

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 529**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/IL2012/050541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13093919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12861023 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020** **EP 2797421**

54 Título: **Una terapia de combinación para un injerto estable y a largo plazo usando protocolos específicos para el agotamiento de los linfocitos T/B**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161578917 P

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

12.03.2021

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 811 529 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una terapia de combinación para un injerto estable y a largo plazo usando protocolos específicos para el agotamiento de los linfocitos T/B

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

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

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

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

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

Se han intentado enfoques adicionales para lograr un injerto estable de células madre hematopoyéticas alogénicas, algunos se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20110110909, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20050118142, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20070098693, la Patente de EE.UU. N.º 5.876.692, la Patente de EE.UU. N.º 5.514.364, la Patente de EE.UU. N.º 6.217.867, la Patente de EE.UU. N.º 5.635.156, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20060140912, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20040005300, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20070141027, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20030017152, la Solicitud de Patente de EE.UU.

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

El documento US 5806529 proporciona un método para el trasplante de médula ósea de un donante no compatible con HLA a un paciente que comprende acondicionar al paciente bajo un régimen adecuado seguido de trasplante de una dosis muy grande de células madre que es al menos aproximadamente 3 veces mayor que las dosis convencionales usadas en el trasplante de médula ósea con linfocitos T agotados. El paciente se acondiciona en condiciones letales o supraletales para el tratamiento de enfermedades malignas o no malignas, o en condiciones subletales para el tratamiento de enfermedades no malignas. El trasplante puede consistir en células madre de médula ósea de linfocitos T agotados y células sanguíneas periféricas enriquecidas en células madre de linfocitos T agotados del donante no compatible con HLA, preferentemente un pariente del paciente, cuyo donante fue tratado previamente con un fármaco, por ejemplo, una citocina tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

El documento WO 9925367 se refiere al descubrimiento de que los trastornos hematológicos, por ejemplo, tanto las afecciones neoplásicas (cánceres hematológicos) como no neoplásicas, pueden tratarse mediante la inducción de quimerismo mixto usando acondicionamiento mielorreductor, pero no mieloablativo. Los métodos reducen la EICH, especialmente EICH asociada a tejido donante alogénico o xenogénico no coincidente, pero proporciona, por ejemplo, un efecto significativo de injerto contra leucemia (GVL) y similares.

El documento US2003165475 se refiere a métodos no letales de acondicionamiento de un receptor para trasplante de médula ósea. En particular, se refiere al uso de dosis no letales de irradiación corporal total, irradiación linfóide total, anticuerpos específicos de tipo celular o de marcador celular, especialmente anticuerpos dirigidos a marcadores de células estromales de médula ósea o al marcador celular CD8, fármacos citotóxicos o una combinación de los mismos. Los métodos tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo, pero no limitado a, el acondicionamiento de un individuo para la reconstitución hematopoyética por trasplante de médula ósea para el tratamiento de neoplasias hematológicas, trastornos hematológicos, autoinmunidad, enfermedades infecciosas tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y el injerto de células de médula ósea para inducir tolerancia al trasplante de órgano sólido, tisular y celular.

BOMBERGER C ET AL, se refiere a "Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, EE.UU., (19980401), vol. 91, n.º 7, ISSN 0006-4971, páginas 2588 - 2600, XP002487975 [X] 1-16 * resumen ** página 2589, columna 1, párrafo 2 - página 2590, columna 1, párrafo 1 ** página 2595, columna 1, párrafo 1 - página 2599.

KYUNG-NAM KOH ET AL, se refiere a "Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation using CD3 or CD3/CD19 depletion and conditioning with fludarabine, cyclophosphamide and antithymocyte globulin for acquired severe aplastic anaemia", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, (20111105), vol. 157, n.º 1, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08924.x, ISSN 0007-1048, páginas 139 - 142, XP055202937 [X] 1-16 * página 139 - página 141.

