 \times 10^6$ ,  $20-70 \times 10^6$ ,  $20-80 \times 10^6$ ,  $20-90 \times 10^6$ ,  $20-100 \times 10^6$ ,  $30-40 \times 10^6$ ,  $30-50 \times 10^6$ ,  $30-60 \times 10^6$ ,  $30-70 \times 10^6$ ,  $30-80 \times 10^6$ ,  $30-90 \times 10^6$ ,  $30-100 \times 10^6$ ,  $40-50 \times 10^6$ ,  $40-60 \times 10^6$ ,  $40-70 \times 10^6$ ,  $40-80 \times 10^6$ ,  $40-90 \times 10^6$ ,  $40-100 \times 10^6$ ,  $50-60 \times 10^6$ ,  $50-70 \times 10^6$ ,  $50-80 \times 10^6$ ,  $50-90 \times 10^6$ ,  $50-100 \times 10^6$ ,  $60-70 \times 10^6$ ,  $60-80 \times 10^6$ ,  $60-90 \times 10^6$ ,  $60-100 \times 10^6$ ,  $70-80 \times 10^6$ ,  $70-90 \times 10^6$ ,  $70-100 \times 10^6$ ,  $80-90 \times 10^6$ ,  $80-100 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden un intervalo de aproximadamente  $5-40 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal.
- Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T de la presente divulgación pueden trasplantarse en un receptor usando cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tales como pero no limitado a, infusión celular (por ejemplo, I.V.), a través de una vía intraperitoneal o por vía intraósea.
- Como se ha mencionado, el sujeto de la presente divulgación puede ser trasplantado además con un injerto de células o tejidos (por ejemplo, hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y/o tejidos linfoideos/hematopoyéticos).
- El trasplante de la célula o el tejido en el sujeto puede efectuarse de muchas maneras, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo de célula o tejido; el tipo, la fase o la gravedad de la enfermedad del receptor (por ejemplo, insuficiencia orgánica); los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto; y/o el resultado terapéutico deseado.
- El trasplante de un injerto celular o tisular de la presente divulgación puede efectuarse trasplantando el injerto celular o tisular en cualquiera de las diversas ubicaciones anatómicas, dependiendo de la aplicación. La célula o el injerto de tejido pueden trasplantarse a una ubicación anatómica homotópica (una ubicación anatómica normal para el trasplante), o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el trasplante). Dependiendo de la aplicación, la célula o el injerto de tejido puede implantarse ventajosamente debajo de la cápsula renal o en el riñón, la grasa testicular, el sub-cutis, el epiplón, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad del corazón, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, la piel, el páncreas y/o el espacio intraabdominal.
- Por ejemplo, un tejido hepático de acuerdo con las presentes enseñanzas puede trasplantarse en el hígado, la vena porta, la cápsula renal, el sub-cutis, el epiplón, el bazo y el espacio intra-abdominal. El trasplante de un hígado en diversas ubicaciones anatómicas como estas se practica comúnmente en la técnica para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante hepático (por ejemplo, insuficiencia hepática). De forma similar, el trasplante de un tejido pancreático de acuerdo con la presente divulgación puede efectuarse ventajosamente trasplantando el tejido en la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, el sub-cutis, el epiplón, un asa intestinal (la subserosa de un asa en U del intestino delgado) y/o el espacio intra-abdominal. El trasplante de tejido pancreático puede usarse para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante pancreático (por ejemplo, diabetes). Asimismo, el trasplante de tejidos tales como un tejido de riñón, de corazón, de pulmón o cutáneo puede llevarse a cabo en cualquier ubicación anatómica descrita anteriormente con el fin de tratar a receptores que padecen, por ejemplo, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia pulmonar o daño en la piel (por ejemplo, quemaduras).
- Opcionalmente, cuando se trasplanta una célula o injerto de tejido de la presente divulgación en un sujeto que tiene un órgano defectuoso, puede ser ventajoso retirar primero al menos parcialmente el órgano fallido del sujeto para permitir el desarrollo óptimo del trasplante y la integración estructural/funcional del mismo con la anatomía/fisiología del sujeto.
- El método de la presente descripción también prevé el co-trasplante de varios órganos (por ejemplo, corazón y pulmón, hígado y bazo, páncreas y médula ósea, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, riñón y médula ósea, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, etc.) en caso de que el sujeto pueda verse beneficiado por dicho procedimiento.
- De acuerdo con un aspecto, el co-trasplante comprende el trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y un tejido/órgano sólido o varios órganos/tejidos sólidos.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras y el órgano sólido se obtienen del mismo donante.
- De acuerdo con un aspecto, la célula o el injerto de tejido (por ejemplo, órgano sólido) se trasplanta en el sujeto antes de, concomitantemente con o después del trasplante de las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos

T (por ejemplo, que comprenden células CD34+) en el sujeto.

Después del trasplante de la célula o el injerto de tejido en el sujeto, es aconsejable, de acuerdo con la práctica médica convencional, para controlar la funcionalidad de crecimiento y la inmunocompatibilidad del órgano de acuerdo con una cualquiera de las diversas técnicas de la técnica convencional. Por ejemplo, la funcionalidad de un trasplante de tejido pancreático puede controlarse después del trasplante mediante pruebas de función convencional del páncreas (por ejemplo, análisis de los niveles séricos de insulina). Asimismo, un trasplante de tejido hepático puede controlarse después del trasplante mediante pruebas de función hepática convencionales (por ejemplo, análisis de los niveles séricos de albúmina, proteína total, ALT, AST y bilirrubina y análisis del tiempo de coagulación sanguínea). El desarrollo estructural del injerto de célula o de tejido puede controlarse mediante tomografía computarizada o formación de imágenes por ultrasonidos.

Independientemente del tipo de trasplante, para reducir, en al menos aproximadamente un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 %, o preferentemente evitar el rechazo del injerto y/o la enfermedad del injerto contra el hospedador (EICH), la presente divulgación contempla la administración de ciclofosfamida después del trasplante.

De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación contempla además la administración de ciclofosfamida antes del trasplante (por ejemplo, los días 4, 3 o 2 antes del trasplante, es decir, T-4, -3 o -2) además de la administración 20 después del trasplante como se describe en el presente documento.

Cabe observar que, la fecha de trasplante (del injerto de células o tejidos) se considera T = cero.

Como se usa en el presente documento, el término "ciclofosfamida" se refiere al agente alquilante de mostaza de nitrógeno que añade específicamente un grupo alquilo ( $C_nH_{2n+1}$ ) al ADN (también conocido como ciclofosfano). En un aspecto específico, la ciclofosfamida se refiere a la fórmula molecular  $C_7H_{15}C_{12}N_2O_2P \cdot H_2O$  y el nombre químico 2-óxido de 2-[bis(2-cloroethyl)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina monohidrato. La ciclofosfamida está disponible en el mercado de, por ejemplo, Zydus (German Remedies), Roxane Laboratories Inc-Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb Co - Mead Johnson and Co y Pfizer - Farmacia & Upjohn, bajo las marcas de Endoxan, Cytoxan, Neosar, Procytox y Revimmune.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida se administra típicamente al sujeto después del trasplante de la célula o injerto de tejido.

35 Sin desear quedar ligados a teoría alguna, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de ciclofosfamida eficiente para matar los linfocitos T del donante activados o alorreactivos del hospedador sin ser tóxica para el sujeto.

Por ejemplo, en caso de injerto celular o tisular, la cantidad terapéutica eficaz de ciclofosfamida comprende 40 aproximadamente 1-25 mg, 1-50 mg, 1-75 mg, 1-100 mg, 1-250 mg, 1-500 mg, 1-750 mg, 1-1000 mg, 5-50 mg, 5-75 mg, 5-100 mg, 5-250 mg, 5-500 mg, 5-750 mg, 5-1000 mg, 10-50 mg, 10-75 mg, 10-100 mg, 10-250 mg, 10-500 mg, 10-750 mg, 10-1000 mg, 25-50 mg, 25-75 mg, 25-100 mg, 25-125 mg, 25-200 mg, 25-300 mg, 25-400 mg, 25-500 mg, 25-750 mg, 25-1000 mg, 50-75 mg, 50-100 mg, 50-125 mg, 50-150 mg, 50-175 mg, 50-200 mg, 50-250 mg, 50-500 mg, 50-1000 mg, 75-100 mg, 75-125 mg, 75-150 mg, 75-250 mg, 75-500 mg, 75-1000 mg, 100-125 mg, 100-150 mg, 100-200 mg, 100-300 mg, 100-400 mg, 100-500 mg, 100-1000 mg, 125-150 mg, 125-250 mg, 45 125-500 mg, 125-1000 mg, 150-200 mg, 150-300 mg, 150-500 mg, 150-1000 mg, 200-300 mg, 200-400 mg, 200-500 mg, 200-750 mg, 200-1000 mg, 250-500 mg, 250-750 mg, 250-1000 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, la cantidad terapéutica eficaz de ciclofosfamida es de aproximadamente 25-200 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

50 Como se ilustra en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han demostrado que la administración de dos dosis de ciclofosfamida después del trasplante (en los días 3 y 4 después del trasplante) permite un injerto duradero y tolerancia a la 'mega dosis' de médula ósea del donante no compatible agotada de linfocitos T.

55 De acuerdo con un aspecto, la ciclofosfamida se administra en una dosis única.

De acuerdo con un aspecto, la ciclofosfamida se administra en dosis múltiples, por ejemplo, en 2, 3, 4, 5 dosis o más.

De acuerdo con un aspecto específico, la ciclofosfamida se administra en dos dosis.

60 De acuerdo con un aspecto, la ciclofosfamida se administra diariamente tales como una vez al día o dos veces al día.

La dosis de cada administración de ciclofosfamida puede comprender aproximadamente 5 mg, 7.5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 65 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 260 mg, 270 mg, 280 mg, 290 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg o 500 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, la dosis de ciclofosfamida es de 50 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

5 Como se ha mencionado, la ciclofosfamida se administra después del trasplante. Por lo tanto, por ejemplo, la ciclofosfamida puede administrarse al sujeto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días o más después del trasplante (es decir, T+1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10). De acuerdo con un aspecto específico, la ciclofosfamida se administra al sujeto en dos dosis 3 y 4 días después del trasplante.

10 De acuerdo con un aspecto, la ciclofosfamida se administra antes del trasplante y después del trasplante. Por lo tanto, por ejemplo, puede administrarse ciclofosfamida al sujeto 3 días antes del trasplante (T-3) y luego después del trasplante (por ejemplo, los días T+3, +4, etc.).

