

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 387**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14	(2015.01)	C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 35/17	(2015.01)		
A61K 35/28	(2015.01)		
A61P 37/06	(2006.01)		
C12N 5/02	(2006.01)		
A61K 38/19	(2006.01)		
A61K 31/436	(2006.01)		
A61K 31/5377	(2006.01)		
A61K 31/675	(2006.01)		
C12N 5/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2016** **PCT/US2016/048738**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017** **WO17035375**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2016** **E 16840139 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024** **EP 3340997**

54 Título: **Procedimientos para el trasplante de células madre**

30 Prioridad:

25.08.2015 US 201562209721 P

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

29.10.2024

73 Titular/es:

THE UAB RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
1720 2nd Avenue SouthCSB 120
Birmingham AL 35294, US

72 Inventor/es:

LAMB, LAWRENCE S.;
MINEISHI, SHIN y
SAAD, AYMAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 984 387 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

Procedimientos para el trasplante de células madre

Antecedentes

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo TCMH) es un tratamiento potencialmente curativo para muchos pacientes con neoplasias hematológicas.¹ La fuente clínicamente preferida de células madre es un donante hermano compatible con antígeno leucocitario humano (ALH) o un donante no relacionado con ALH compatible.² Desafortunadamente, muchos pacientes, particularmente los de grupos étnicos minoritarios, no tienen un hermano o un donante no relacionado con ALH compatible. Las búsquedas en el registro también pueden llevar un tiempo inadecuado en algunos pacientes de alto riesgo. Por lo tanto, se han utilizado clínicamente fuentes alternativas de injertos de TCMH. Estas opciones incluyen el uso de células donantes de un miembro de la familia con ALH parcialmente compatible (haploidéntico)³.

Se ha demostrado que el TCMH haploidéntico logra la supervivencia y la curación a largo plazo en pacientes que requieren un TCMH alogénico sin un donante compatible con ALH.³ Sin embargo, el éxito del TCMH haploidéntico se ha visto obstaculizado por múltiples complicaciones. La disparidad de ALH entre el donante y el receptor puede inducir altos riesgos de rechazo del injerto, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) y reconstitución inmune retrasada con complicaciones infecciosas posteriores.⁴ El uso de regímenes de inmunosupresión intensa (para prevenir la GvHD) puede, al menos en teoría, anular el efecto de injerto contra tumor (GvT) que augura un mayor riesgo de recaída de la enfermedad. Se ha demostrado que el efecto GvT después del alo TCMH se correlaciona con un menor riesgo de recaída.^{5,6} Por lo tanto, las células T del donante infundidas pueden tener efectos beneficiosos (injerto, reconstitución inmune y GvT) y también ejercer un efecto dañino (y a veces fatal) de GvHD. Por estas razones, los investigadores han buscado formas de diseñar terapias celulares que proporcionen la proporción óptima de subconjuntos de células T que puedan proporcionar un número suficiente de células para mantener el injerto y optimizar el efecto GvT, mientras se minimizan las células T alo-reactivas que pueden conducir a GvHD.

E. RADESTAD *et al.* ("Alpha/Beta T-Cell Depleted Grafts as an Immunological Booster to Treat Graft Failure after Hematopoietic Stem Cell Transplantation with ALH-Matched Related and Unrelated Donors", JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2014, 1 de enero de 2014 (2014-01-01), páginas 1-14) describe el tratamiento del fracaso del injerto postrasplante y la administración de células madre hematopoyéticas empobrecidas en células $\alpha\beta$ -T como refuerzo.

El documento US2001 051151 A1 describe la generación de células T V δ 1 y δ mediante el agotamiento inmunomagnético de células CD4+ y CD8+.

La presente descripción proporciona procedimientos y composiciones útiles en el TCMH que maximizan un efecto beneficioso de las células T del donante infundidas (que incluyen, entre otros, injerto, reconstitución inmunitaria y GvT) al tiempo que minimizan un efecto dañino (como, entre otros, GvHD).

Resumen de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 Muestra una realización de un régimen preparativo para enfermedades mieloides usando Fludarabina/Busulfán/ICT.

La Figura 2 Muestra una realización de un régimen preparativo para pacientes con LLA o linfoma de 40 años o menos usando ICT/ciclofosfamida.

La Figura 3 Muestra una realización de un régimen preparativo para pacientes con LLA o linfoma mayores de 40 años o a cualquier edad con comorbilidades importantes.

Descripción detallada

Definiciones

Como se usa en esta invención, el término "mínimamente manipulado" significa que el grupo de CMSP aisladas de un donante (tal como un donante haploidéntico) no está sujeto a procedimientos o métodos que alteren las características biológicas relevantes de la célula. El acto de eliminar una parte de las CMSP del conjunto de CMSP aisladas de un donante (tal como para producir un producto de células T y δ) como se describe en la presente memoria u otras etapas de rutina en la preparación, procesamiento y/o almacenamiento del conjunto de CMSP (tal como, pero sin limitarse a, separación por gradiente de densidad, selección celular, centrifugación y crioconservación) da como resultado un conjunto de CMSP que todavía está "mínimamente manipulado" ya que el muestreo no enriquece y/o agota una población particular de células. En un aspecto particular, el grupo de CMSP aisladas de un donante (como un donante haploidéntico) no está sujeto a procedimientos o métodos que enriquezcan y/o agoten una población particular de

células (como, pero sin limitarse a, células T $\gamma\delta$) del grupo de CMSP antes de la administración al sujeto.

Como se emplea en esta memoria, el término "agotado en" significa que la cantidad o concentración de un tipo de célula particular en una población de células ha disminuido (por ejemplo, como resultado de una manipulación o procedimiento particular) desde un nivel original inicial hasta un segundo nivel reducido. El término no requiere una eliminación completa del tipo de célula en particular de la población de células. Como ejemplo, una población de células T se "agota" en células T $\alpha\beta$ si la cantidad o concentración de células T $\alpha\beta$ en una composición administrada a un sujeto disminuye en comparación con la cantidad o concentración de células T $\alpha\beta$ originalmente presentes (tal como en un grupo de CMSP obtenidas de un donante).

Como se emplea en esta memoria, el término "enriquecido en" significa que la cantidad o concentración de un tipo de célula particular en una población de células se ha aumentado (por ejemplo, como resultado de una manipulación o procedimiento particular) desde un nivel original inicial a un segundo nivel más alto. Como ejemplo, una población de células T se "enriquece en" células T $\gamma\delta$ si la cantidad o concentración de células T $\gamma\delta$ en una composición administrada a un sujeto aumenta en comparación con la cantidad o concentración de células T $\gamma\delta$ originalmente presentes (tal como en un grupo de CMSP obtenidas de un donante).

Descripción general

La mayoría (~ 80 %) de los linfocitos del donante infundidos son células T (otras células infundidas son células B y células NK). Se ha demostrado que las células T son el actor clave en los fenómenos inmunitarios posteriores al trasplante (injerto de células madre, GvHD, GVT y reconstitución inmunitaria), y es probable que las células B y las células NK contribuyan con funciones de apoyo (1, 7). La mayoría (~ 95 %) de las células T porta receptores de células T alfa-beta ($\alpha\beta$ -TCR); denominados células T alfa-beta (células T $\alpha\beta$). Una pequeña proporción de células T llevan un receptor de células T diferente, $\gamma\delta$ -TCR, denominado células T gammadelta (células T $\gamma\delta$)

Se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ tienen una actividad antitumoral. Se considera que son una parte del sistema inmune innato que previene el desarrollo de nuevo cáncer y también protege de las infecciones a través de la función de vigilancia inmune (8). A diferencia del subtipo común de células T, las células T $\alpha\beta$, las células T $\gamma\delta$ no requieren reconocimiento de antígenos para matar células malignas (9). Por lo tanto, se han recomendado para su uso contra el cáncer (9). Las células NK, otro tipo de células inmunitarias innatas, también han demostrado tener un efecto antitumoral y promover la reconstitución inmunitaria después de HCT sin aumentar el riesgo de GvHD (10, 11).

Se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ tienen un efecto antileucémico en el trasplante parcialmente no compatible sin aumentar el riesgo de GvHD (12, 13). En un análisis retrospectivo, la supervivencia libre de leucemia (SLL) a 5 años y la supervivencia global (SG) fue mayor en los pacientes que se recuperaron con un aumento de las células T $\gamma\delta$ en comparación con aquellos con números normales o disminuidos; 54 frente al 19 % ($P < 0,0003$) y 71 frente al 20 % ($P < 0,0001$), respectivamente. No hubo diferencias en la incidencia de GvHD en ambos grupos ($P = 0,96$) (14). Handgretenger et al. utilizaron el agotamiento de células T $\alpha\beta$ para preservar las células T $\gamma\delta$ con HCT haploidéntico. Estos estudios mostraron un rápido injerto con una rápida reconstitución inmune (8, 15).

Los pacientes con trasplante haploidéntico se están reuniendo actualmente en un ensayo de Fase I en el que los pacientes reciben ciclofosfamida (CY) postrasplante después de un injerto mínimamente manipulado. Un segundo injerto del mismo donante se agota selectivamente de células T $\alpha\beta$ y se infunde en el día +7 del TCMH posterior. Hasta este punto, tres pacientes se han inscrito en el estudio sin evidencia de GvHD.

A diferencia de las células T $\alpha\beta$ que reconocen antígenos peptídicos procesados específicos presentados en moléculas MHC por células presentadoras de antígenos (CPA), las células T $\gamma\delta$ parecen reconocer y responder directamente a una variedad de autoantígenos inducidos por estrés de tipo MHC expresados por células malignas (12-16). Por lo tanto, las células T $\gamma\delta$ pueden reconocer células malignas a través de mecanismos menos específicos que no requieren exposición previa al antígeno o cebado, una función que es compartida por otras células inmunes innatas como los macrófagos y las células NK (8).

Estudios en animales y la evidencia indirecta de estudios de trasplante alogénico humano sugieren que las células T $\gamma\delta$ pueden facilitar el aloinjerto. Blazar (23), en un modelo de trasplante alogénico murino, encontró que las células T $\gamma\delta$ del donante facilitan el injerto de médula ósea del donante con células T agotadas (CTA). Cuando la médula del donante CTA C.B-17^{scid/scid} se complementó con hasta 3×10^6 células T $\gamma\delta$ antes de la infusión en receptores B6, el quimerismo del donante aumentó en aproximadamente un 40 %. Drobyski observó hallazgos similares en ratones no compatibles C57BL/6 [H-2^b] – B1-BR [H-2^k] (24), y más tarde mostró que la dosis de células T $\gamma\delta$ necesaria para facilitar el injerto no dio como resultado GvHD murina letal (25). Niepp (26) mostró hallazgos similares en un modelo de rata en el que las ratas irradiadas letalmente (Wistar Furth WF-RTIA) se reconstituyeron con 1×10^8 CTA $\alpha\beta$ de médula ósea. Todos los animales se injertaron con una media de 92 ± 4 % de células donantes y sin evidencia clínica de GvHD. Estudios que comparan a los pacientes que recibieron injertos de CTA $\alpha\beta$ con los que recibieron injertos pan-CTA también muestran una asociación positiva entre el número de células T $\gamma\delta$ clonables en el injerto con menos tiempo hasta el injerto (27, 28).