15 El número de administraciones y la cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida pueden ajustarse según sea necesario teniendo en cuenta el tipo de trasplante y la respuesta del sujeto al régimen. La determinación del número de administraciones y la cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

20 Para facilitar el injerto del injerto de célula o de tejido, el método puede comprender además ventajosamente acondicionar al sujeto con un fármaco inmunosupresor adicional y/o irradiación inmunosupresora antes de, concomitantemente con o después del trasplante de la célula o el injerto de tejido.

25 Se apreciará que en situaciones en donde el injerto de célula o de tejido (por ejemplo, un órgano sólido) se trasplanta antes de que las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, es aconsejable usar agentes inmunosupresores generales (por ejemplo, ciclosporina A, como se describe en detalle adicional a continuación) para evitar el rechazo de órganos. Una vez que las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se trasplantan y se logra el quimerismo, los agentes inmunosupresores generales pueden reducirse y posteriormente detenerse. Por el contrario en situaciones en donde el injerto de célula o de tejido (por ejemplo, un órgano sólido) se trasplanta posterior a las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, después de la inducción del quimerismo, puede no requerirse el uso de inmunosupresión general.

30 En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para seleccionar y administrar regímenes inmunosupresores adecuados para el trasplante (por ejemplo, consultese: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. et al., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midtun DE. et al., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. et al., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. et al., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. et al., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantel J. et al. 1998. Lancet 351, 623).

35 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el sujeto se acondiciona bajo acondicionamiento de intensidad reducida antes del trasplante de una célula o injerto de tejido.

40 De acuerdo con un aspecto, el acondicionamiento de intensidad reducida se efectúa hasta durante 2 semanas (por ejemplo, 1-10 o 1-7 días) antes del trasplante de la célula o injerto de tejido.

45 De acuerdo con un aspecto, el acondicionamiento de intensidad reducida se efectúa hasta durante 2 semanas (por ejemplo, 1-10 o 1-7 días) antes del trasplante de la célula o injerto de tejido.

50 Por lo tanto, por ejemplo, el sujeto puede tratarse con un acondicionamiento mieloablativo o no mieloablativo. Dicho acondicionamiento puede comprender, por ejemplo y como se describe en detalle en la sección de Ejemplos que sigue, reducción en volumen de linfocitos T *in vivo*, por ejemplo, por anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD8, anticuerpos anti-CD3 (OKT3), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH) y/o anticuerpo anti-timocito globulina (ATG) (por ejemplo, 6 días antes del trasplante a una dosis terapéutica eficaz de aproximadamente 300 µg cada uno).

55 El acondicionamiento puede comprender adicional o alternativamente irradiación corporal total (TBI), irradiación linfoide total (TLI, es decir, exposición de todos los ganglios linfáticos, el timo y el bazo), un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.

60 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, el TBI comprende una dosis de irradiación simple o fraccionada dentro del intervalo de 0,5-1 Gy, 0,5-1,5 Gy, 0,5-2,5 Gy, 0,5-5 Gy, 0,5-7,5 Gy, 0,5-10 Gy, 0,5-15 Gy, 1-1,5 Gy, 1-2 Gy, 1-2,5 Gy, 1-3 Gy, 1-3,5 Gy, 1-4 Gy, 1-4,5 Gy, 1-1,5 Gy, 1-7,5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy o 10-15 Gy.

65 De acuerdo con un aspecto específico, el TBI comprende una dosis de irradiación simple o fraccionada dentro del intervalo de 1-3,5 Gy.

70 De acuerdo con un aspecto, el tratamiento con TBI se administra al sujeto 1-10 días (por ejemplo, 1-3 días) antes del trasplante. De acuerdo con un aspecto, el sujeto se acondiciona una vez con TBI 1 o 2 días antes del trasplante.

- De acuerdo con un aspecto específico, el TLI comprende una dosis de irradiación dentro del intervalo de 0,5-1 Gy, 0,5-1,5 Gy, 0,5-2,5 Gy, 0,5-5 Gy, 0,5-7,5 Gy, 0,5-10 Gy, 0,5-15 Gy, 1-1,5 Gy, 1-2 Gy, 1-2,5 Gy, 1-3 Gy, 1-3,5 Gy, 1-4 Gy, 1-4,5 Gy, 1-1,5 Gy, 1-7,5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy, 10-15 Gy, 10-20 Gy, 10-30 Gy, 10-40 Gy, 0,5-20 Gy, 0,5-30 Gy, 0,5-40 Gy o 0,5-50 Gy.
- De acuerdo con un aspecto específico, el TLI comprende una dosis de irradiación simple o fraccionada dentro del intervalo de 1-3,5 Gy.
- De acuerdo con un aspecto, el tratamiento con TLI se administra al sujeto 1-10 días (por ejemplo, 1-3 días) antes del trasplante. De acuerdo con un aspecto, el sujeto se acondiciona una vez con TLI 2-7 días antes del trasplante.
- De acuerdo con un aspecto, El acondicionamiento comprende un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, Busulfán, Myleran, Busulfex, Fludarabina, Melfalán y Tiotepa y ciclofosfamida. Los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse al sujeto en una dosis única o en varias dosis, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante. De acuerdo con un aspecto, al sujeto se le administra un agente quimioterapéutico (por ejemplo, Fludarabina, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup>/día) durante 5 días consecutivos antes del trasplante (por ejemplo, en los días -7 a -3).
- De acuerdo con un aspecto, el acondicionamiento comprende una inmunoterapia con anticuerpos. Los anticuerpos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab vendido bajo las marcas de, por ejemplo, Campath, Mab-Campath, Campath-1H y Lemtrada) y un agente anti-timocito globulina (ATG) [por ejemplo, Timoglobulina (ATG de conejo, rATG, disponible de Genzyme) y Atgam (ATG equino, eATG, disponible de Pfizer)]. La inmunoterapia de anticuerpos adicional puede comprender agentes anti-CD3 (OKT3), anti-CD4 o anti-CD8. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo se administra al sujeto en una dosis única o en varias dosis, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante (por ejemplo, 6 días antes de trasplante).
- De acuerdo con un aspecto, el sujeto no se trata crónicamente (por ejemplo, durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, durante más de 10 días) con profilaxis de GVHD después del trasplante.
- De acuerdo con un aspecto, en caso de recaída después del trasplante de células madre hematopoyéticas, el sujeto puede recibir tratamiento adicional mediante infusiones de linfocitos de donantes (DLI). Por ejemplo, el sujeto puede administrarse con dosis graduadas de linfocitos T como se describió previamente por Dazzi et al [Dazzi, Szydlo et al., Blood, (2000) 96: 2712-6].
- De acuerdo con un aspecto, el sujeto puede tratarse con una infusión de aproximadamente 0,5 - 5 x 10<sup>4</sup> linfocitos CD3+ por kg de peso corporal del receptor (por ejemplo, 1 x 10<sup>4</sup> linfocitos CD3+, por ejemplo, linfocitos CD3+ no manipulados, por kg de peso corporal del receptor) para el tratamiento de la recaída después del trasplante haploidéntico agotado de linfocitos T.
- De acuerdo con un aspecto, un paciente con recaída molecular y/o hematológica temprana se tratará además con una primera dosis de aproximadamente 1 x 10<sup>4</sup> células CD3+ por kg de peso corporal del receptor. En ausencia de EICH, la segunda infusión de aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> células CD3+ por kg de peso corporal del receptor generalmente se administrará aproximadamente 45 días después, seguido 2 meses después por una tercera dosis de aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células CD3+ por kg de peso corporal del receptor. Se apreciará que los donantes típicamente se someten a una leucocitofracción para recolectar linfocitos antes de la movilización de células hematopoyéticas (por ejemplo, para trasplante). Los productos congelados se descongelen según sea necesario y se infusionalen rápidamente durante un período de 5-10 minutos. Los pacientes que presentan EICH aguda o que no demuestran el injerto hematológico generalmente no recibirán ningún DLI.
- De acuerdo con un aspecto, un paciente con linfoma no Hodgkin de linfocitos B de recaída generalmente se tratará con rituximab (por ejemplo, 375 mg/m<sup>2</sup> semanalmente durante aproximadamente 4 semanas) con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab.
- De acuerdo con un aspecto, un paciente con mieloma múltiple de recaída recibirá tratamiento adicional con bortezomib (por ejemplo, 1,3 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.
- De acuerdo con un aspecto, no se usarán agentes inmunosupresores posteriores a DLI junto con los presentes métodos.
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, comprendiendo el método: (a)

- trasplantar en un sujeto acondicionado una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $5 \times 10^5$  células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras, comprendiendo el método: (a) acondicionar a un sujeto bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, en donde el acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterápico; (b) trasplantar en el sujeto una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $5 \times 10^5$  células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (c) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para inducir tolerancia específica del donante en un sujeto que necesita un injerto de células o tejido no singénico, comprendiendo el método: (a) trasplantar a un sujeto una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T obtenidas de un donante no singénico, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $5 \times 10^5$  células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.
- Como se usa en el presente documento, la frase "tolerancia específica del donante", como se usa en el presente documento se refiere a una afección en donde hay una disminución de la capacidad de respuesta de las células del receptor (por ejemplo, linfocitos T del receptor) cuando entran en contacto con las células del donante (por ejemplo, células hematopoyéticas del donante) en comparación con el capacidad de respuesta de las células del receptor en ausencia de dicho método de tratamiento.
- La inducción de tolerancia permite el trasplante de una célula o injerto de tejido (como se describe en detalle adicional anteriormente) con un riesgo reducido de rechazo del injerto o EICH.
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir infusiones de linfocitos de donantes (DLI).
- De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, DLI puede comprender  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor.
- De acuerdo con un aspecto, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir una dosis única o varias dosis (dos, tres, cuatro, cinco o más dosis) de DLI.
- Por lo tanto, por ejemplo, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir una primera dosis de  $1 \times 10^4$  linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor. En ausencia de enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), puede administrarse una segunda infusión de  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor, por ejemplo, 45 días después, seguido, por ejemplo, 2 meses después de una tercera dosis de  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor.
- De acuerdo con un aspecto, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir irradiación corporal total (TBI), irradiación linfoide total (TLI), un agente quimioterápico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.
- Por lo tanto, por ejemplo, los pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B recidivantes pueden recibir rituximab (por ejemplo, a una dosis de  $375 \text{ mg/m}^2$  semanalmente) durante aproximadamente 4 semanas con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab.
- Por lo tanto, por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple de recaída podrán tratarse con bortezomib (por ejemplo, a una dosis de  $1,3 \text{ mg/m}^2$  en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.
- Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm$  el 10 %.
- Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugaciones significan "que incluye pero no se limita a".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes adicionales, etapas y/o partes, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de la presente solicitud, diversos aspectos de esta divulgación pueden presentarse en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la divulgación. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicador y un segundo número indicador y "que varía/varía de" un primer número indicador "a" un segundo número indicador se usan indistintamente en el presente documento y se pretende que incluyan los números indicadores primero y segundo, y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada, incluyendo, pero no limitado a, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de las maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de la técnica química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Se apreciará que determinadas características de la divulgación, que son, por claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en un único aspecto. En cambio, diversas características de la divulgación, que son, por brevedad, descritas en el contexto de un único aspecto, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otro aspecto descrito de la divulgación. Determinadas características descritas en el contexto de diversos aspectos no han de considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto no funcione sin esos elementos.