Células T γδ no inician GvHD

Tanto los estudios en murinos como en humanos sugieren que las células T γδ no son iniciadores primarios de GvHD y, de hecho, pueden modular la actividad de GvHD de las células T αβ. Drobyski (25) mostró que se podían infundir grandes dosis de células T γδ expandidas con IL-2 en ratones dispares con MHC irradiados letalmente (C57BL/6 [H-2^b] a BIO.BR [H-2k] y C57BL/6 [H-2^b] a B6D2F1 [H-2^{b/d}]) sin causar GvHD. Ellison (29) señaló que las células T γδ se activaron en la reacción de GvHD, pero no encontró evidencia de que la GvHD fuera iniciada por las células T γδ. Este trabajo está de acuerdo con estudios posteriores de Drobyski (25) que mostraron que aunque las células T γδ activadas y las células T αβ vírgenes exacerbaban la GvHD cuando se infundieron juntas, retrasar la infusión de células T αβ en dos semanas dio como resultado una mejor supervivencia. En estudios en humanos, Schilbach (30) y Lamb (31) encontraron que las células T γδ no se activan sustancialmente en el cultivo de linfocitos mixtos alogénicos *in vitro*. Varios estudios post-TMO han mostrado aumentos transitorios en las células T γδ (32-34), pero no han asociado este hallazgo con GvHD, aunque Tsuji (35) encontró que las células T γδ podrían ser reclutadas en lesiones y activadas por células T CD4⁺ αβ. Varios estudios que comparan los resultados de los pacientes que recibieron injertos de CTA αβ con los pacientes que recibieron injertos de pan-CTA muestran una menor incidencia de GvHD en el grupo de CTA αβ, lo que sugiere que la infusión de células T γδ en el injerto no somete al paciente a un mayor riesgo de GvHD (36, 37). Sin embargo, aún no se ha probado si las células T γδ tienen realmente menos probabilidades de contribuir al desarrollo de GvHD.

Los datos de supervivencia a seis años de 25 pacientes que desarrollaron un aumento espontáneo de células T γδ durante el primer año después del Trasplante de Médula Ósea (TMO) para LLA o LMA muestran una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en comparación con pacientes de riesgo similar (p = 0,009 para los pacientes ALL y ,045 para pacientes con LMA) (12, 38). Un hallazgo del estudio fue la persistencia de un mayor número de células T Vδ1+ γδ en pacientes sobrevivientes, a veces durante varios años. La persistencia de las células depende del procedimiento de agotamiento de las células T, ya que los pacientes que recibieron injertos agotados de células T αβ tenían más probabilidades de desarrollar y mantener un mayor número de células T γδ que los pacientes que recibieron injertos que se agotaron con OKT3, un anticuerpo monoclonal de células T pan (p = 0,05) (38).

La administración de CY dentro de unos pocos días después de la infusión de HCT repleto de células T agota las células T alo-reactivas tanto del donante como del huésped, inhibiendo así tanto la GvHD como el rechazo del injerto, respectivamente (17-21). Se plantea la hipótesis de que las dosis altas de CY pueden agotar las células T alo-reactivas proliferantes, evitando las células T no proliferativas (inactivas) (21). El uso de ciclofosfamida postrasplante después de HCT haploidéntico ha mostrado resultados prometedores por investigadores de la Universidad Johns Hopkins y el Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson (22). El resultado más desafortunado de este enfoque siguió siendo la alta tasa de recaída del 51 % a 1 año (23). La Red de Ensayos Clínicos de Trasplante de Médula Ósea (TMO-REC) realizó un ensayo clínico (REC 0603) utilizando el mismo enfoque de HCT haploidéntico con una tasa de recaída informada del 45 % (24). Por lo tanto, a pesar de la reducción de la GvHD utilizando este enfoque en HCT haploidénticos, el alto riesgo de recaída (45-51 %) siguió siendo un desafío. El mayor riesgo de recaída puede deberse a la falta de un efecto eficaz del injerto frente al tumor. Es particularmente evidente con el uso de regímenes no mieloablativos, ya que el efecto de injerto contra leucemia (GVL) es el único efecto antitumoral en este entorno.

Procedimientos de TCMH

La presente descripción proporciona procedimientos no reivindicados de TCMH. Aunque los procedimientos descritos a continuación no se reivindican, las composiciones para su uso en dichos procedimientos se reivindican donde se definen en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la presente descripción proporciona un procedimiento de TCMH utilizando una combinación de un procedimiento de agotamiento de células T *in vivo* (por ejemplo, ciclofosfamida posterior al trasplante), con un procedimiento ex vivo de expansión de células T γδ y agotamiento de células T αβ (utilizando, por ejemplo, el sistema CLINIMACS®). El agotamiento de las células T *in vivo* (por ejemplo, la infusión de CY después de la infusión de un injerto de células madre mínimamente manipulado) agota (*in vivo*) las células T alo-reactivas que de otro modo aumentarían el riesgo de GvHD. El producto de células T γδ expandidas/activadas ex vivo se agotará selectivamente de células T αβ, pero también incluirá una población secundaria de células NK.

En una realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas haploidénticas que comprende CMSP; ii) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; iii) expandir opcionalmente una población de células T γδ *ex vivo*; y iv) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende células T enriquecidas en células T γδ y agotadas en células T αβ.

En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas haploidénticas mínimamente manipulada que comprende CMSP; ii) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; iii) expandir opcionalmente una población de células T γδ *ex vivo*; y iv) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende células T enriquecidas en células T γδ y agotadas en células T αβ.

En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) administrar a un sujeto el día 0 una

infusión de injerto de células madre hematopoyéticas haploidénticas que comprende CMSP; ii) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; iii) expandir una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo*; iv) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende la población expandida de células T $\gamma\delta$, donde la población expandida de células T $\gamma\delta$ está enriquecida en células T $\gamma\delta$ y agotada en células T $\alpha\beta$.

5 En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas haploidénticas mínimamente manipulada que comprende CMSP; ii) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; iii) expandir una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo*; iv) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende la población expandida de células T $\gamma\delta$, donde la población expandida de células T $\gamma\delta$ está enriquecida en células T $\gamma\delta$ y agotada en células T $\alpha\beta$.

10 En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) obtener un conjunto de CMSP de un donante haploidéntico; ii) dividir el conjunto de CMSP en una primera porción de CMSP para proporcionar un producto de CMSP y una segunda porción de CMSP que se manipula para proporcionar un producto de células T $\gamma\delta$ que está enriquecido en células T $\gamma\delta$ y agotado en células T $\alpha\beta$; iii) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas que comprende el producto de CMSP; iv) administrar al sujeto un agente que
15 proporciona agotamiento de células T *in vivo*; v) expandir opcionalmente una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo* en el producto de células T $\gamma\delta$ y vi) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende el producto de células T $\gamma\delta$.

En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) obtener un conjunto de CMSP de un donante haploidéntico; ii) dividir el conjunto de CMSP en una primera porción de CMSP que se manipula mínimamente
20 para proporcionar un producto de CMSP y una segunda porción de CMSP que se manipula para proporcionar un producto de células T $\gamma\delta$ que está enriquecido en células T $\gamma\delta$ y agotado en células T $\alpha\beta$; iii) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas que comprende el producto de CMSP; iv) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; v) expandir opcionalmente una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo* en el producto de células T $\gamma\delta$ y vi) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que
25 comprende el producto de células T $\gamma\delta$.

En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) obtener un conjunto de CMSP de un donante haploidéntico; ii) dividir el conjunto de CMSP en una primera porción de CMSP para proporcionar un producto de CMSP y una segunda porción de CMSP que se manipula para proporcionar un producto de células T $\gamma\delta$ que está enriquecido en células T $\gamma\delta$ y agotado en células T $\alpha\beta$; iii) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas que comprende el producto de CMSP; iv) administrar al sujeto un agente que
30 proporciona agotamiento de células T *in vivo*; v) expandir una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo* en el producto de células T $\gamma\delta$ y vi) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende el producto de células T $\gamma\delta$.

En otra realización no reivindicada, el procedimiento de TCMH comprende: i) obtener un conjunto de CMSP de un donante haploidéntico; ii) dividir el conjunto de CMSP en una primera porción de CMSP que se manipula mínimamente
35 para proporcionar un producto de CMSP y una segunda porción de CMSP que se manipula para proporcionar un producto de células T $\gamma\delta$ que está enriquecido en células T $\gamma\delta$ y agotado en células T $\alpha\beta$; iii) administrar a un sujeto el día 0 una infusión de injerto de células madre hematopoyéticas que comprende el producto de CMSP; iv) administrar al sujeto un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo*; v) expandir una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo* en el producto de células T $\gamma\delta$ y vi) administrar al sujeto una segunda infusión de injerto que comprende el producto de células T $\gamma\delta$.
40

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende administrar a un sujeto una infusión de CMSP haploidéntica el día 0 seguido de una infusión de células T $\gamma\delta$ de +7 a más +25 días. Una composición para uso en dicho régimen se define en las reivindicaciones.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además administrar
45 un régimen de quimioterapia preparativa antes del día 0. En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además administrar un protocolo de agotamiento de células T después del día 0. En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además administrar un régimen de profilaxis de GvHD después del día 0.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además administrar
50 un factor de crecimiento después del día 0.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además una combinación de al menos dos de: (i) administrar un régimen de quimioterapia preparativa antes del día 0; (ii) administrar un protocolo de agotamiento de células T después del día 0; (iii) administrar un régimen de profilaxis de GvHD después del día 0; y (iv) administrar un factor de crecimiento después del día 0.

55 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además una combinación de al menos tres de: (i) administrar un régimen de quimioterapia preparativa antes del día 0; (ii) administrar un protocolo de agotamiento de células T después del día 0; (iii) administrar un régimen de profilaxis de GvHD después del día 0; y (iv) administrar un factor de crecimiento después del día 0.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento comprende además una combinación de cada uno de: (i) administrar un régimen de quimioterapia preparativa antes del día 0; (ii) administrar un protocolo de agotamiento de células T después del día 0; (iii) administrar un régimen de profilaxis de GvHD después del día 0; y (iv) administrar un factor de crecimiento después del día 0.

5 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, el procedimiento descrito de TCMH maximizará un efecto beneficioso de las células T del donante infundidas (que incluyen, entre otros, injerto, reconstitución inmunitaria y GvT). En otra realización de cualquiera de las anteriores, el procedimiento descrito de TCMH minimizará un efecto dañino de las células T del donante infundidas (tal como, entre otros, GvHD). En otra realización de cualquiera de las anteriores, se logra una combinación de los anteriores mediante el procedimiento.

10 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, los injertos de CMSP se recolectan de donantes haploidénticos y el producto celular se divide en un producto HCT mínimamente manipulado que se administrará el día del trasplante (como es estándar en TCMH) y un producto de células T $\gamma\delta$ que se administrará hasta 25 días después del trasplante, por ejemplo, en una realización, ≥ 3 días después. Usando los procedimientos de la presente descripción, el refuerzo de las células T $\gamma\delta$ (mediante infusión) después de la reducción posterior al trasplante de células T alo-reactivas que causan GvHD con una rápida disminución de la inmunosupresión disminuirá el riesgo de recaída de neoplasia maligna hematológica después de HCT haploidéntico.

15 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, la cantidad de CMSP infundidas en la infusión de injerto de células madre hematopoyéticas haploidénticas es como se conoce en la técnica. La selección de la cantidad de células a infundir puede depender de una cantidad de factores como se conoce en la técnica, tales como, entre otros, la enfermedad o afección a tratar y la afección del sujeto. En una realización de cualquiera de las anteriores, se infunden hasta 5×10^8 células T $\gamma\delta$ en la segunda infusión de injerto. En una realización cualquiera de las anteriores, se infunden 1×10^7 células T $\gamma\delta$ en la segunda infusión de injerto. En una realización de cualquiera de las anteriores, se infunden hasta 5×10^6 células T $\gamma\delta$ en la segunda infusión de injerto. En una realización de cualquiera de las anteriores, se infunden hasta 5×10^8 células T $\gamma\delta/\text{kg}$ en la segunda infusión de injerto. En una realización, cualquiera de las anteriores, se infunden 1×10^7 células T $\gamma\delta/\text{kg}$ en la segunda infusión de injerto. En una realización de cualquiera de las anteriores, se infunden hasta 5×10^6 células T $\gamma\delta/\text{kg}$ en la segunda infusión de injerto. La selección de la cantidad de células a infundir puede depender de una cantidad de factores como se conoce en la técnica, tales como, entre otros, la enfermedad o afección a tratar y la afección del sujeto.

25 En una realización no reivindicada, la segunda infusión de injerto o el producto de células T $\gamma\delta$ contiene $\geq 60\%$ de células T $\gamma\delta$. En una realización, la segunda infusión de injerto o el producto de células T $\gamma\delta$ contiene $\geq 60\%$ de células T $\gamma\delta$ y $\leq 5\%$ de $\alpha\beta$ T. En una realización, la segunda infusión de injerto o el producto de células T $\gamma\delta$ contiene $\geq 60\%$ de células T $\gamma\delta$, $\leq 5\%$ de células T $\alpha\beta$ y $\leq 25\%$ de células NK.

30 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, los procedimientos de la presente descripción pueden usarse junto con cualquier afección para la que se use el TCMH. En otra realización de cualquiera de las anteriores, la condición se selecciona de uno de lo siguiente: (i) pacientes con trastornos hematológicos neoplásicos con indicación de trasplante alogénico de acuerdo con la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN) u otras pautas estándar de la siguiente manera; (a) leucemia linfoblástica aguda [LLA]²⁵ con características de alto riesgo o enfermedad recidivante (LLA recidivante); (b) Hodgkin²⁶ o linfoma no Hodgkin²⁷ [LH o LNH]; enfermedad recidivante donde la duración de la remisión es inferior a 1 año, recidiva después de un trasplante autólogo previo o fracaso para lograr una respuesta completa (RC) con quimioterapia; y (c) neoplasia maligna mieloide (como, por ejemplo, leucemia mieloide aguda [LMA]²⁸ con características de riesgo intermedio/alto (según los criterios de NCCN) o enfermedad recidivante, O leucemia mieloide crónica [CMI]²⁹ en remisión hematológica o fase crónica).²⁸; (ii) trastorno mieloide (como, por ejemplo, síndrome mielodisplásico [SMD]³⁰ con características de riesgo intermedio/alto o enfermedad refractaria o trastorno mieloproliferativo; características primarias o secundarias de alto riesgo o enfermedad refractaria)³¹ y (iii) otras afecciones, como, entre otras, astrocitoma, ATRT (tumor raboide teratoide atípico), glioma del tronco encefálico, tumores del plexo coroideo, carcinoma y papiloma, craneofaringioma, astrocitoma infantil desmoplásico, germen tumor celular, meduloblastoma, neurofibromatosis, oligodendroglioma, glioma óptico, neuroblastoma, sarcoma de Ewing y PNet (tumor neuroectodérmico primitivo). Las composiciones para su uso en el tratamiento de las enfermedades y afecciones anteriores se definen en las reivindicaciones.

35 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, los procedimientos de la presente descripción pueden usarse junto con un régimen de quimioterapia preparativa. En una realización no reivindicada, el régimen de quimioterapia preparativa es cualquiera conocido en la técnica. En otra realización, el régimen de quimioterapia preparativa es uno de los siguientes (cada uno de los cuales se describe en la sección de procedimientos de la presente): (i) para enfermedades mieloides, se puede usar la terapia preparativa de fludarabina/busulfán/irradiación corporal total; (ii) para pacientes hospitalizados con LLA, o LNH o LH agresivos ≤ 40 años de edad sin comorbilidades importantes, se puede usar el régimen preparativo de irradiación corporal total/ciclofosfamida (ICT/CY); o (iii) para LLA o linfoma en pacientes mayores de 40 años, o a cualquier edad con comorbilidades importantes que presagien una alta mortalidad sin recaída (MSR) con Cy/ICT de alta intensidad, se puede usar el régimen preparativo de fludarabina/ ICT.

40 En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, los procedimientos de la presente descripción se utilizan en combinación con un protocolo de agotamiento de células T in vivo. En una realización, se puede utilizar

cualquier protocolo conocido en la técnica. En una realización, el protocolo de agotamiento de células T es el tratamiento con ciclofosfamida entre los días +1 y +10. En una realización, el protocolo de agotamiento de células T es el tratamiento con ciclofosfamida a entre 30 y 70 mg/kg o 50 mg/kg. En una realización, el protocolo de agotamiento de células T es el tratamiento con ciclofosfamida a entre 30 y 70 mg/kg o 50 mg/kg en los días +3 y +4.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, se usa un régimen de profilaxis de GvHD. En una realización no reivindicada, el régimen de profilaxis de GvHD es cualquiera conocido en la técnica. En otra realización no reivindicada, el régimen de profilaxis de GvHD proporciona una cantidad disminuida de agentes y/o una concentración reducida de uno o más agentes que se utilizarán, donde el agente proporciona la supresión del sistema inmunitario. En otra realización, el régimen de profilaxis de GvHD es uno de los siguientes: (i) CELLCEPT® (micofenolato mofetilo) se administrará como 15 mg/kg por vía oral (PO) 3 veces al día (dosis diaria máxima de 3 g) a partir del día +5 hasta el día +35. Se puede usar una formulación intravenosa según la discreción del médico hasta que se establezca una ingesta oral confiable del paciente. Tacrolimus se administrará como infusión intravenosa de 0,03 mg/kg/día (la dosificación puede ajustarse como es estándar para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Se continuará con tacrolimus hasta el día +100 y, a continuación, puede reducirse a ninguno el día +180 si no hay evidencia de GvHD activa; (ii) se administrará tacrolimus como infusión IV de 0,03 mg/kg/día (la dosis puede ajustarse como es habitual para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Se continuará con tacrolimus hasta el día +100 y, a continuación, puede reducirse a ninguno el día +180 si no hay evidencia de GvHD activa; o (iii) se administrará tacrolimus como infusión IV de 0,03 mg/kg/día (la dosis puede ajustarse como es habitual para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Tacrolimus se continuará hasta el día +50 y, a continuación, puede reducirse a ninguno para el día +100 si no hay evidencia de GvHD activa.

En una realización no reivindicada de cualquiera de las anteriores, los procedimientos de la presente descripción pueden usarse junto con el tratamiento con factor de crecimiento. En una realización no reivindicada, se puede usar cualquier régimen de tratamiento con factor de crecimiento. En otra realización no reivindicada, el factor de crecimiento es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En otra realización no reivindicada, el G-CSF se administra desde el día +5 hasta aproximadamente el día +20 o desde el día +5 hasta aproximadamente el día +15. En otra realización no reivindicada, el G-CSF se administra a aproximadamente 5 mcg/kg el día +5 después del trasplante hasta el injerto de neutrófilos.

Ejemplos

La referencia a los procedimientos de tratamiento mediante terapia o cirugía o procedimientos de diagnóstico in vivo en los ejemplos 3 y 4 de esta descripción debe interpretarse como referencia a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos procedimientos.

Ejemplo 1- Agotamiento de células T αβ

En la técnica se conocen procedimientos para el agotamiento de células T αβ y se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización, se utiliza el siguiente procedimiento de agotamiento de células T αβ. El dispositivo CLINIMACS® con el kit de reactivos TCR a/p y otros reactivos asociados se utiliza para el agotamiento de células T αβ. CLINIMACS® a/p TCR Reagent es un reactivo de anticuerpo monoclonal estéril específico para células αβ. El agotamiento de las células T αβ se realizará de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente (16). En resumen, el producto expandido de leucaféresis/ex vivo se incubará con los anticuerpos apropiados que se conjugan con partículas magnéticas y luego se procesan utilizando el dispositivo CLINIMACS® (Miltenyi Biotec). El instrumento CLINIMACS® Plus es un instrumento controlado por software que procesa la muestra de sangre (producto celular). El juego de tubos CLINIMACS® es un juego de tubos desechables estériles de un solo uso con columnas de selección de celdas patentadas. El tampón CLINIMACS® PBS/EDTA es una solución salina de EDTA 1 mM estéril, isotónica y tamponada con fosfato que se utiliza como fluido de lavado y transporte externo para la preparación in vitro de células sanguíneas.

Ejemplo 2- Expansión de células T γδ ex vivo

En la técnica se conocen procedimientos para la expansión de células T γδ y se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtienen mediante una extracción de sangre periférica o leucoféresis. El producto de PBMC se coloca en cultivo a una densidad de $1-2 \times 10^6$ /ml con la adición de ZOMETA® 2 mM (Novartis, Inc.; ácido zoledrónico) y 100 u/ml de Interleukin-2 (IL-2 Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, ALEMANIA) y un cultivo de medio base o sistema de biorreactor de grado GMP apropiado que permite que los monocitos se adhieran (por ejemplo, plástico de cultivo tisular o el sistema de biorreactor PRODIGY® (Miltenyi Biotech)). Después de 14 días de cultivo, las células se cosechan y se agotan de células T αβ.

Preferentemente, se utiliza el siguiente procedimiento de agotamiento de células T αβ. El dispositivo PRODIGY® O CLINIMACS® con el kit de reactivos TCR a/p y otros reactivos asociados se utiliza para el agotamiento de células T αβ. CLINIMACS® a/p TCR Reagent es un reactivo de anticuerpo monoclonal estéril específico para células αβ. El

agotamiento de las células T $\alpha\beta$ se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se describió anteriormente (16). En resumen, el producto expandido de leucaféresis/ex vivo se incuba con los anticuerpos apropiados que se conjugan con partículas magnéticas y luego se procesa utilizando el dispositivo PRODIGY® o CLINIMACS® (Miltenyi Biotec). El instrumento CLINIMACS® Plus es un instrumento controlado por software que procesa la muestra de sangre (producto celular). Los conjuntos de tubos PRODIGY® y CLINIMACS® son conjuntos de tubos desechables estériles de un solo uso con columnas de selección de células patentadas. El tampón CLINIMACS® PBS/EDTA es una solución salina de EDTA 1 mM estéril, isotónica y tamponada con fosfato que se utiliza como fluido de lavado y transporte externo para la preparación in vitro de células sanguíneas.