Diversos aspectos y aspectos de la presente divulgación como se han delineado anteriormente en el presente documento y como se reivindica más adelante en la sección de reivindicaciones encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la divulgación de manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en las Patentes de EE.UU N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8a Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.579; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press

(1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos de los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

## EJEMPLO 1

**5** *Injerto estable de médula ósea de HLA no coincidente después del trasplante de 'mega dosis' de médula ósea y ciclofosfamida posterior al trasplante*

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 10 *Animales*

Los ratones usados en estos estudios fueron ratones hembra de 6-12 semanas de edad. Balb/c-Nude (H-2d) y C3H/Hen (H-2k) se compraron de Harlan Israel (Rehovot, Israel). Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (5 animales en cada jaula) y se les alimentó con alimentos estériles y agua ácida. Estos estudios fueron aprobados por el Weizmann Institute of Science, Institutional Animal Care and Use Committee.

#### 15 *Protocolo de trasplante*

20 Las células BM Balb/c-Nude de dosis baja ( $5 \times 10^6$ ) y alta ( $25 \times 10^6$ ) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T) se trasplantaron en receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) *in-vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. La dosis alta de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administró en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 35 y 95 días después del trasplante usando anticuerpos anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D<sup>d</sup> etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K<sup>k</sup> marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

#### 25 *Protocolo de injerto de piel*

30 Los injertos de piel del donante (Balb/c) y de terceros (C57BL/6) se trasplantaron a los receptores químéricos mixtos como se describe anteriormente [es decir, a aquellos ratones que se trasplantaron previamente con mega dosis ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada de linfocitos T y se trataron con dosis alta de CY] y a los ratones receptores que se inocularon con una dosis regular de células BM ( $5 \times 10^6$ ) agotadas de linfocitos T y se trataron con alta dosis de CY.

### 35 RESULTADOS

40 Para probar la sinergia potencial entre la 'mega dosis' de trasplante de médula ósea (BMT) agotada de linfocitos T y dosis alta de ciclofosfamida (CY) después del trasplante, después del acondicionamiento de intensidad reducida (RIC) de los ratones receptores, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

45 Los ratones receptores (C3H/Hen) se trataron con un protocolo de acondicionamiento antes del trasplante de un trasplante de médula ósea con linfocitos T agotados. Específicamente, los ratones se trataron *in vivo* con reducción en volumen de linfocitos T (TCD) usando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. A continuación, células BM Balb/c-Nude de dosis baja ( $5 \times 10^6$ ) y alta ( $25 \times 10^6$ ) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T, ya que los ratones desnudos tienen números minúsculos de linfocitos T maduros) se trasplantaron a receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0. Se administraron altas dosis de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) en los días +3 y +4 después del trasplante. La evaluación del injerto de células de médula ósea se evaluó por quimerismo de tipo de donante a los 35 y 95 días después del trasplante.

50 Como se muestra en las Figuras 1A-B y las Figuras 2A-B, el análisis de quimerismo en el día 35 y el día 95 reveló que ninguno de los ratones control (acondicionados con TCD, 2 Gy TBI y opcionalmente CY, pero no recibieron BM) expresó quimerismo de tipo donante. De forma similar, ninguno de los receptores de ratones BM que fueron trasplantados con una dosis regular de  $5 \times 10^6$  BM agotadas de linfocitos T, en presencia o ausencia de tratamiento con ciclofosfamida, expresó quimerismo de tipo donante. Sin embargo, cuando la dosis de BM agotado de linfocitos T se aumentó a  $25 \times 10^6$  células, se logró un quimerismo de mezcla duradero en 4 de 7 ratones que también fueron tratados con ciclofosfamida en los días +3 y +4 después del trasplante (véanse las Figuras 1A-B y la Figura 2C).

55 El seguimiento adicional de estos ratones receptores a los 180 y 225 días después del trasplante reveló que el quimerismo inducido era estable y duradero (Figura 3). Como se ilustra en la Figura 3, el número de receptores químéricos de tipo donante y el nivel de quimerismo del donante permanecieron sin cambios 225 días después del trasplante, sugiriendo que se ha alcanzado la tolerancia.

60 La inducción de tolerancia se midió por trasplante de injertos de piel de donante (Balb/c) y de terceros (C57BL/6) a los receptores químéricos mixtos que se trasplantaron con mega dosis ( $25 \times 10^6$ ) de BM con agotamiento de linfocitos T

y fueron tratados con dosis altas de CY (como se describió anteriormente), en comparación con los receptores que fueron inoculados con una dosis regular ( $5 \times 10^6$ ) de células BM agotadas de linfocitos T (como se describió anteriormente).

- 5 Como se muestra en las Figuras 4A-B, tres de los 4 ratones químéricos que fueron trasplantados con  $25 \times 10^6$  BM agotadas de linfocitos T aceptaron el injerto de donante y rechazaron los injertos de piel de terceros. Por el contrario, los ratones receptores que fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  células BM agotadas de linfocitos T y CY rechazaron tanto los injertos de piel del donante como de terceros (Figura 4A).
- 10 Estos resultados ilustran que la combinación de mega dosis de células BM agotadas de linfocitos T y tratamiento de dosis altas de ciclofosfamida permite el injerto exitoso de células madre hematopoyéticas, bajo acondicionamiento de intensidad reducida, junto con la inducción de tolerancia.
- 15 Alentados por estos resultados, se inició un conjunto de experimentos de calibración para determinar la irradiación óptima y la dosis de ciclofosfamida para mejorar la inducción del quimerismo mediante este enfoque.

## EJEMPLO 2

*El efecto de diferentes dosis de irradiación corporal total (TBI) sobre el quimerismo*

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### *Animales*

- 25 Como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en este documento.

#### *Protocolo de trasplante*

- 30 Las células BM Balb/c-Nude de dosis alta ( $25 \times 10^6$ ) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T) se trasplantaron en receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) *in-vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a diferentes dosis de irradiación que varían de 1 a 3,5 Gy de TBI en el día -1. La dosis alta de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administró en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 30 días después del trasplante usando anticuerpos
- 35 anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D<sup>d</sup> etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K<sup>k</sup> marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

## RESULTADOS

- 40 En este experimento, se definió la dosis mínima de irradiación. Una 'mega dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de BM agotada de linfocitos T Balb/c-Nude se trasplantó en 5 grupos de receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8) en el día -6, y diferentes dosis de irradiación (variando de 1 a 3,5 Gy TBI) en el día -1. Se administraron dosis altas de ciclofosfamida (CY) en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante a los 30 días después del trasplante.

- 45 Como puede verse en la Figura 5, todos los ratones receptores que fueron irradiados con 2,5, 3 o 3,5 Gy TBI (6/6) fueron químéricos, exhibiendo quimerismo de tipo donante que oscila entre el 58 - 83 %. De forma similar, el 87 % (13/15) de los ratones tratados con 2 Gy TBI exhibieron quimerismo de tipo donante que oscila entre el 56 - 85 %.

- 50 La reducción adicional de la dosis de irradiación a 1,0 Gy causó una pequeña reducción en el porcentaje de ratones químéricos, es decir, el 83 % (5/6), sin embargo, el rango de quimerismo de tipo donante se redujo significativamente al 14,5 - 58 %.

## EJEMPLO 3

*El efecto de diferentes dosis de ciclofosfamida (CY) en el quimerismo*

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

- 60 *Animales*

Como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en este documento.

#### *Protocolo de trasplante*

- 65 Las células BM Balb/c-Nude de dosis alta ( $25 \times 10^6$ ) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T) se

trasplantaron en receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) *in-vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. Diferentes dosis de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, 125 mg/kg o 150 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administraron en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 30 días después del trasplante usando anticuerpos anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D<sup>d</sup> etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K<sup>k</sup> marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

## RESULTADOS

En este experimento, se definió la dosis óptima de CY tras el trasplante. Se trasplantaron 'mega-dosis' ( $25 \times 10^6$ ) de células de BM Balb/c-Nude en 3 grupos de receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 el día -6, y 2 Gy TBI el día -1. Diferentes dosis de Ciclofosfamida (CY), 100 mg/kg, 125 mg/kg o 150 mg/kg, se administraron los días +3 y +4 después del trasplante y el quimerismo de tipo donante se realizó 30 días después del trasplante.

Como puede verse en la Figura 6, el aumento de la dosis de CY a 125 mg/kg o 150 mg/kg no proporcionó una mejora significativa del quimerismo. Por lo tanto, los ratones receptores que se trataron con 100 mg/kg, 125 mg/kg o 150 mg/kg de CY exhibieron un promedio de  $57,5 \pm 25,8$ ,  $66,5 \pm 20,6$  o  $67,4 \pm 27,4$  de quimerismo de tipo donante, respectivamente. No se encontró significancia estadística cuando los receptores tratados con 100 mg/kg se compararon con los tratados con 125 mg/kg o 150 mg/kg ( $P = 0,5$  y  $p = 0,469$  respectivamente).

## EJEMPLO 4

*Las células CD8+ no T no son importantes para lograr el quimerismo mediante la combinación de 'mega dosis' de BM agotadas en linfocitos T con CY después del trasplante*

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Animales

Como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente en este documento.

#### Protocolo de trasplante

Se trasplantaron dosis altas ( $25 \times 10^6$ ) de células de BM Balb/c-Nude agotadas y no agotadas CD8 se trasplantaron en 2 cohortes de receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) *in vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. La dosis alta de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administró en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 30 días después del trasplante usando anticuerpos anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D<sup>d</sup> etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K<sup>k</sup> marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

La fuente de BM en estos experimentos fue ratones Balb/c-Nude. Además, los ratones trasplantados en estos experimentos eran atípicos y, como tales, carecían de linfocitos T. Sin embargo, para refutar la posibilidad de que el efecto fuera una contribución de linfocitos no T CD8 residuales, la preparación de BM de ratones Balb/c-Nude se clasificó negativamente para las células CD8 usando un sistema de clasificación celular (por ejemplo, perlas magnéticas anti-CD8 o clasificador FACS).

## RESULTADOS

Como Ildstad *et al.* previamente enseñaron que un subconjunto de células BM CD8+ TCR<sup>-</sup> son críticas para lograr el quimerismo de tipo donante [Fugier-Vivier IJ *et al.*, J Exp Med (2005) 201:373-383; Grimes HL *et al.*, Exp Hematol (2004) 32:946-954; Huang Y *et al.*, Blood (2011) 117:2494-2505; Kaufman CL *et al.*, Blood (1994) 84:2436-2446; Leventhal J *et al.*, BMC Med (2012) 10:48; Leventhal J *et al.*, Sci Transl Med. (2012) 4:124ra128], los presentes inventores agotaron las células CD8+ residuales de la preparación de 'mega dosis' de Balb/c-Nude midieron la inducción del quimerismo en comparación con las células BM Nude agotadas no CD8<sup>+</sup> control.

Como puede verse en la Figura 7, el agotamiento de los linfocitos T CD8+ de la preparación de BM no tuvo ningún impacto adverso en el nivel de quimerismo logrado al combinar la 'mega dosis' de células BM agotadas de linfocitos T con CY posterior al trasplante.

## EJEMPLO 5

#### Protocolo clínico

## DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio en perspectiva, observacional, de fase I/II multicentro. Diez pacientes con trastornos hematológicos se inscribirán durante un período de un año.

El criterio de valoración principal del estudio es el injerto e ingresarán 10 pacientes evaluables (es decir, pacientes que sobrevivan más allá del día 28). Una tasa aceptable de fracaso o rechazo del injerto primario es aproximadamente del 10 %.

### Duración del estudio

El análisis primario se realizará utilizando datos de seguimiento de 6 y 12 meses. Los pacientes serán seguidos hasta 48 meses después del trasplante.

### Definiciones

El injerto sostenido estable se define como neutrófilos, más de 1000/ $\mu$ l por tres días consecutivos, y plaquetas, más de 20000/ $\mu$ l por tres días consecutivos, sin transfusión.

El rechazo del injerto se define como la disminución rápida de neutrófilos, menos de 100/ $\mu$ l después del injerto documentado de neutrófilos, con o sin aumento de linfocitos.

El fallo del injerto se define como el fallo en alcanzar más de 1000/ $\mu$ l de neutrófilos durante tres días consecutivos y más de 20000/ $\mu$ l de plaquetas durante tres días consecutivos sin transfusión en el día +28.

El criterio de valoración secundario del estudio es la incidencia de EICH aguda de grado II-IV. Una incidencia aceptable de EICH aguda de grado II-IV es aproximadamente del 10 %.

Para EICH aguda los criterios de clasificación se indican en las Tablas 1A-B, a continuación.

Tabla 1A: Estadificación clínica de la EICH aguda

Estadio	PIEL	HÍGADO	INTESTINO
+	Sarpullido de más del 25 %	Bilirrubina = 2-3 mg/dl	Diarrea 500-1000 ml
++	Sarpullido 25-50 %	Bilirrubina = 3-6 mg/dl	Diarrea 1000-1500 ml
+++	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina = 6-15 mg/dl	Diarrea de más de 1500 ml
++++	Descamación y ampollas	Bilirrubina más de 15 mg/dl	Dolor o íleo

Tabla 1B: Clasificación clínica de la EICH aguda

CALIDAD	PIEL	HÍGADO	INTESTINO	Deterioro funcional
0 ninguno	0	0	0	0
I suave	+ a ++	0	0	0
II moderado	+ a +++	+	+	+
III grave	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++
IV/potencialmente mortal	++ a +***	++ a +***	++ a +***	+++

### Consideraciones estadísticas

Los intervalos de tiempo para el injerto, la supervivencia, supervivencia libre de enfermedad, la tasa de recaída y el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante se calcularán a partir del día del trasplante de células madre. Las curvas actuariales se calcularán de acuerdo con el método de Kaplan-Meier.

## CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

### Criterios de inclusión - Paciente

- Edad: más o igual a 18 años y menos o igual a 70 años
- Pacientes con CLL con refractariedad a fludarabina u otra quimioterapia debida a la pérdida de p53 por delección de 17p y/o mutación de TP53
- Linfoma folicular con citogenética desfavorable tales como cariotipo complejo, del17p, del 6q23-26, mutaciones en TP53, menos 1p
- Relapso de linfoma de Hodgkin después de un trasplante autólogo, no elegible para inmunoterapia con anti-CD30
- Mieloma múltiple con recaída después del trasplante autólogo, con citogenética desfavorable en remisión parcial o completa
- Anemia aplásica severa recurrente después de la inmunoterapia

- Ausencia de un donante familiar con HLA totalmente compatible o un locus HLA no compatible
- Ausencia de donante no relacionado emparejado o inelegibilidad para la búsqueda de donantes en el registro de donantes (IBMDR)
- Presencia de donante familiar haploidéntico y respaldo de células madre autólogas del paciente
- Condiciones clínicas estables y esperanza de vida de más de 12 semanas
- Karnofsky - más del 70 %
- Consentimiento informado por escrito

5 Evaluación previa al tratamiento

- 10 - historia clínica completa y examen y determinación del estado funcional y el área de superficie corporal.

- hemograma completo

- grupo sanguíneo, subgrupos de glóbulos rojos, titulación de aglutinina anti-A y/o anti-B

- 15 - aclaramiento de creatinina, ácido úrico, ferritina, LDH, beta 2 microglobulina, electroforesis de proteínas, SGOT, SGPT, análisis de orina, glucosa en sangre, nitrógeno en sangre, niveles de inmunoglobulina, Pruebas de Coombs.

- prueba de embarazo

- VIH-ab, HBsAg, HBVDNA, HCV-ab, HCVRNA, CMV-ab, Toxoplasma-ab, HSVab

- ECG y medición de la fracción de eyección por ultrasonido o prueba gammagráfica.

- radiografía de pecho.

- 20 - tomografía computarizada del pulmón, tomografía computarizada del cerebro, TC de seno maxilar.

- Radiografía dental y examen.

- biopsia y aspirado de médula ósea para análisis morfológicos y citogenéticos, buscar un marcador molecular (si no se conoce) y un análisis FACS (según la enfermedad subyacente).

- examen neurológico y punción lumbar en pacientes en riesgo.

- 25 - exploración radiológica (CT, RMN) de la localización conocida de la enfermedad.

- tipificación serológica y molecular completa de HLA, cultivos ML y prueba de citotoxicidad con los donantes seleccionados.

- anticuerpos citotóxicos anti HLA.

- Ecografía abdominal

30 Criterios de exclusión - Paciente

- Historia de localización de la enfermedad del sistema nervioso central

- Positividad para el VIH, VHC, HCVRNA, HBsAg, HBVDNA

- 35 - Neumonía activa y documentada de cualquier tipo, infección fúngica del tejido, cultivos víricos positivos de secreción respiratoria o sangre

- bilirrubina de más de 2 veces lo normal

- aclaramiento de creatinina en sangre inferior a 50 ml/min

- DLCO menos del 50 % del valor predicho

- 40 - fracción de eyección inferior al 45 % (o accidente cerebrovascular miocárdico en el último año)

- embarazo o lactancia

- trastornos psiquiátricos

45 Criterios de elegibilidad - Donante

- Ausencia de enfermedad hematopoyética o relacionada con la función medular que interfiere con la recolección de un número suficiente de células progenitoras normales.

- Ausencia de cualquier afección médica que represente un riesgo grave para la salud al someterse a la extracción de células madre de sangre periférica

- 50 - Pruebas de VIH, HTLV-1 negativas

- Cualquier miembro de la familia sano será considerado para la donación de células madre hematopoyéticas. La selección de un donante se basará en la tipificación de los loci HLA-A, B, C, DR que se llevará a cabo en el receptor, hermanos, padres y posiblemente otros miembros de la familia como tíos, tíos y primos. Un posible donante relacionado debe ser al menos genotípicamente haploidéntico HLA-A, B, C, DR para el paciente, pero puede diferir en 2-3 alelos HLA en el haplotipo no compartido.

- El donante se seleccionará preferentemente sobre la base de la aloreactividad NK donante frente a receptor.

55 Evaluación de donantes

- 60 - Historia completa, examen físico y examen de venas físicas por el servicio de féresis para determinar la idoneidad para la féresis a través de venas periféricas.

- Análisis de sangre: WBC, PLT, Hb, PT, PTT, proteína total, albúmina, electrolitos, glucosa, SGOT/SGPT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, LDH, ácido úrico, creatinina.

- CMV, EBV, HSV, VZV, Hepatitis B + C, VIH, serología de Toxoplasma.

- 65 - Completar la tipificación de glóbulos rojos

- Serología para Sífilis, CMV, EBV, HSV, VZV, Hepatitis B + C, HTLV-1, VIH, Toxoplasmosis.

- Las pruebas de enfermedades transmitidas por transfusión deben realizarse entre 30 y 7 días antes de la recolección de células madre
- Radiografía de pecho
- EKG
- 5 - Análisis VNTR por PCR
- Los donantes serán priorizados en función de la edad más joven, mejor salud y ser CMV negativo para receptores CMV negativos.

10 Criterios de exclusión - Donante

- 10 - Una prueba de VIH o HTLV-1 positiva o evidencia de infección de hepatitis vírica activa/persistente excluirá al donante de participar en este estudio.
- Presencia de cualquier afección médica que represente un riesgo grave para la salud al someterse a la extracción de células madre de sangre periférica (es decir, diabetes insulino-dependiente, trastornos cardiovasculares, enfermedades inflamatorias crónicas).