Ejemplo 3- Estudio clínico

Para inscribirse en el estudio, los pacientes deben cumplir con todos los criterios de elegibilidad y no ser excluidos por un criterio de exclusión.

Criterios de elegibilidad

Los criterios de elegibilidad para el estudio son los siguientes:

(i) Pacientes con trastornos hematológicos neoplásicos con indicación de trasplante alogénico de acuerdo con la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) u otras pautas estándar de la siguiente manera; (a) Leucemia linfoblástica aguda [LLA]²⁵ con características de alto riesgo o enfermedad recidivante; (b) Hodgkin²⁶ o linfoma no Hodgkin²⁷ [LH o LNH]: enfermedad recidivante donde la duración de la remisión es inferior a 1 año, recidiva después de un trasplante autólogo previo o fracaso para lograr CR con quimioterapia; y (c) Malignidad mieloide (leucemia mieloide aguda [LMA]²⁸ con características de riesgo intermedio/alto (según los criterios de NCCN) o enfermedad recidivante, o leucemia mieloide crónica [LMC]²⁹ en remisión hematológica o fase crónica).²⁸;

(ii) trastorno mieloide (síndrome mielodisplásico [SMD]³⁰ con características de riesgo intermedio/alto o enfermedad refractaria o trastorno mieloproliferativo; características primarias o secundarias si son de alto riesgo o enfermedad refractaria)³¹;

(iii) ningún donante compatible con ALH adecuado disponible;

(iv) Criterios de edad: 19 a 65 años de edad;

(v) Criterios de función del órgano: Las siguientes pruebas de función orgánica deben realizarse dentro de los 35 días anteriores al registro del estudio: (a) Cardíaco: FEVI del 50 % o superior, por MUGA o Ecocardiograma; (b) Pulmonar: FVC, FEV1 y DLCO (corregido) deben ser del 50 % o más de lo esperado; (c) Renal: el nivel de creatinina sérica debe ser < 2 mg/dl o el aclaramiento de creatinina estimado (CrCl) debe ser igual o superior a 40 ml/min/1,73 m² según lo calculado por la Fórmula de Cockcroft-Gault; y (d) Hepático: bilirrubina sérica $\leq 1,5 \times$ límite superior de la normalidad (LSN), aspartato transaminasa (AST)/alanina transaminasa (ALT) $\leq 2,5 \times$ LSN y fosfatasa alcalina $\leq 2,5 \times$ LSN;

(vi) Estado funcional: Kamofsky ≥ 70 %; y

(vii) Consentimiento: Se debe informar a todos los pacientes de la naturaleza en investigación de este estudio y se les debe dar un consentimiento informado por escrito de acuerdo con las pautas institucionales y federales.

Criterios de exclusión

Se aplican los siguientes criterios de exclusión: (i) No cumple con los medicamentos; (ii) No se identifican cuidadores apropiados; (iii) Trastornos médicos o psiquiátricos no controlados que pueden impedir que los pacientes se sometan a estudios clínicos (discreción del médico tratante); (iv) Afectación neoplásica activa del sistema nervioso central (SNC); (v) Pacientes con una alergia conocida al DMSO ; (vi) VIH1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1) o VIH2 positivo ; y (vii) Embarazo o lactancia.

También se seguirán los siguientes criterios de elegibilidad de donantes: (i) Tipificación de ALH (A, B, C y DRB1 tipificados como de alta resolución); (ii) Donante Adecuado - Autorizado médicamente para donar; y (iii) Donante Elegible - Cumple con todos los requisitos de detección y prueba de donantes relacionados con la transmisión de enfermedades infecciosas.

Tratamiento del estudio

Regímenes de quimioterapia preparativa

Los procedimientos descritos se usarán para tratar una variedad de afecciones. Dependiendo de la afección a tratar, se utilizará uno de los siguientes regímenes preparativos.

Para las enfermedades mieloides, se utiliza la terapia preparativa de fludarabina/busulfán/irradiación corporal total. Este régimen es un régimen preparativo modificado de fludarabina más busulfán. Cuando se utiliza un régimen

mieloablato de fludarabina más busulfán, generalmente se apunta a una dosis total de busulfán que alcanza un ABC (área bajo la curva de concentración) de 20.000. Dado que los protocolos agregan CY posterior al trasplante, la diana del busulfán se reducirá a ABC de 16.000 para minimizar la toxicidad relacionada con el régimen. La profilaxis de las convulsiones se administrará según las pautas institucionales mientras se toma busulfán. Se administrará ICT de 400 cGy (dado como 200 cGy x2) para lograr una inmunosupresión adecuada para permitir el injerto. También se administrará CY posterior al trasplante de 50 mg/kg el día +3 y +4. Los pacientes recibirán MESNA (un compuesto orgánico de azufre utilizado como adyuvante en la quimioterapia contra el cáncer que involucra ciclofosfamida e ifosfamida para la protección renal) e hidratación para la profilaxis de la cistitis hemorrágica según las pautas institucionales. El régimen se describe adicionalmente a continuación y se ilustra en la Figura 1.

Día -7 Busulfán 60 mg IV (Dosis de prueba con PK para ABC de 16.000)

Día -6 Fludarabina 40 mg/m² IV

Día -5 Dosificación IV dirigida a PK de busulfán (con PK confirmatoria), fludarabina 40 mg/m² IV

Día -4 fludarabina 40 mg/m² IV

Día -3 Dosificación IV dirigida a la farmacocinética de busulfán, fludarabina 40 mg/m² IV

Día -2 Dosificación IV dirigida a Busulfan PK

Día -1 Dosificación IV dirigida a Busulfan PK (añadido esto: diferente del protocolo actual, cambiaré el gráfico a continuación).

Día 0 ICT 200 cGy x 2 fracciones (dosis total 400 cGy) luego trasplante

Día+3 CY 50 mg/kg IV

Día+4 CY 50mg/kg IV

Se utilizará el régimen preparativo de irradiación corporal total/ciclofosfamida (ICT/CY) para LLA o LNH o LH agresivo en pacientes <= 40 años de edad sin comorbilidades importantes. El régimen mieloablato estándar para estos pacientes es ICT 1200 cGy y CY 60 mg/kg x 2 días. En este estudio, la dosis de ICT seguirá siendo la misma, pero la dosis de CY previa al trasplante se disminuirá a 20 mg/kg el Día -2, y la dosis de CY posterior al trasplante se disminuirá a 50 mg/kg el Día +3 y +4. Por lo tanto, la dosis total de CY no cambia en este régimen. Los pacientes recibirán MESNA e hidratación para la profilaxis de la cistitis hemorrágica según las pautas institucionales. El régimen se describe adicionalmente a continuación y se ilustra en la Figura 2.

Día -5 ICT 200cGy/ fracción (2 fracciones)

Día -4 ICT 200cGy/ fracción (2 fracciones)

Día -3 ICT 200cGy/fracción (2 fracciones)

Día -2 CY 20 mg/kg IV

Día -1 Reposo

Día 0 Trasplante

Día+3 CY 50mg/kg IV

Día+4 CY 50mg/kg IV

El régimen preparativo de fludarabina/ ICT se utilizará para LLA o linfoma en pacientes mayores de 40 años, o a cualquier edad con comorbilidades importantes que presagian una alta mortalidad sin recaída (MSR) con Cy/ICT de alta intensidad. Estos pacientes recibirán 40 mg/m² x 4 días de fludarabina más 800 cGy de ICT en lugar de los 1.200 cGy habituales. Se administrará CY posterior al trasplante de 50 mg/kg el día +3 y +4. El paciente recibirá MESNA e hidratación para la profilaxis de la cistitis hemorrágica según las pautas institucionales. El régimen se describe adicionalmente a continuación y se ilustra en la Figura 3.

Día -6 Fludarabina 40 mg/m² IV

Día -5 Fludarabina 40 mg/m² IV

Día -4 Fludarabina 40 mg/m² IV

Día -3 Fludarabina 40 mg/m² IV

Día -2 ICT 200 cGy/fracción (2 fracciones)

Día -1 ICT 200 cGy/fracción (2 fracciones)

Día 0 Trasplante

Día+3 CY 50mg/kg IV

5 Día+4 CY 50mg/kg IV

Ajuste de la dosis de quimioterapia

La dosificación de la quimioterapia se basará en el peso corporal ajustado, a menos que el peso corporal real sea inferior al peso corporal ideal (IBW), en cuyo caso utilizaremos el peso corporal real. El peso corporal se calcula de la siguiente manera:

10 • Peso corporal ideal (IBW):

o Varones: $IBW = 50 + ((Ht. \text{ en cm} \times 0,39) - 60) \times 2,3$

o Hembras: $IBW = 45,5 + ((Ht. \text{ en cm} \times 0,39) - 60) \times 2,3$

• Peso ajustado = $IBW + (Peso \text{ Real} - IBW) \times 0,4$

Selección, movilización y recogida de donantes

15 Para los pacientes que reciben una infusión de leucocitos de donantes con agotamiento alfa/beta, los donantes se seleccionan para determinar su elegibilidad e idoneidad para la donación alogénica de células madre hematopoyéticas de acuerdo con los procedimientos institucionales. El donante haploidéntico adecuado y elegible se someterá a aféresis de sangre periférica para la recolección de células madre el día anterior al trasplante dirigidas a una dosis de células CD34+ de $>5 \times 10^6$ células/kg de peso del receptor (más de 4×10^6 células/kg). Se eliminará una parte del producto que contenga un mínimo de 1×10^5 células T $\gamma\delta$ /kg para el agotamiento de células T alfa/beta sin reducir el producto de trasplante por debajo de una dosis de CD34 de 4×10^6 células CD34+/kg. La fracción manipulada se crioconservará y almacenará hasta la confirmación del injerto de neutrófilos. Si el número total de células madre recogidas es inferior a 5×10^6 células/kg y/o la dosis de células T $\gamma\delta$ requerida no se puede obtener sin reducir la dosis de CD34 por debajo de 4×10^6 células/kg, entonces el producto no se dividirá para un procesamiento adicional y el paciente será retirado del estudio. Si se retira a un participante del estudio antes de recibir el producto, recibirá el Cytosan posterior al trasplante según su régimen preparatorio asignado y se le continuará haciendo un seguimiento en caso de recaída.

20 Para los pacientes que reciben células T gamma/delta expandidas/activadas *ex vivo*, los donantes serán examinados para determinar su elegibilidad e idoneidad para la donación alogénica de células madre hematopoyéticas de acuerdo con los procedimientos institucionales. El donante haploidéntico adecuado y elegible se someterá a aféresis de sangre periférica para la recolección de células madre 8±1 días antes del trasplante. Este producto se designará como producto de terapia celular. Después de esta recolección, el donante se movilizará para una recolección dirigida a una dosis de células CD34+ de $\geq 4 \times 10^6$ células/kg).