15 PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO

20 Movilización de donantes HSC y procesamiento de injertos.

25 Se requiere que los pacientes tengan un donante familiar (de 18 a 60 años), dispuesto y capaz de donar células hematopoyéticas de sangre periférica estimuladas con filgrastim/lenogastrim. Los donantes serán seleccionados de acuerdo con las reglas generales del Banco de Sangre. Es aconsejable realizar una prueba de ECG de ejercicio en donantes mayores de 50 años. Los donantes normales recibirán filgrastim o lenogastrim 5 mcg/kg por vía subcutánea cada 12 horas; en el día 5 se iniciará la leucaféresis. La dosis de Filgrastim/Lenogastrim se ajustará para mantener los glóbulos blancos por debajo de  $60 \times 10^9/l$ . En el 4º día de tratamiento con filgrastim/lenograstim, si el recuento circulante de células CD34+ es superior a 40/ $\mu l$ , el donante iniciará leucaféresis. La leucaféresis diaria continuará durante 3 días planificados, con un máximo de 4 días, para recolectar una dosis de células diana de más de  $10 \times 10^6$  CD34+ células/kg. Si la diana se alcanza pronto, la recolección puede continuar durante 3 días en total para dar la dosis más grande posible. Si el donante no tolera el procedimiento en ninguna de sus partes componentes, puede usarse un donante alternativo si está disponible. Si un sitio no puede recopilar más de  $10 \times 10^6$  CD34+ células/kg de un donante apropiado, los pacientes no pueden proceder al estudio. Las PBPC se agotarán de los linfocitos T y B del donante mediante la selección de células CD3+ y/o CD19+ usando un sistema de clasificación celular (por ejemplo, perlas magnéticas anti-CD3/19 o clasificador FACS). El valor diana de las células CD34 positivas será al menos  $10 \times 10^6/kg$  del peso corporal del receptor (p.c.).

30 La aféresis se realizará a través de las venas antecubitales.

35 Tabla 2: Régimen de acondicionamiento

día -7	Fludarabina 30 mg/m <sup>2</sup>
día -6	Fludarabina 30 mg/m <sup>2</sup>
día -5	Fludarabina 30 mg/m <sup>2</sup>
día -4	Fludarabina 30 mg/m <sup>2</sup>
día -3	Fludarabina 30 mg/m <sup>2</sup>
día -2	TBI 2 Gy fracción simple
día -1	Descanso
día 0	Injerto
día +1	Descanso
día +2	Descanso
día +3	CY 50 mg/kg
día +4	CY 50 mg/kg

40 Como se describe en la Tabla 2, anterior, la fludarabina se administrará por vía intravenosa diariamente durante 5 días secuenciales, -7, -6, -5, -4 y -3, a una dosis de 30 mg/m<sup>2</sup>. Cada dosis se infusionará durante 30 minutos. Se dará TBI 200 cGy el día -1 en una sola fracción.

45 El día 0, los HSC CD3+/CD19- inmunoseleccionados se descongelarán, se lavarán y se infusionarán a través de un acceso central.

46 Se administrará CY por vía intravenosa en una hora en los días +3 y +4 después del trasplante a 50 mg/kg/día.

50 Ordenes especiales de gestión

- a. se colocará una línea venosa central de doble luz antes del régimen de acondicionamiento;
- b. para la profilaxis de urato se administrará alopurinol 300 mg por os;

- c. la terapia antiemética se administrará de acuerdo con las pautas de un solo centro;  
d. transfusión de productos sanguíneos filtrados e irradiados. Mantener el nivel de hemoglobina más de 8 g/l y las plaquetas más de 15000/μl en ausencia de fiebre o signos de sangrado;

5 Monitorización del paciente durante el tratamiento

- a. recuento sanguíneo completo diario y diferencial  
b. creatinina en suero, Na+, K+, Ca++, bilirrubina diarios durante la quimioterapia y la hiper-hidratación  
c. pruebas de función hepática, albúmina, pruebas de coagulación con antitrombina III, antigenemia por citomegalovirus y PCR dos veces por semana.  
d. cultivos de vigilancia de acuerdo con las pautas del centro

#### EVALUACIÓN DE TOXICIDAD

15 La toxicidad se evaluará de acuerdo con los criterios de la OMS, como se indica en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Criterios de toxicidad de la OMS

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Hematológico					
Hemoglobina	≥ 11,0 g/dl ≥ 6,8 mmol/l	9,5- 10,9 g/dl 5,6- 6,7 mmol/l	8,0-9,4 g/dl 4,9-5,6 mmol/l	6,5-7,9 g/dl 4,0-4,9 mmol/l	< 6,5 g/dl < 4,0 mmol/l
Leucocitos (1000/mm)	≥ 4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	< 1,0
Granulocitos (1000/mm)	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	< 0,5
Plaquetas (1000/mm)	≥ 100	75-99	50-74	25-49	<25
Hemorragia	Ninguno	Petequias	Pérdida de sangre leve	Pérdida de sangre	Pérdida de sangre debilitante
Gastrointestinal					
Bilirrubina	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Transaminasas (SGOT SGPT)	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Fosfotasa alcalina	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Oral	Sin cambio	Dolor/eritema	Eritema, úlcera: puede comer sólidos	Úlcera: requiere solo dieta líquida	La alimentación no es posible
Náuseas/vómitos	Ninguno	Náuseas	Vómitos transitorios	Vómitos que requieren terapia	Vómitos intratables
Diarrea	Ninguno	Transitoria < 2 días	Tolerable, pero > 2 días	Intolerable, que requiere terapia	Hemorrágica, deshidratación
Renal					
Urea o creatinina en sangre	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5-10 x N*	> 10 x N*
Proteinuria	Sin cambio	1 + < 0,3 g % < 3 g/l	2- 3 + 0,3-1,0 g % 3- 10 g/l	4 + > 1,0 g % > 10 g/l	Síndrome nefrótico
Hematuria	Sin cambio	Microscópico	Craso	Craso + coágulos	Uropatía obstructiva
Pulmonar	Sin cambio	Síntomas leves	Disnea de esfuerzo	Disnea en reposo	Se requiere reposo en cama completa
Fiebre con fármacos	Ninguno	Fiebre < 38 °C	Fiebre 38-40 °C	Fiebre > 40 °C	Fiebre con hipotensión

(continuación)

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Alérgico	Sin cambio	Edema	Broncoespasmo: no se necesita terapia parenteral	Broncoespasmo: se requiere terapia parenteral	Anafilaxia
Cutáneo	Sin cambio	Eritema	Descamación seca, vesiculación, prurito	La mayoría descamación, ulceración	Dermatitis exfoliativa: necrosis que requiere intervención quirúrgica
Cabello	Sin cambio	Pérdida de cabello mínima	Moderada, alopecia irregular	Alopecia completa pero reversible	Alopecia no reversible
Infección (especificar sitio)	Ninguno	Infección menor	Infección moderada	Infección mayor	Infección mayor con hipotensión
Cardíaco					
Ritmo	Sin cambio	Taquicardia sinusal, > 110 en reposo	PVC unifocal, arritmia auricular	PVC multifocal	Taquicardia ventricular
Función	Sin cambio	Asintomático, pero signo cardíaco anormal	Disfunción sintomática transitoria: no se requiere terapia	Disfunción sintomática sensible a terapia	Disfunción sintomática que no responde a terapia
Pericarditis	Sin cambio	Derrame asintomático	Sintomático: no se requiere grifo	Taponamiento: grifo requerido	Taponamiento: cirugía requerida
Neurotoxicidad					
Estado de conciencia	Alerta	Terapia transitoria	Somnolencia < 50 % de las horas de vigilia	Somnolencia > 50 % de las horas de vigilia	Coma
Periférico	Ninguno	Parestesias y/o disminución de los reflejos tendinosos	Parestesias severas y/o debilidad leve	Parestesias intolerables y/o pérdida motora marcada	Parálisis
Estreñimiento **	Ninguno	Leve	Moderado	Distensión abdominal	Distensión y vómitos
Dolor	Ninguno	Leve	Moderado	Grave	Intratable

N\* límite superior del valor normal de la población en estudio.  
 \*\* Esto no incluye el estreñimiento resultante de narcóticos  
 + Solo se considera el dolor relacionado con el tratamiento, dolor no relacionado con la enfermedad.  
 El uso de narcóticos puede ser útil para clasificar el dolor según la tolerancia del paciente.

## CUIDADOS DE APOYO

## 5 Monitorización y tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas

Los pacientes son atendidos en salas de aislamiento con flujo de aire laminar o filtración de partículas de aire de alta eficiencia. La Anfotericina liposómica se administra a 1 mg/kg/día desde el día -5 hasta el injerto como profilaxis antifúngica. Las infecciones bacterianas se controlan semanalmente con hisopos y hemocultivos. La terapia con antibióticos intravenosa se inicia sobre la base de signos clínicos de infección ( fiebre de origen desconocido ) o hemocultivos positivos. Si el paciente sigue febril después de 72 horas, la terapia antimicótica empírica se inicia usando LAMB 3 mg/kg/día o Voriconazol 8 mg/kg/día i.v. La vancomicina se añade después de 72 horas adicionales de fiebre, o en presencia de sepsis Gram+ o hemocultivo positivo.

## 15 Profilaxis, monitorización y tratamiento de infecciones por citomegalovirus

En receptores que son seropositivos para el anticuerpo CMV, la profilaxis del CMV consiste en ganciclovir (10 mg/kg/día) entre el décimo y el segundo día antes de la infusión de células madre. El ganciclovir se reintroduce como terapia preventiva desde el día +21 hasta el día +360. La antigenemia por CMV/PCR se determina semanalmente en muestras de sangre. Si se desarrolla antigenemia por CMV/PCR, los pacientes serán tratados con ganciclovir (10 mg/kg/día) o foscarnet (180 mg/kg/día).

Los productos sanguíneos se irradian (30 Gy) antes de la transfusión.

Evaluación de laboratorio posterior al trasplante:

- 5      1. Hemogramas completos diarios hasta que los granulocitos y las plaquetas sean autosuficientes, luego tres veces/semana hasta el alta; al menos cada semana después del alta hasta el día 100 y luego cada 2 semanas a 12 meses.
- 10     2. Perfil de detección con pruebas de función hepática y renal dos veces por semana durante los primeros 30 días, luego semanalmente para descargar; más frecuentemente si está clínicamente indicado.
- 15     3. Los aspirados de médula ósea para el análisis de la morfología del quimerismo por FISH (injertos no compatibles con el sexo) o citogenética se realizarán aproximadamente a los 1, 3, 6, 12 meses y, posteriormente, cada 4 meses durante aproximadamente 3 años. Se realizarán análisis adicionales según esté clínicamente indicado. Los pacientes con CML también serán monitorizados por evidencia bcr/abl de recurrencia
- 15     4. La reconstitución inmunológica será monitorizada por ensayos *in vitro*, incluyendo análisis fenotípico de linfocitos circulantes, evaluación de la función de células citolíticas activada por el linfocito citolítico natural y la linfocina, respuestas de transformación de linfocitos a mitógenos de linfocitos T y linfocitos B y niveles de inmunoglobulina.