Producción de células

35 Para los protocolos de expansión de células T $\gamma\delta$, la fabricación se realizará en un gabinete de seguridad biológica estándar en el espacio clasificado ISO 7 bajo los protocolos de fabricación cGMP/cGMP. El producto de aféresis del donante se resuspenderá a $1.0 - 2.0 \times 10^6$ /ml en medio de expansión de células T de grado GMP comercial con o sin suero autólogo, zoledronato 2 pM (Novartis Oncology; East Hanover, NJ) + 50 u/ml de IL-2 de grado GMP (Miltenyi Biotec). El cultivo se mantiene a la densidad original durante 14 días con la adición de 50 u/ml de IL-2 en los días 2, 6 y 10 del poscultivo y la adición de medio completo según lo determinado por el pH y la densidad celular. La composición, pureza y viabilidad se determinan mediante citometría de flujo en el día 0, +7 y +14 después del inicio del cultivo, las células T $\alpha\beta$ se agotan utilizando CLINIMACS®, PRODIGY® (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) u otro sistema de separación de células/biorreactor adecuado como se describe en el día +14 ± 3. Se obtiene una determinación de viabilidad final mediante análisis de citometría de flujo de la incorporación de yoduro To Pro u otra tinción de viabilidad celular. Nuestros criterios de liberación para el producto final son ≥ 60 % de células T $\gamma\delta$, ≤ 5 % de células T $\alpha\beta$ y ≤ 25 % de células NK para ser aceptables para la infusión. La viabilidad debe confirmarse como ≥ 70 % para liberar el producto para infusión. El producto con < 70 % de viabilidad requerirá una liberación excepcional. La potencia del producto celular se determina utilizando ensayos de citotoxicidad *in vitro* contra células K562.

Infusión de células madre

50 Dado que una porción del producto celular que se administrará por separado se crioconserva, los participantes del estudio se expondrán a dimetilsulfóxido (DMSO) durante la infusión de la fracción mínimamente manipulada. La toxicidad del DMSO es una posible complicación de la administración del producto crioconservado. Los efectos secundarios y los síntomas generalmente se asocian con la liberación de histamina. Los signos y síntomas incluyen

tos, enrojecimiento, erupción cutánea, opresión en el pecho, sibilancias, náuseas, vómitos e inestabilidad cardiovascular. Se toman precauciones estándar de infusión de células madre para disminuir el riesgo de reacción al DMSO. Estas precauciones incluyen la desaceleración de la tasa de infusión, la premedicación con antihistamínicos y la monitorización continua durante la administración.

5 Tratamiento con CY post-trasplante

La infusión de CY post-trasplante (50 mg/kg) tendrá lugar el día +3 y el día +4. MESNA se administrará según las pautas institucionales para prevenir la cistitis hemorrágica.

Infusión de células T yδ

- 10 La infusión de células T yδ tendrá lugar en cualquier momento desde el día +7 después del trasplante hasta el día +3 después de la confirmación del injerto de neutrófilos. Este tiempo permitirá la infusión de la infusión de células T yδ después del lavado completo de CY. La semivida de eliminación de CY es de 3-12 horas (monografía LexiComp), por lo que el aclaramiento completo esperado después de 5 semividas (= 60 horas) se producirá antes de la infusión anticipada del injerto de células T yδ en el día +7. Injerto que normalmente se espera alrededor del día +14 hasta el día +18. La infusión del producto se realizará según el conjunto de órdenes estándar del programa para la infusión posterior al trasplante de células del donante. Si el paciente se encuentra en malas condiciones, como fiebre alta, presión arterial inestable o sobrecarga de volumen grave en el día 7, la infusión de la infusión de células T yδ puede suspenderse durante 2 días (hasta el día 9) a discreción del médico tratante. Además, si el paciente desarrolla insuficiencia renal después de la CY posterior al trasplante, la infusión se puede retrasar hasta el día 9 para garantizar que la CY se elimine antes de la infusión de células T yδ.
- 15
- 20 La estrategia de infusión será la siguiente. Usando un esquema de escalamiento de Fase I 3+3 estándar, los sujetos recibirán una dosis fija de 1×10^7 yδ células T/kg. Los primeros tres sujetos recibirán un régimen completo de inmunosupresión posterior al TCMH como se describió anteriormente. El primer paciente de cada grupo será observado durante 90 días antes de incorporar al siguiente paciente al protocolo.

Profilaxis

- 25 La profilaxis de GvHD consistirá en CY posterior al trasplante (50 mg/kg IV el día +3 y el día +4 posterior al trasplante). Otra profilaxis de GvHD incluirá micofenolato mofetilo (MMF, CELLCEPT®) y un inhibidor de calcineurina, tal como tacrolimus, según sea necesario. En una realización, los procedimientos de la presente descripción permiten un régimen de profilaxis de GvHD reducido.

- 30 En una realización, el régimen de GvHD es el siguiente. CELLCEPT® se administrará como 15 mg/kg PO 3 veces al día (dosis diaria máxima de 3 gm) a partir del día +5 hasta el día +35. Se puede usar una formulación intravenosa según la discreción del médico hasta que se establezca una ingesta oral confiable del paciente. Tacrolimus se administrará como infusión intravenosa de 0,03 mg/kg/día (la dosificación puede ajustarse como es estándar para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Tacrolimus se continuará hasta el día +100 y, a continuación, puede reducirse a ninguno para el día +180 si no hay evidencia de GvHD activa.
- 35

- 40 En otra realización, el régimen de GvHD es como sigue. Tacrolimus se administrará como infusión intravenosa de 0,03 mg/kg/día (la dosificación puede ajustarse como es estándar para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Tacrolimus se continuará hasta el día +100 y, a continuación, puede reducirse a ninguno para el día +180 si no hay evidencia de GvHD activa. En un aspecto de esta realización, el régimen anterior se utiliza si no se observa toxicidad limitante de la dosis con el régimen en el párrafo anterior.

- 45 En otra realización más, el régimen de GvHD es el siguiente. Tacrolimus se administrará como infusión intravenosa de 0,03 mg/kg/día (la dosificación puede ajustarse como es estándar para las interacciones farmacológicas con medicamentos concurrentes) a partir del día +5 y se convertirá en tacrolimus oral cuando se tolere la ingesta oral. Tacrolimus se continuará hasta el día +50 y, a continuación, puede reducirse a ninguno para el día +100 si no hay evidencia de GvHD activa. En un aspecto de esta realización, el régimen anterior se utiliza si no se observa toxicidad limitante de la dosis con el régimen en el párrafo anterior.

- 50 Como tal, usando los procedimientos de la presente descripción, un procedimiento de profilaxis de GvHD que utiliza un mínimo de agentes y/o concentraciones puede identificarse beneficiosamente y usarse en combinación con los procedimientos de la presente descripción.

- 55 La profilaxis de la infección se llevará a cabo con terapias antifúngicas, antibacterianas, PCP y antivirales según las pautas institucionales. La terapia preventiva con citomegalovirus se seguirá con exámenes semanales de antígeno de CMV o monitoreo de PCR comenzando aproximadamente el día +20 y continuando hasta que el paciente esté fuera de la inmunosupresión. El HHV6, el EBV y la PCR de adenovirus se controlarán como mínimo cada dos semanas a partir de aproximadamente el día +20 y continuarán hasta que el paciente esté fuera de la inmunosupresión.

A continuación, se proporciona un esquema para el aumento de la dosis

Cohorte	n	n que experimentan toxicidad limitante de la dosis (TLD)	Acción
-1 (solo inscrito si la cohorte excede la dosis máxima tolerada (DMT)) Células T γδ: 5 x 10 ⁶ células/kg MMF: 45mg/kg/día +5 hasta el día +35. Tacrolimus: 0,03 mg/kg/día IV día +5 a oral hasta el día +180 con disminución gradual a +100	3	0 o 1 2	Continuar acumulación Se ha excedido la dosis máxima. Cerrar el ensayo y reevaluar la estrategia
-1	6	1 o 2 3 o más	Ampliar a un total de 10 sujetos en Cohorte -1 (solo se acumula si la cohorte 1 excede la DMT) Dosis máxima excedida; Cerrar ensayo y reevaluar la estrategia
1 (cohorte inicial) Células T γδ: 1 x 10⁷ células/kg MMF: 45mg/kg/día +5 hasta el día +35. Tacrolimus: 0,03 mg/kg/día IV día +5 a oral hasta el día +180 con disminución gradual a +100	3	0 1 2	Reducir la inmunosupresión a la siguiente cohorte Continuar acumulación Se ha excedido la dosis máxima; Desescalar a la cohorte -1
1	6	1 o 2 3 o más	Avanzar a la siguiente cohorte Se ha excedido la dosis máxima; Desescalar a la cohorte -1
2 Células T γδ: 1 x 10 ⁷ células/kg Tacrolimus: 0,03 mg/kg/día IV día +5 a oral hasta el día +180 con disminución gradual a +100	3	0 1 2	Reducir la inmunosupresión a la siguiente cohorte Continuar acumulación Se ha excedido la dosis máxima; DMT es la dosis para la cohorte 1 y acumular a un total de 10 sujetos en la Cohorte 1
2	6	1 o 2 3 o más	Avanzar a la siguiente cohorte Se ha excedido la dosis máxima; DMT es la dosis para la cohorte 1 y acumular a un total de 10 sujetos en la Cohorte 1
3 Células T γδ: 1 x 10 ⁷ células/kg de Tacrolimus: 0,03 mg/kg/día IV día +5 a oral hasta el día +100 con disminución gradual a +50	3	0 o 1 2	Continuar acumulación Se ha excedido la dosis máxima; DMT es la dosis para la cohorte 2 y acumular a un total de 10 sujetos en la Cohorte 2
3	6	1 o 2 3 o más	Continuar acumulación a 10 sujetos Se ha excedido la dosis máxima; DMT es la dosis para la cohorte 2 y acumular a un total de 10 sujetos en la Cohorte 2

Uso de factores de crecimiento

Como parte del estándar de atención, los pacientes con trasplante haploidéntico comenzarán con G- CSF 5 mcg/kg el día +5 después del trasplante hasta el injerto de neutrófilos.

Observaciones

Se supervisarán los siguientes aspectos.

Observaciones requeridas antes del trasplante: (dentro de los 35 días anteriores al registro del estudio / día de la evaluación final del trasplante)

- 5 1. Historial y examen físico (incluye la puntuación del estado de rendimiento de Kamofsky).
2. CBC, BUN, Creatinina, AST, ALT, Bilirrubina total.
3. Ecocardiograma o MUGA
4. Pruebas de función pulmonar: FVC, FEV1, DLCO (corregido por hemoglobina).
5. Aspirado y biopsia de médula ósea unilateral (para pacientes con leucemia aguda), morfología y citogenética.
- 10 6. Tomografías computarizadas o tomografías computarizadas/TEP de cuerpo entero, si corresponde, para la evaluación del estado de la enfermedad.
7. La punción lumbar se realizará en pacientes con LLA. El (los) tratamiento(s) intratecal(es) previo(s) al trasplante puede(n) administrarse a discreción del médico tratante.