Seguimiento

- 20    Hasta el día +90 recuentos sanguíneos completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, función hepática y renal completa se evaluarán dos veces por semana.
- 25    Cada dos semanas hasta +90 el fenotipo de sangre periférica (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, HLADR), radiografía de pecho.

Cada dos semanas desde +90 hasta +180:  
hemogramas completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, Función hepática y renal completa.

- 30    Mensualmente:  
niveles de inmunoglobulina, electroforesis de proteínas,  
después de +90 fenotipo de sangre periférica (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, HLADR), radiografía de pecho.  
después de +180 hemogramas completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, Función hepática y renal completa.
- 35    La restauración completa de la enfermedad se realizará 2, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 meses después del trasplante, después anualmente, esto incluirá la evaluación del quimerismo del donante mediante análisis de PCR de HLA en células de sangre periférica y médula ósea.

40    Para conocer los criterios de calificación del estado de rendimiento véase la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Escala de rendimiento de Karnofsky

ESTADO FUNCIONAL	CLASIFICACIÓN	PUNTUACIONES DE GRUPO
Normal. Sin quejas. No hay evidencia de enfermedad.	100	
Capaz de continuar con la actividad normal. Signos o síntomas menores de la enfermedad.	90	Rehabilitado (80+)
Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos o síntomas de enfermedad.	80	
Se cuida uno mismo. Incapaz de realizar una actividad normal o hacer un trabajo activo.	70	Solo auto-cuidado (70-90)
Requiere asistencia ocasional, pero capaz de atender la mayoría de las necesidades.	60	
Requiere asistencia considerable y atención médica frecuente.	50	Requiere cuidador (40-69)
Incapacitado. Requiere cuidados y asistencia especiales.	40	
Gravemente discapacitado. La hospitalización está indicada, aunque la muerte no es inminente.	30	
Muy enfermo. Hospitalización necesaria.	20	Requiere institucionalización (1-39)
Moribundo. Procesos fatales progresando.	10	
Muerto.	0	

INFUSIONES PROGRAMADAS DE LINFOCITOS DE DONANTE

- Las infusiones de linfocitos de donantes (DLI) son eficaces para tratar las recaídas después de un TCMH alogénico. No obstante, el éxito DLI se ha visto limitado en cierta medida por la morbilidad y la mortalidad asociadas a la EICH.
- 5 Las dosis graduadas de linfocitos T tienen menos probabilidades de producir EICH que una sola infusión grande y parecen ser tan eficaces para inducir la remisión [Dazzi, Szydlo *et al.*, Blood, (2000) 96: 2712-6]. Un estudio reciente de búsqueda de dosis ha demostrado que  $1 \times 10^4$  linfocitos CD3+ no manipulados/kg de peso corporal del receptor pueden infundirse de forma segura en pacientes que han recibido un trasplante haploidéntico agotado de linfocitos T [Lewalle P. *et al.* Bone Marrow Transplant (2002) 29 (supl 2): S26, 0164a].
- 10 Los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana recibirán una primera dosis de  $1 \times 10^4$  células CD3+/kg de p.c. del receptor; en ausencia de EICH, la segunda infusión de  $1 \times 10^5$  células Cd3+/kg se dará 45 días después, seguidas 2 meses después por una tercera dosis de  $1 \times 10^6$  CD3+ célula/kg. Los donantes se someterán a una leucaféresis para recolectar linfocitos antes de la movilización de las células hematopoyéticas porque se ha demostrado que G-CSF tiene un efecto inmunomodulador en algunos subconjuntos de linfocitos T, disminuyendo su capacidad de respuesta a estímulos alogénicos. Los productos congelados se descongelarán e infusionarán rápidamente durante un período de 5-10 minutos. Los pacientes con EICH aguda o que no demuestran el injerto hematológico no recibirán ningún DLI.
- 15
- 20 Los pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B recidivantes recibirán rituximab  $375 \text{ mg/m}^2$  semanalmente durante 4 semanas con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab. Los pacientes con mieloma múltiple de recaída recibirán tratamiento con bortezomib ( $1,3 \text{ mg/m}^2$  en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.
- 25 No se usarán agentes inmunosupresores posteriores a DLI.

## REIVINDICACIONES

1. Ciclofosfamida para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que necesita un injerto de células o de tejido no singénicos tratado con una dosis de células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados comprenden menos de  $5 \times 10^5$  células CD3+ por kilogramo de peso corporal de un sujeto y en donde dicha dosis comprende al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal de dicho sujeto, en donde dicha ciclofosfamida ha de administrarse al sujeto después del trasplante de un injerto de células o de tejido en una cantidad terapéuticamente eficaz que comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto y además en donde dicho sujeto no se trata con profilaxis de EICH durante más de 10 días después del trasplante.
2. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto acondicionado.
3. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 2, en donde el acondicionamiento de dicho sujeto acondicionado:
- (I) está bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida que comprende un protocolo de acondicionamiento no mieloablativo, en donde dicho protocolo de acondicionamiento no mieloablativo comprende al menos uno de una irradiación corporal total (TBI), una irradiación linfoide total (TLI), un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos, y opcionalmente en donde:
- (i) dicho TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo seleccionado del grupo que consiste en 1-4 Gy; o
- (ii) dicho agente quimioterapéutico comprende al menos uno de Busulfán, Fludarabina, Melfalán y Tiopeta; o
- (iii) dicho anticuerpo comprende al menos uno de un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo antitimocito globulina (ATG) y un anticuerpo anti-CD3 (OKT3);
- o
- (II) en donde el sujeto se ha sometido a una reducción en volumen de linfocitos T *in vivo*, en donde dicha reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* se efectúa mediante anticuerpos.
4. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto:
- (i) tiene una enfermedad maligna y opcionalmente en donde dicha enfermedad maligna es un cáncer hematopoyético; o
- (ii) tiene una enfermedad no maligna y opcionalmente en donde dicha enfermedad no maligna es una enfermedad o trastorno genético, una anomalía hematopoyética, una enfermedad autoinmune o un trastorno metabólico.
5. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 2 o 3, en donde dicho sujeto necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.
6. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1 o 5, en donde una dosis de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprende aproximadamente  $5 - 40 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
7. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1 o 5, en donde dicha concentración de dicha ciclofosfamida es de aproximadamente 100 - 200 mg por kg de peso corporal.
8. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, que comprende además un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, en donde dicho protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterapéutico y además en donde dicho sujeto necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.
9. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 8, en donde dicha TBI:
- (i) comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-4 Gy; o
- (ii) se efectúa en una dosis única 1 o 2 días antes de dicha dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.
10. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 8, en donde dicho agente quimioterapéutico comprende Fludarabina y opcionalmente en donde dicha Fludarabina se efectúa a una dosis de  $30 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ .
11. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, 5 u 8, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T:
- (i) se obtienen mediante reducción en volumen de linfocitos T y opcionalmente en donde dicha reducción en

volumen de células T se efectúa mediante anticuerpos; o  
(ii) se obtienen de un donante no singénico.

- 5        12. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, 5 u 8, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras se tratan mediante reducción en volumen de linfocitos B.
- 10      13. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, para inducir tolerancia específica de donante en dicho sujeto en necesidad de dicho injerto de células o de tejido no singénicos.
- 15      14. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1 o 13, en donde dicho injerto de células o de tejido:  
          (i) se selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas inmaduras, un órgano o tejido de hígado, de páncreas, de bazo, de riñón, de corazón, de pulmón, de piel, de intestino y linfoide/hematopoyético; o  
          (ii) comprende un co-trasplante de varios órganos.
- 20      15. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1 o 13, en donde dicho injerto de células o tejidos y dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen del mismo donante.
- 25      16. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, 5 o 13, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de  $1 \times 10^6$  células CD8+ TCR $\alpha/\beta$  negativas por kilogramo de peso corporal del sujeto.
17. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 1, en donde dicha ciclofosfamida ha de administrarse al sujeto en dos dosis 3 y 4 días después del trasplante.
18. Ciclofosfamida para su uso de la reivindicación 17, en donde cada una de dichas dos dosis comprende una concentración de 50 mg por kg de peso corporal.