Además de las observaciones requeridas señaladas anteriormente, se recomienda que los receptores de trasplantes alogénicos tengan lo siguiente según corresponda para el análisis previo al trasplante: marcadores de enfermedades infecciosas (Hep A, Hep B, Hep C, HTLV, VIH, RPR, Virus del Nilo Occidental, VZV, CMV, HSV, Toxoplasma IgG, ensayo GM); detección de embarazo; paneles de laboratorio de funciones renales y hepáticas; revisión de mamografías en pacientes femeninas mayores de 40 años; revisión de colonoscopia u otra detección gastrointestinal apropiada, en pacientes mayores de 50 años; revisión de los niveles de PSA en hombres mayores de 50 años; revisión del estado dental; y revisión y evaluación de afecciones comórbidas no relacionadas con la malignidad.

Observaciones requeridas después del trasplante y planes de seguimiento:

Estado de la enfermedad: según lo indicado por el tipo de enfermedad y el sitio, se utilizarán pruebas apropiadas para evaluar el estado de la enfermedad después del trasplante.

25 Para pacientes con leucemia: Se recogerá aspirado de médula ósea y muestra de biopsia para el examen morfológico y citogenético el día +30 (± 7), el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) después del trasplante para todos los pacientes que estén clínicamente estables y que no hayan demostrado progresión de la enfermedad en ese momento. Además, se recogerá un aspirado de médula unilateral siempre que se sospeche una recaída.

30 Para pacientes con linfoma sin historial conocido de afectación de la médula ósea: Tomografías computarizadas o tomografías computarizadas/PET de cuerpo entero se realizarán el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) después del trasplante para todos los pacientes que estén clínicamente estables y que no hayan demostrado progresión de la enfermedad en ese momento.

35 Para pacientes con linfoma con antecedentes de afectación de la médula ósea: Tomografías computarizadas o tomografías computarizadas/PET de cuerpo entero se realizarán el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) después del trasplante, si corresponde, y/o se recolectarán muestras de aspirado y biopsia de médula ósea para el examen de morfología y citogenética el día +30 (± 7), el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) para todos los pacientes que son clínicamente estables y que no han demostrado progresión de la enfermedad en ese momento.

A los efectos de este estudio, la recaída se define por la evidencia morfológica o citogenética de enfermedad en la leucemia, o la evidencia radiológica (incluida la recurrencia de lesiones ávidas de fluorodesoxiglucosa [FDG] en la TEP) de linfoma progresivo.

40 Los estudios de reconstitución inmunitaria se realizarán según el estándar de TMO y/o según lo indicado clínicamente. El momento recomendado de los laboratorios es el día +30 (± 7), el día +60 (± 7), el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) después del trasplante. Este panel incluirá la medición del porcentaje y el recuento absoluto de efectores/memoria CD3+, CD4 +, CD8 +, CD56 +, CD19 +, Treg (CD4 +/CD25+) y células T GD.

45 Se realizarán estudios de quimerismo según el estándar de TMO para evaluar el injerto sostenido. El momento recomendado de los laboratorios es el día +30 (± 7), el día +60 (± 7), el día +100 (± 14), el día +180 (± 21) y 1 año (± 45 días) después del trasplante.

50 Los pacientes serán atendidos en la clínica al menos una vez a la semana (± 3 días) hasta el día +100 después del trasplante para someterse a un examen físico para evaluar la GvHD aguda (utilizando los criterios de consenso³²). Luego serán atendidos al menos una vez al mes (± 14 días) hasta 1 año después del trasplante para someterse a un examen físico para evaluar la GvHD crónica y los signos y síntomas de recaída o progresión. Se realizará un monitoreo

de eventos adversos y toxicidad en cada fecha de visita.

El paciente se someterá a una evaluación de la función cardíaca (ecocardiograma o exploración MUGA), pruebas de función pulmonar (FVC, FEV1 y DLCO) y pruebas de función endocrina (pruebas de función tiroidea que incluyen TSH y T4 libre, y nivel de cortisol aleatorio) un año después del trasplante. Las PFT se repetirán anualmente a partir de entonces.

- 5 El período de estudio es desde el comienzo del acondicionamiento hasta el día 100 después del trasplante. Se hará un seguimiento del paciente al menos durante 2 años después del trasplante para determinar la supervivencia y la recaída. El intervalo de seguimiento posterior a 1 año se determina como clínicamente necesario. El paciente que recae después del trasplante será seguido solo para la supervivencia.

Fármacos quimioterapéuticos

- 10 Citarabina. La citarabina (1-β-D-arabinofuranosil citosina) es un fármaco antineoplásico de fórmula $C_9H_{13}N_3O_5$ (M.W. 243.22) utilizado como solución estéril para administración intravenosa, intratecal o subcutánea. La inyección de citarabina en combinación con otros fármacos anticancerígenos aprobados está indicada para la inducción de la remisión en la leucemia no linfocítica aguda de adultos y pacientes pediátricos. También se ha encontrado útil en el tratamiento de la leucemia no linfocítica aguda, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mieloide aguda y la fase blástica de la leucemia mielocítica crónica. La administración intratecal de la inyección de citarabina (solo preparaciones sin conservantes) está indicada en la profilaxis y el tratamiento de la leucemia meníngea. Exhibe especificidad de fase celular, matando principalmente a las células que experimentan síntesis de ADN (fase S) y bajo ciertas condiciones bloqueando la progresión de las células de la fase G1 a la fase S. Aunque el mecanismo de acción no se entiende completamente, parece que la citarabina actúa a través de la inhibición de la ADN polimerasa.

- 20 Ciclofosfamida (Cytosan, CY). La ciclofosfamida es un fármaco antineoplásico sintético reconocido químicamente como 2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato. La fórmula molecular de CY es $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$ con un peso molecular de 279,1. CY para uso parenteral debe prepararse añadiendo solución de cloruro de sodio al 0,9 %, si se inyecta directamente, o agua estéril, si se infunde. Constituido en agua, CY es hipotónico; por lo tanto, no debe inyectarse directamente. Las soluciones de CY con solución de cloruro de sodio se pueden inyectar por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o intrapleural. La ciclofosfamida constituida es física y químicamente estable durante 24 horas a temperatura ambiente o seis días refrigerada. Soluciones preparadas no contienen ningún conservante microbiano; por lo tanto, se debe controlar la esterilidad de las soluciones.

- 30 Fludarabina (FLUDARA®). El fosfato de fludarabina (fludarabina) es un antimetabolito con el nombre químico 9H-Purin-6-amina, 2-fluoro-9-(5-O-fosfono-0-D-arabino-furanosil) (2-fluoro-ara-AMP). La fórmula molecular es $C_{10}H_{13}FN_5O_7P$ con un peso molecular de 365,2. La fludarabina IV se prepara añadiendo agua estéril a la torta sólida blanca. Reconstituida en 2 ml de agua estéril, la torta sólida produce una solución con una concentración aproximada de 25 mg/ml de fosfato de fludarabina. Siga las pautas institucionales para los procedimientos adicionales de preparación y administración de fludarabina. La fludarabina IV reconstituida no contiene conservante antimicrobiano; por lo tanto, debe utilizarse dentro de las 8 horas posteriores a la reconstitución. NO infundir concomitantemente con otra solución intravenosa de compatibilidad desconocida.

- 40 Busulfan CBUSULFEX®. El busulfán es un agente alquilante bifuncional conocido químicamente como 1,4-butanodiol, dimetanosulfonato con una fórmula molecular de $CH_3SO_2O(CH_2)_4OSO_2CH_3$ y un peso molecular de 246 g/mol. El busulfán IV debe diluirse antes de su uso con NS o D5W. La cantidad de diluyente debe ser 10 veces el volumen de BUSULFEX®, de modo que la concentración final de busulfán sea de aproximadamente 0,5 mg/mL. Se deben utilizar bombas de infusión para administrar la solución diluida de busulfán. NO infundir concomitantemente con otra solución intravenosa de compatibilidad desconocida. Advertencia: La infusión rápida de busulfán IV no se ha probado y no se recomienda. El busulfán se prepara y administra de acuerdo con las pautas institucionales.

- 45 Tacrolimus (PROGRAF®). Tacrolimus es un inmunosupresor macrólido producido por *Streptomyces Tsukubaensis*. Tacrolimus tiene una formulación empírica de $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ y un peso de fórmula de 822.05. Tacrolimus aparece como cristales blancos o polvo cristalino. Es prácticamente insoluble en agua, libremente soluble en etanol y muy soluble en metanol y cloroformo. Tacrolimus inhibe la activación de los linfocitos T, aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto. La evidencia experimental sugiere que el tacrolimus se une a una proteína intracelular, FKBP-12. Luego se forma un complejo de tacrolimus-FKBP-12, calcio, calmodulina y calcineurina y se inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina. Este efecto puede prevenir la desfosforilación y la translocación del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT), un componente nuclear que se cree que inicia la transcripción génica para la formación de linfocinas (como la interleucina-2, el interferón gamma). El resultado neto es la inhibición de la activación de los linfocitos T (es decir, la inmunosupresión). Tacrolimus (PROGRAF® inyectable) debe diluirse con NS o D5W antes de su uso. Tacrolimus se administra como una infusión continua. La preparación oral se administrará con el estómago vacío cada 12 horas.

- 55 Micofenolato mofetilo (MMF, CELLCEPT®). CELLCEPT® (micofenolato mofetilo) es el éster 2-morfolinoetílico del ácido micofenólico (MPA), un agente inmunosupresor, inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). El nombre químico del micofenolato mofetilo (MMF) es (E)-6-(1,3-dihidro-4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-5-isobenzofuranil)-4-metil-4-hexenoato de 2-morfolinoetílo. Tiene una fórmula empírica de $C_{23}H_{31}NO_7$ y un peso

molecular de 433,50. El micofenolato mofetilo es un polvo cristalino de color blanco a blanquecino. Es ligeramente soluble en agua (43 pg/mL a pH 7,4); la solubilidad aumenta en un medio ácido (4,27 mg/mL a pH 3,6). Es libremente soluble en acetona, soluble en metanol y escasamente soluble en etanol. El coeficiente de reparto aparente en solución tampón 1-octanol/agua (pH 7,4) es 238. Los valores de pKa para el micofenolato mofetilo son 5,6 para el grupo morfolino y 8,5 para el grupo fenólico. El clorhidrato de micofenolato de mofetilo tiene una solubilidad de 65,8 mg/ml en D5W. El pH de la solución reconstituida es de 2,4 a 4,1. Las formulaciones de dosificación oral (comprimido, cápsula, suspensión) deben administrarse con el estómago vacío para evitar la variabilidad en la absorción de MPA. La solución oral puede administrarse a través de una sonda nasogástrica (mínimo 8 French, 1,7 mm de diámetro interior); la suspensión oral no debe mezclarse con otros medicamentos. Las tabletas de liberación retardada no deben triturarse, cortarse ni masticarse. Las soluciones intravenosas deben administrarse durante al menos 2 horas (vena periférica o central); no administrar solución intravenosa mediante inyección rápida o en bolo.