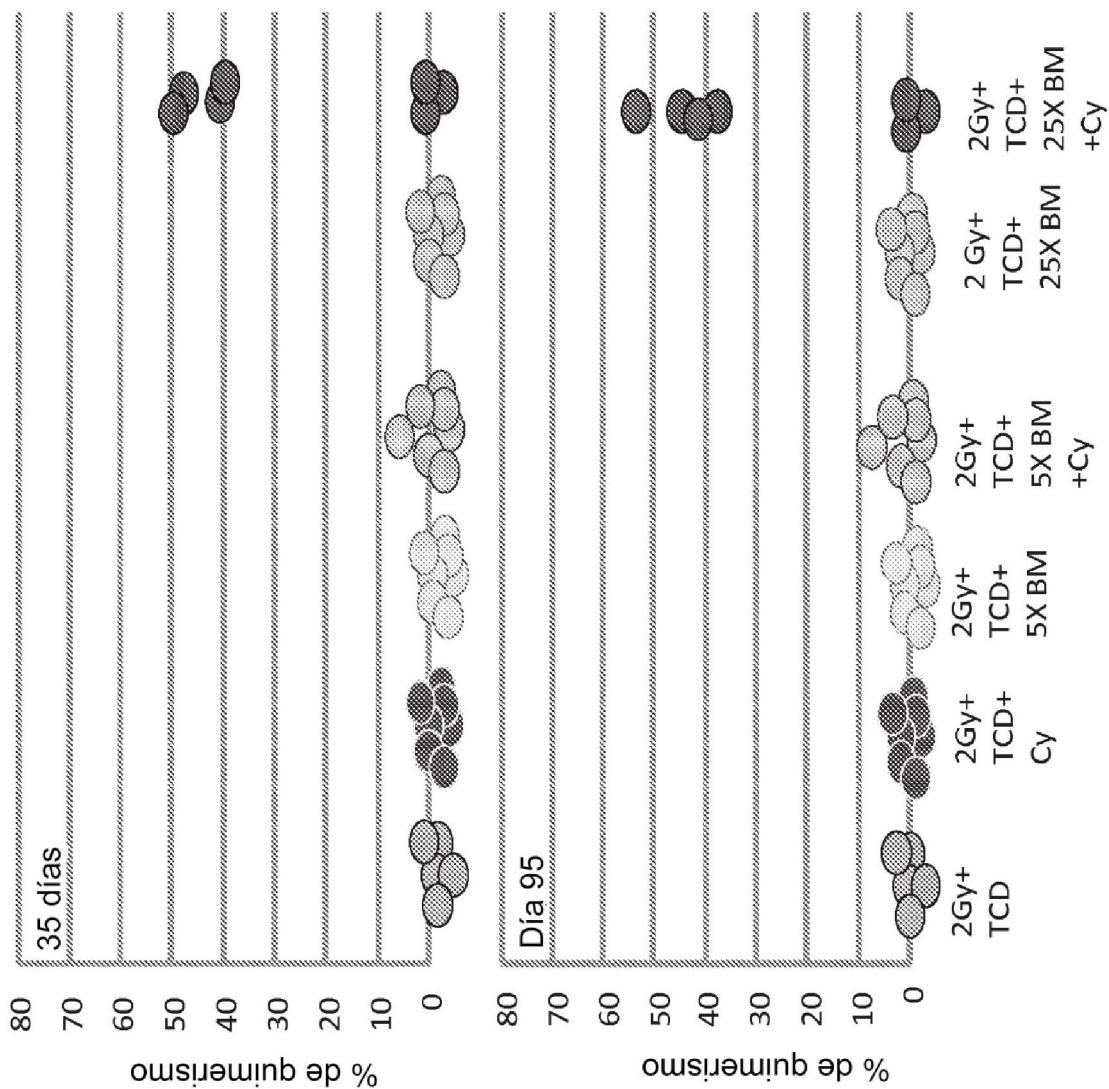


FIG. 1B

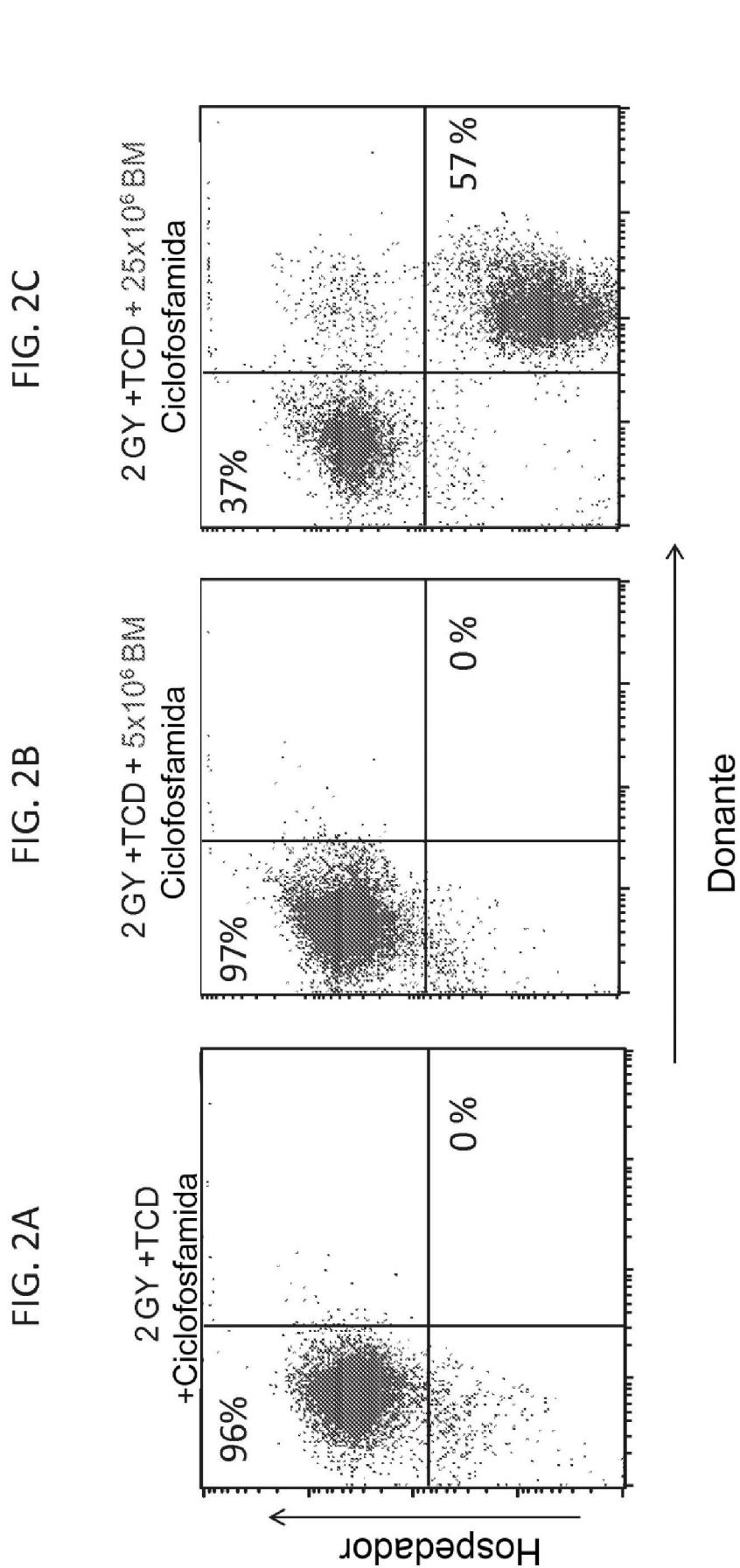


FIG. 3

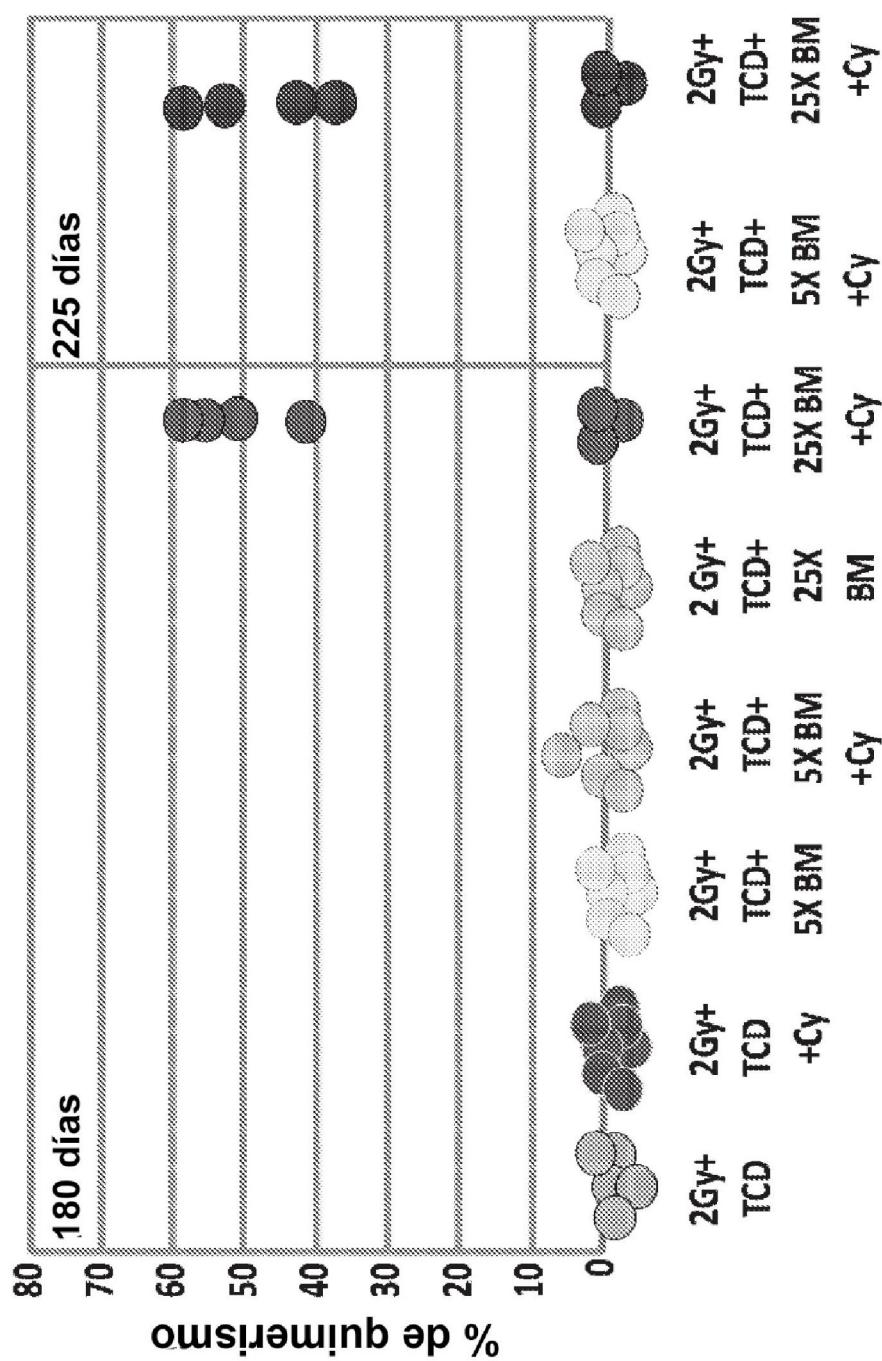


FIG. 4A

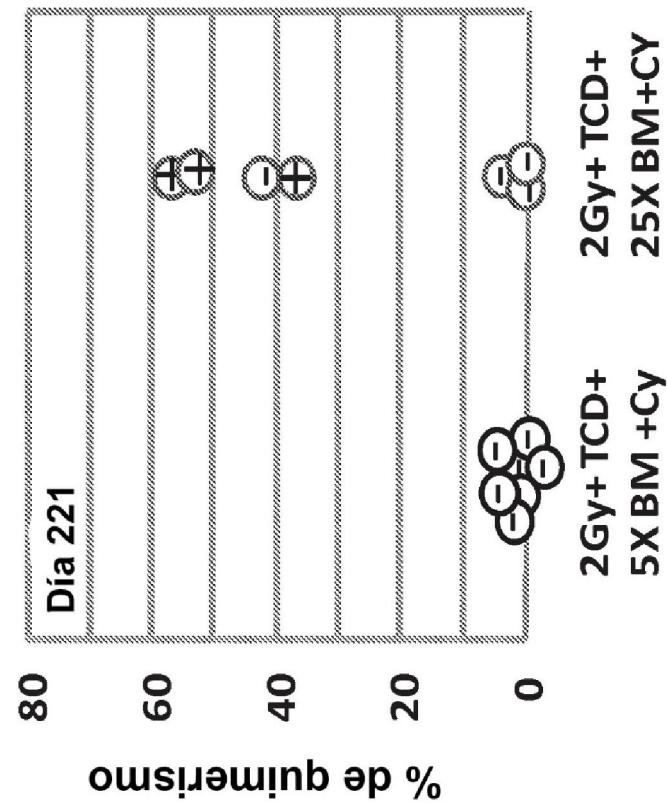