Filgrastim (NEUPOGEN®). NEUPOGEN® es el nombre comercial de filgrastim, que representa el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos metionilo recombinante (r-methHuG-CSF). NEUPOGEN® es una proteína de 175 aminoácidos producida mediante tecnología de ADN recombinante que utiliza *Escherichia coli* (*E. coli*). NEUPOGEN® tiene un peso molecular de 18,800 daltons y una secuencia de aminoácidos similar a la del ADN humano natural, excepto por la metionina adicional en el extremo N, necesaria para la expresión en *E. coli*. NEUPOGEN® puede administrarse como una infusión intravenosa o subcutánea. Se recomienda que NEUPOGEN® se administre al menos 24 horas después de la infusión de médula ósea, con modificaciones de dosis determinadas por la respuesta de los neutrófilos. Si es necesario, NEUPOGEN® puede diluirse en dextrosa al 5 % con la adición de albúmina(humana) para evitar la absorción de materiales plásticos. No se recomienda la dilución hasta una concentración final inferior a 5 mcg/ml en ningún momento. No diluir con solución salina ya que el producto puede precipitar. Cuando utilice viales o jeringas precargadas, no guarde los medicamentos no utilizados para su posterior administración. Desechar todas las porciones no utilizadas.

Irradiación corporal total (ICT). La ICT se administrará según el procedimiento de atención estándar implementado por los oncólogos radioterápicos. ICT solo para pacientes post-pubescentes con dosis/fraccionamiento no superior a 2 Gy x 6 está bien dentro de la tolerancia de la mayoría de los órganos normales para < 5 % de riesgo de toxicidad tardía grave (insuficiencia orgánica o disfunción mayor) a los 5 años. Las excepciones notables son los riesgos de desarrollo de cataratas, supresión de la médula ósea y disfunción ovárica y testicular. Además, existe un pequeño riesgo de segunda neoplasia maligna. Los efectos agudos más comunes incluyen náuseas, vómitos, diarrea e hinchazón dolorosa de las glándulas parótidas. Cuando la ICT se administra junto con otras terapias en el entorno del trasplante, existe un riesgo adicional de efectos secundarios que incluyen pérdida de apetito, sequedad de la boca, deglución difícil o dolorosa, dolor de cabeza, estomatitis (dolor de garganta/boca), alteración de la integridad de la piel, pérdida de cabello, hinchazón, mayor riesgo de infección y/o sangrado, posible insuficiencia pulmonar, tos seca, fatiga, ansiedad, fiebre, posible insuficiencia hepática, cicatrices pulmonares, pérdida de visión, dificultad para respirar, esterilidad, disco cardíaco, cistitis, trastornos del sueño, alteración de la función gastrointestinal y genitourinaria, neuropatía, fístulas, alteración de la función endocrina, pericarditis y mayor riesgo de un segundo cáncer. En general, la incidencia de la mayor parte de la toxicidad importante cuando la radiación se administra junto con otra terapia como se describe anteriormente sigue siendo baja, son posibles efectos secundarios raros y graves.

Ejemplo 4- Resultados del estudio clínico

El resultado esperado para el estudio ABD es que la incidencia de GvHD aguda no será diferente de los pacientes con trasplante haploidéntico que reciben ciclofosfamida después del trasplante sin el injerto ABD suplementario. Este resultado también se espera para los pacientes con EAGD, mientras que, además, anticipamos una menor incidencia de complicaciones infecciosas en el período inicial posterior al trasplante (100 días) y una menor incidencia de recaída de la enfermedad (1, 2 y 5 años).

Bibliografía

[1] Copelan EA: Hematopoietic stem-cell transplantation. The New England journal of medicine 2006;354:1813-26.

[2] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Blood 2007, 110:4576-83.

[3] Alshemmari S, Ameen R, Gaziev J: Haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation in adults. Bone marrow research 2011, 2011 :303487.

[4] Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felcini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, Martelli MF: Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2005, 23:3447-54.

[5] Gale RP, Horowitz MM: Graft-versus-leukemia in bone marrow transplantation. The Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. Bone marrow transplantation 1990, 6 Suppl 1 :94-7.

[6] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden

0, Rozman C, Speck B, et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990, 75:555-62.

[7] Ferrara JL, Yanik G: Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O* 2005, 3:415-9, 28.

[8] Oevermann L, Handgretinger R: New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatric research* 2012, 71 :418-26.

[9] Lamb LS, Jr., Lopez RD: gammadelta T cells: a new frontier for immunotherapy? *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2005, 11: 161-8.

[10] Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A: Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011, 117:764-71.

[11] Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S: Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cancer* 2013, 4:25-35.

[12] Lamb LS, Jr., Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Godder K, Thompson J, Lee C, Gee AP: Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell- depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *Journal of Hematotherapy* 1996, 5:503-9.

[13] Lamb LS, Jr., Gee AP, Hazlett LJ, Musk P, Parrish RS, O'Hanlon TP, Geier SS, Folk RS, Harris WO, McPherson K, Lee C, Henslee-Downey PJ: Influence of T cell depletion method on circulating gammadelta T cell reconstitution and potential role in the graft-versus-leukemia effect. *Cytotherapy* 1999, 1 :7-19.

[14] Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang KY, Abhyankar S, Lamb LS: Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007, 3 9:7 51-7.

[15] Handgretinger R: New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. *Seminars in oncology* 2012, 39:664-73.

[16] Smetak M, Kimmel B, Birkmann J, Schaefer-Eckart K, Einsele H, Wilhelm M, Kunzmann V: Clinicalscale single-step CD4(+) and CDS(+) cell depletion for donor innate lymphocyte infusion DILi). *Bone marrow transplantation* 2008, 41 :643-50.

[17] Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC: Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001,294:605-9.

[18] Kaminski MJ, Cruz PD, Jr., Bergstresser PR, Takashima A: Killing of skin-derived tumor cells by mouse dendritic epidermal T-cells. *Cancer Research* 1993, 53:4014-9.

[19] Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96:6879-84.

[20] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA [see comments]. *Science* 1999, 285:727-9.

[21] Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998, 279:1737-40.

[22] Boismenu R, Havran WL: An innate view of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 1997, 9:57-63.

[23] Blazar BR, Taylor PA, Bluestone JA, Valleria DA: Murine gamma/delta-expressing T cells affect alloengraftment via the recognition of nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood* 1996, 87:4463-72.

[24] Drobyski WR, Majewski D: Donor gamma delta T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* 1997, 89:1100-9.

[25] Drobyski WR, Hessner MJ, Klein JP, Kabler-Babbitt C, Vesole DH, Margolis DA, Keever- Taylor CA: Tcell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation.[erratum appears in *Blood* 2000 Feb 15;95(4): 1137]. *Blood* 1999, 94:434-41.

[26] Neipp M, Exner BG, Maru D, Haber M, Gammie JS, Pham SM, Ildstad ST: T-cell depletion of allogeneic bone marrow using anti-alphabetaTCR monoclonal antibody: prevention of graft- versus-host disease without affecting

engraftment potential in rats. *Exp Hematol* 1999, 27:860-7.

[27] Kawanishi Y, Passweg J, Drobyski WR, Rawlings P, Cook-Craig A, Casper J, Pietryga D, Garbrecht F, Camitta B, Horowitz M, Juckett M, Margolis D, Flomenberg N, Keever-Taylor CA: Effect of T cell subset dose on outcome of T cell-depleted bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1997, 19:1069-77.

5 [28] Henslee PJ, Thompson JS, Romond EH, Doukas MA, Metcalfe M, Marshall ME, MacDonald JS: T cell depletion of HLA and haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus leukemia effect. *Transplantation Proceedings* 1987, 19:2701-6.

10 [29] Ellison CA, MacDonald GC, Rector ES, Gartner JG: Gamma delta T cells in the pathobiology of murine acute graft-versus-host disease. Evidence that gamma delta T cells mediate natural killer-like cytotoxicity in the host and that elimination of these cells from donors significantly reduces mortality. *J Immunol* 1995, 155:4189-98.

[30] Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R: Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000, 23:536-48.

15 [31] Lamb LS, Jr., Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, King KM, Henslee-Downey PJ: Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* 2001, 27:601-6.

[32] Cela ME, Holladay MS, Rooney CM, Richardson S, Alexander B, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE: Gamma delta T lymphocyte regeneration after T lymphocyte-depleted bone marrow transplantation from mismatched family members or matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 1996, 17:243-7.

20 [33] Yabe M, Yabe H, Hattori K, Hinohara T, Morimoto T, Kato S, Kusunoki A: Transition of T cell receptor gamma/delta expressing double negative (CD4-/CD8-) lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14:741-6.

[34] Viale M, Ferrini S, Bacigalupo A: TCR gamma/delta positive lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10:249-53.

25 [35] Tsuji S, Char D, Bucy RP, Simonsen M, Chen CH, Cooper MD: Gamma delta T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+ alpha beta T cells. *European Journal of Immunology* 1996, 26:420-7.

30 [36] Keever-Taylor CA, Bredeson C, Loberiza FR, Casper JT, Lawton C, Rizzo D, Bums WH, Margolis DA, Vesole DH, Horowitz M, Zhang MJ, Juckett M, Drobyski WR: Analysis of risk factors for the development of GVHD after T cell-depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of T cell depletion. *Biology of Blood & Marrow Transplantation* 2001, 7:620-30.

[37] Mehta J, Singhal S, Gee AP, Chiang KY, Godder K, Rhee Fv F, DeRienzo S, O'Neal W, Lamb L, Henslee-Downey PJ: Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:389-96.

35 [38] Lamb LS HLMP, et al.: Influence of T cell depletion method on circulating gd+ T cell reconstitution and potential role in the graft-versus-leukemia effect. *Cytotherapy* 1999, 1 :7-19.

[39] Eto M, Mayumi H, Tomita Y, Yoshikai Y, Nishimura Y, Maeda T, Ando T, Nomoto K: Specific destruction of host-reactive mature T cells of donor origin prevents graft-versus-host disease in cyclophosphamide-induced tolerant mice. *Journal of immunology* 1991, 146:1402-9.

40 [40] Strauss G, Osen W, Debatin KM: Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clinical and experimental immunology* 2002, 128:255-66.

[41] Luznik L, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ: Posttransplantation cyclophosphamide facilitates engraftment of major histocompatibility complex-identical allogeneic marrow in mice conditioned with low-dose total body irradiation. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002, 8:131-8.

45 [42] Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ: Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood* 2001, 98:3456-64.

[43] Mayumi H, Umesue M, Nomoto K: Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology* 1996, 195:129-39.

50 [44] Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, Storer BE, Luznik L, Symons HJ, Jones RJ, Ambinder RF, Maris MB, Blume KG, Niederwieser DW, Bruno B, Maziarz RT, Pulsipher MA, Petersen FB, Storb R, Fuchs EJ, Maloney DG:

Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008, 14:1279-87.

- 5 [45] Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, Gooley TA, Piantadosi S, Kaup M, Ambinder RF, Huff CA, Matsui W, Bolanos-Meade J, Borrello I, Powell JD, Harrington E, Warnock S, Flowers M, Brodsky RA, Sandmaier BM, Storb RF, Jones RJ, Fuchs EJ: HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008, 14:641-50.
- 10 [46] Bronstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, Karanes C, Costa LJ, Wu J, Devine SM, Wingard JR, Aljitali OS, Cutler CS, Jagasia MH, Ballen KK, Eapen M, O'Donnell PV, Blood, Marrow Transplant Clinical Trials N: Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011, 118:282-8.
- [47] Alvamas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Bellam N, Blum W, Boyer MW, Carraway
- 15 HE, Coccia PF, Coutre SE, Cultrera J, Damon LE, DeAngelo DJ, Douer D, Frangoul H, Frankfurt O, Goorha S, Millenson MM, O'Brien S, Petersdorf SH, Rao AV, Terezakis S, Uy G, Wetzler M, Zelenetz AD, Naganuma M, Gregory KM, National Comprehensive Cancer N: Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2012, 10:858-914.
- 20 [48] Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, Ambinder RF, Bello CM, Bierman PJ, Blum KA, Dabaja B, Duron Y, Forero A, Gordon LI, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Hochberg EP, Maloney DG, Mansur D, Mauch PM, Metzger M, Moore JO, Morgan D, Moskowitz CH, Poppe M, Pro B, Weiss L, Winter JN, Yahalom J, Lymphoma NH: Hodgkin lymphoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2011, 9:1020-58.
- 25 [49] Zelenetz AD, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Bartlett N, Bellam N, Byrd JC, Czuczman MS, Fayad LE, Glenn MJ, Gockerman JP, Gordon LI, Harris NL, Hoppe RT, Horwitz SM, Kelsey CR, Kim YH, Krivacic S, LaCasce AS, Nademanee A, Porcu P, Press O, Pro B, Reddy N, Sokol L, Swinnen L, Tsien C, Vose JM, Yahalom J, Zafar N, Dwyer MA, Naganuma M, National Comprehensive Cancer N: NonHodgkin's lymphomas, version 1.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013,11 :257-72; quiz 73.
- 30 [50] O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, Borate U, Coutre SE, Damon LE, Lancet J, Maness LJ, Marcucci G, Martin MG, Millenson MM, Moore JO, Ravandi F, Shami PJ, Smith BD, Stone RM, Strickland SA, Wang ES, Gregory KM, Naganuma M: Acute myeloid leukemia, version 2.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013,11:1047-55.
- 35 [51] O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, Akhtari M, Altman JK, Berman E, DeAngelo DJ, Deininger M, Devine S, Fathi AT, Gotlib J, Jagasia M, Kropf P, Moore JO, Paller AA, Pinilla-Ibarz J, Reddy VV, Shah NP, Smith BD, Snyder DS, Wetzler M, Gregory K, Sundar H: Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11:1327-40.
- [52] Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, O'Donnell MR, Shami PJ, Stein BL, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P, Wheeler B, Shead DA, Naganuma M: Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11:838-74.
- 40 [53] Tefferi A: Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 2013, 88:141-50.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de un paciente mediante trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH),

5 donde la composición comprende células T enriquecidas en células T $\gamma\delta$ y agotadas en células T $\alpha\beta$ donde la composición comprende más del 60 % de células T $\gamma\delta$, menos del 5 % de células T $\alpha\beta$ y menos del 25 % de células asesinas naturales (NK);

donde la composición se usa como infusión de injerto celular,

10 donde el paciente ha sido infundido con células madre hematopoyéticas (CMH) alogénicas que comprenden células madre de sangre periférica (CMSP) el día 0; donde las CMH alogénicas son CMH haploidénticas mínimamente manipuladas;

donde el paciente se infunde con la composición que comprende células T enriquecidas en células T $\gamma\delta$ y agotadas en células T $\alpha\beta$ en el día +7 hasta el día +25 con respecto al día 0;

donde al paciente se le administra un agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo* en el paciente antes de la infusión con la composición; y

15 donde al paciente se le ha administrado un régimen de quimioterapia preparativa antes del día 0.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1, donde el paciente se infunde con el agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo* en el día +1 hasta el día +10 con respecto al día 0, y donde el agente que proporciona agotamiento de células T *in vivo* es ciclofosfamida (CY).

20 3. La composición para su uso según la reivindicación 2, donde el paciente se infunde con la composición en el día +7 hasta el día +9 con respecto al día 0.

25 4. La composición para su uso según la reivindicación 1 para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA); LLA recidivante; linfoma de Hodgkin (LH); linfoma no Hodgkin (LNH); LH o LNH recidivante; leucemia mieloide aguda (LMA); LMA recidivante; leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome mielodisplásico (SMD); SMD refractario; astrocitoma; Tumor Raboide Teratoide Atípico; glioma del tronco cerebral; tumores del plexo coroideo, carcinoma y papiloma; craneofaringioma; astrocitoma infantil desmoplásico; tumor de células germinales; meduloblastoma; neurofibromatosis; oligodendroglioma; glioma óptico; neuroblastoma; Sarcoma de Ewing; infección; o Tumor Neuroectodérmico Primitivo, donde el tratamiento comprende un régimen de tratamiento de TCMH.

30 5. La composición para su uso según la reivindicación 1, donde el régimen de quimioterapia preparativa se selecciona de Fludarabina/Busulfán/irradiación corporal total para enfermedades mieloides; irradiación corporal total/ciclofosfamida (ICT/CY) para leucemia linfoblástica aguda (LLA) o linfoma no Hodgkin (LNH) agresivo o linfoma de Hodgkin (LH) en pacientes < 40 años de edad sin comorbilidades importantes; y Fludarabina/irradiación corporal total para LLA o linfoma en pacientes mayores de 40 años, o a cualquier edad con comorbilidades importantes que presagian una alta mortalidad sin recaída (MSR) con ICT/CY de alta intensidad.

35 6. La composición para su uso según la reivindicación 1, donde la composición enriquecida en células T $\gamma\delta$ y agotada en células T $\alpha\beta$ se prepara expandiendo una población de células T $\gamma\delta$ *ex vivo*.

FIG. 1

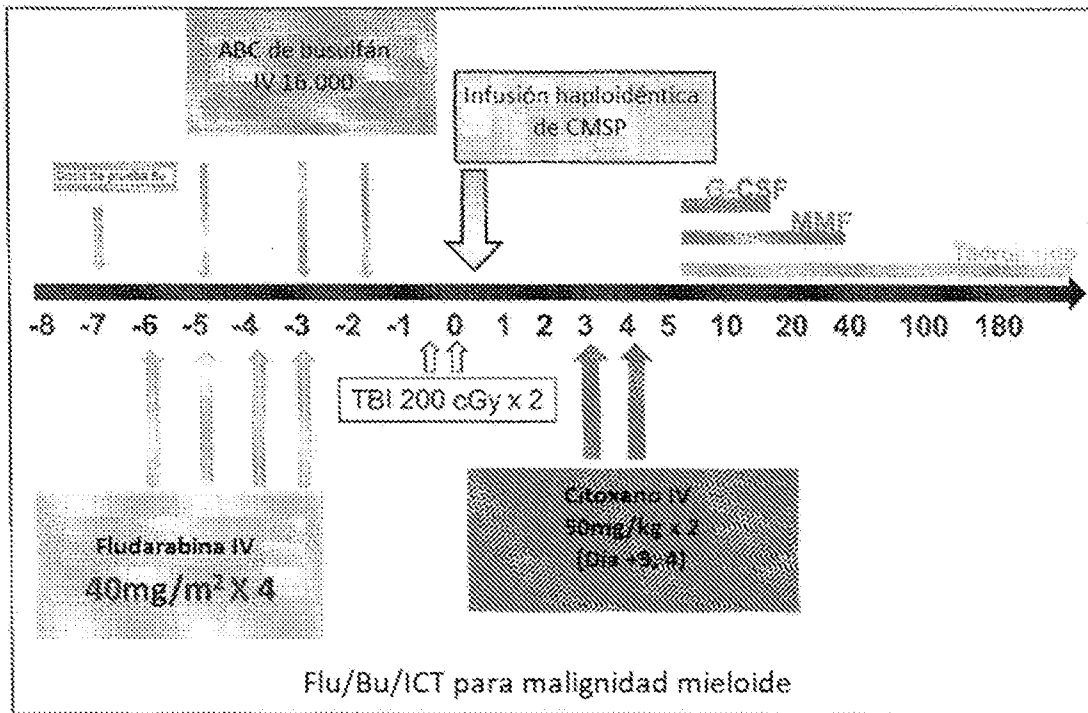


FIG. 2

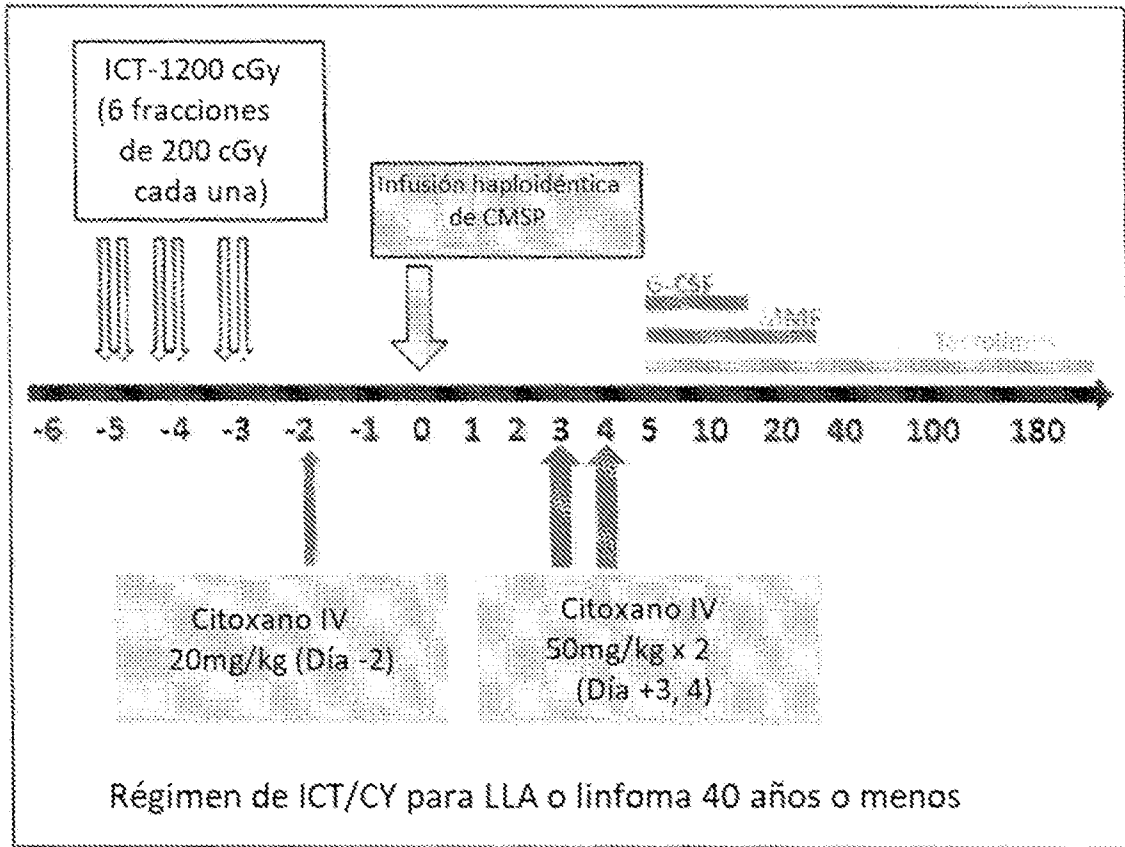


FIG. 3