FIG. 4B

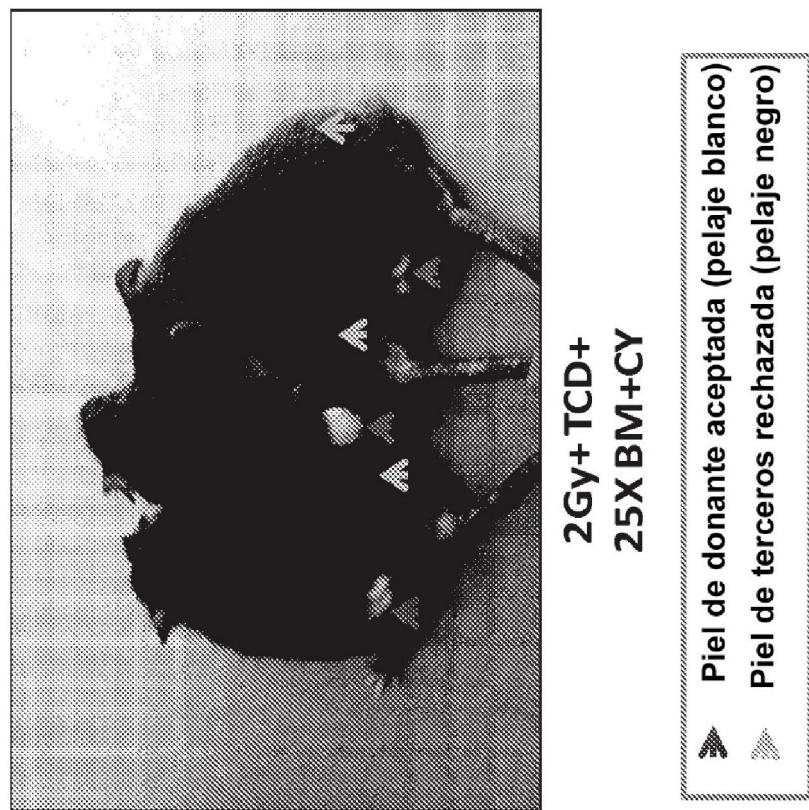


FIG. 5

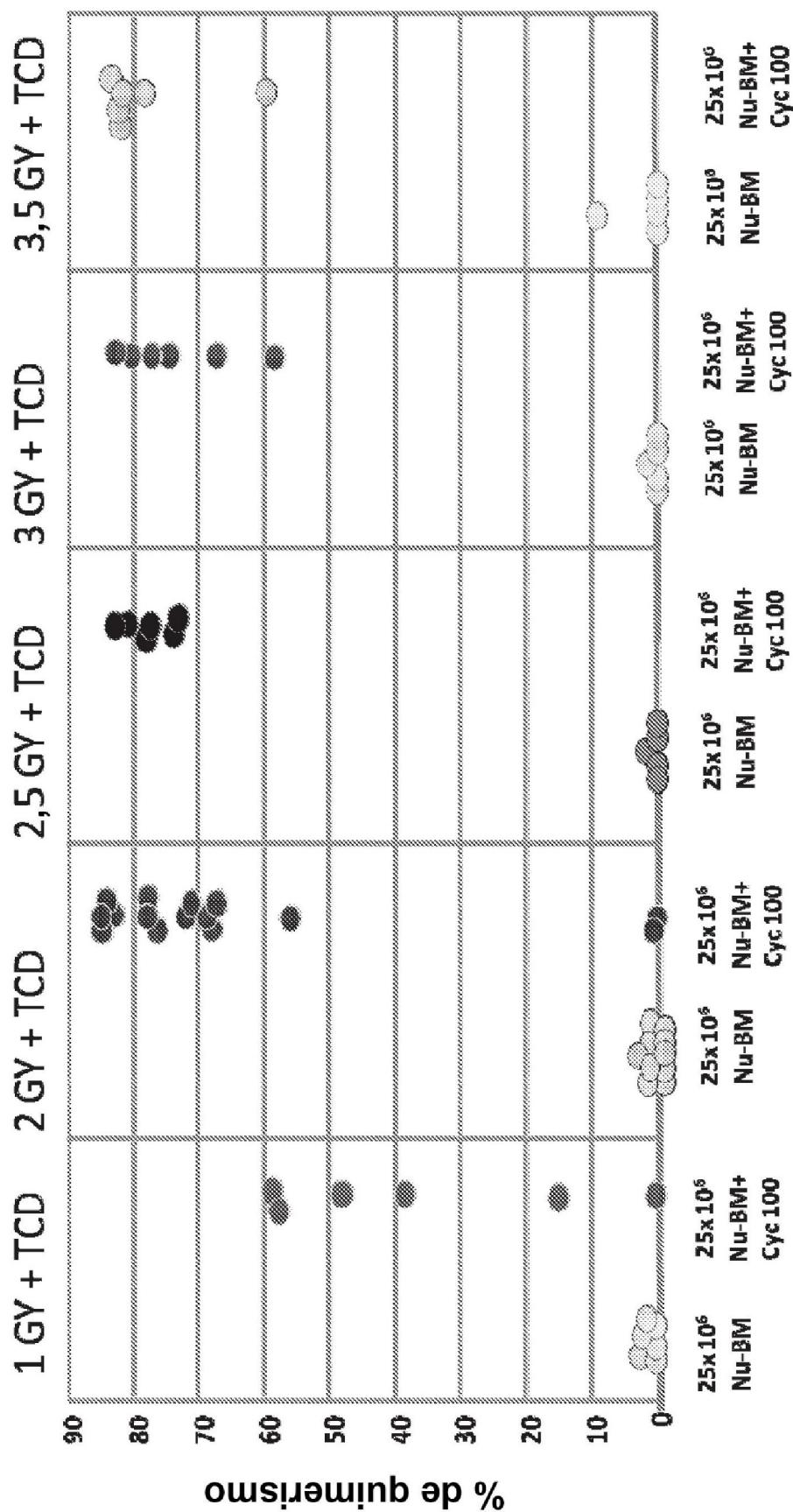


FIG. 6

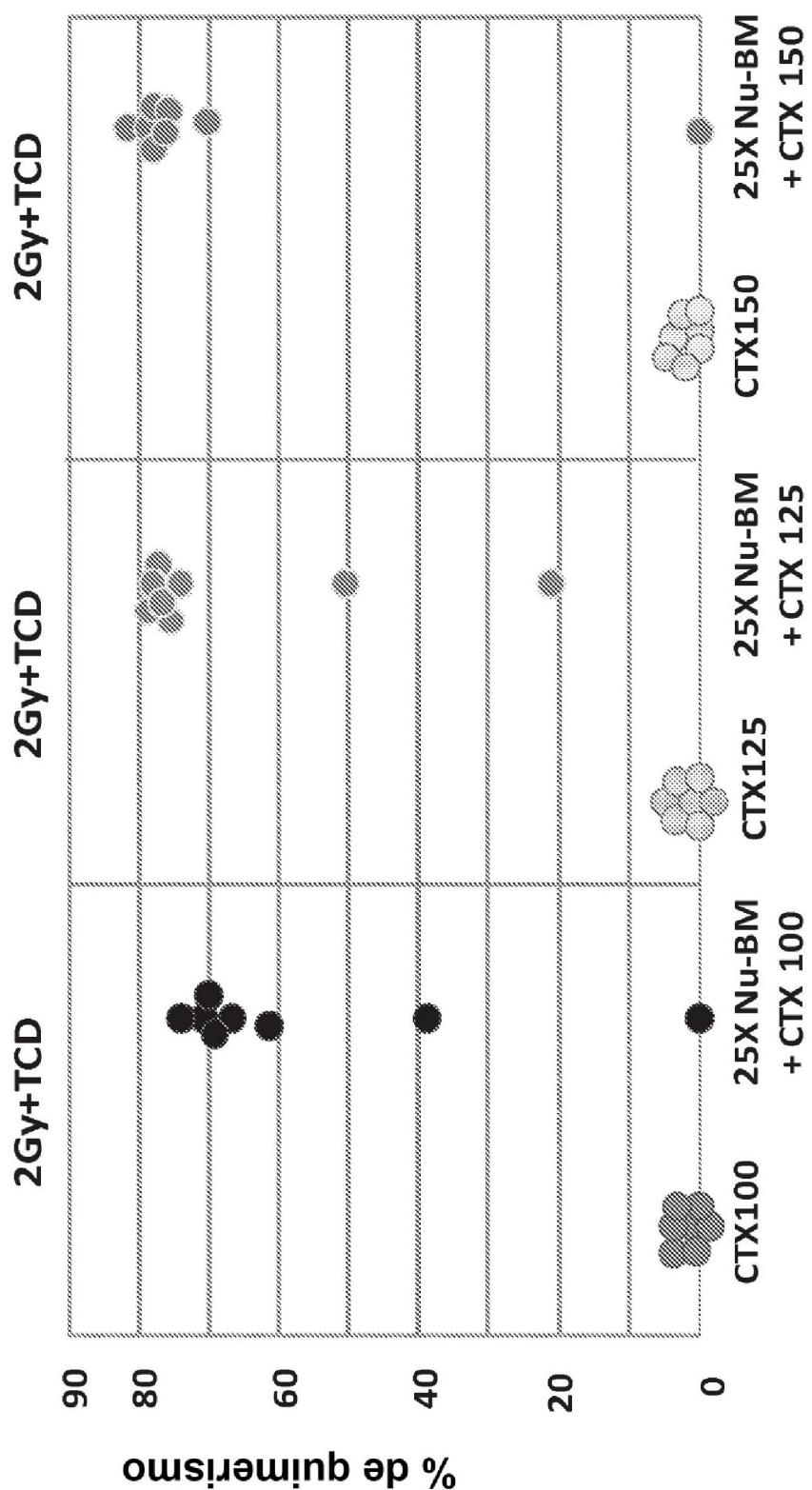


FIG. 7