J R PASSWEG ET AL, se refiere a "Increased stem cell dose, as obtained using currently available technology, may not be sufficient for engraftment of haploidentical stem cell transplants", BONE MARROW TRANSPLANTATION, (20001101), vol. 26, n.º 10, doi:10.1038/sj.bmt.1702669, ISSN 0951-3078, páginas 1033 - 1036, XP055203062 [X] 1-16 * resumen ** página 1033, columna r, párrafo 2 - página 1034, columna 1, párrafo 1 ** página 1035, columna 1, párrafo 2 - columna r, párrafo 4.

R. HANDGRETINGER ET AL, se refiere a "The history and future prospective of haplo-identical stem cell transplantation", CYTOTHERAPY, (20080101), vol. 10, n.º 5, doi: 10. 1080/14653240802251507, ISSN 1465-3249, páginas 443 - 451, XP055203084 [X] 1-16 * resumen ** página 444, columna r, párrafo 3 - página 445, columna r, párrafo 3.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una dosis de células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados comprenden menos de 5×10^5 células CD3+ por kilogramo de peso corporal de un sujeto y en donde dicha dosis comprende al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal de dicho sujeto, y en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados se obtienen separando dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras, mediante un método seleccionado del grupo que consiste en:

(I) un método que comprende:

(i) añadir un anticuerpo a las células hematopoyéticas inmaduras que se une específicamente a un marcador de superficie, en donde dicho marcador de superficie comprende un marcador de superficie de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD8 y TCR α/β o un marcador de superficie celular hematopoyético inmaduro seleccionado del grupo que consiste en CD34, CD33 y CD 131, en donde dicho anticuerpo está marcado con un agente magnéticamente sensible;

- (ii) inmovilizar dichas células hematopoyéticas inmaduras unidas específicamente a dicho anticuerpo marcado con dicho agente magnéticamente sensible en una matriz a través de un campo magnético;
- (iii) lavar dicha matriz para retirar las células no unidas; y
- (iv) eliminar dicho campo magnético para eluir las células unidas de dicha matriz;

y

(II) basado en una expresión de al menos un marcador de superficie de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD8 y TCR α/β ; y una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que necesita una célula no singénica o injerto de tejido, y en donde dicha ciclofosfamida se administra al sujeto después del trasplante de dicho injerto de célula o de tejido, y además en donde dicho sujeto no se trata con profilaxis de EICH durante más de 10 días después del trasplante.

Preferentemente, el sujeto es un sujeto acondicionado, y opcionalmente en donde el condicionamiento de dicho sujeto acondicionado:

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

- (i) dicho TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo seleccionado del grupo que consiste en 1-7,5 Gy y 1-3,5 Gy; o
- (ii) dicho agente quimioterapéutico comprende al menos uno de Busulfán, Fludarabina, Melfalán y Tiotepa; o
- (iii) dicho anticuerpo comprende al menos uno de un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo antitímocito globulina (ATG) y un anticuerpo anti-CD3 (OKT3);

o

(II) Reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* y opcionalmente en donde dicha reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* se efectúa mediante anticuerpos.

Preferentemente, una dosis de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprende 5 - 40 x 10⁶ células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

Preferentemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T:

- (i) comprende menos de 1 x 10⁶ células CD8+ TCR α/β - por kilogramo de peso corporal del sujeto; o
- (ii) se obtienen por MACSTM.

Preferentemente, cuando dicho marcador de superficie:

es un marcador de superficie de linfocitos T, dichas células no unidas comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T; o
es un marcador de la superficie celular hematopoyética inmadura, dichas células unidas comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.

Preferentemente:

- (i) dicha matriz es una matriz ferromagnética o comprende esferas de material magnéticamente susceptible o ferromagnético; o
- (ii) dicho agente magnéticamente sensible comprende una partícula superparamagnética, y opcionalmente en donde dicha partícula superparamagnética se conjuga con dicho anticuerpo en combinación con una perla específica anti-inmunoglobulina, avidina y/o anti-hapteno.

Preferentemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen de un donante no singénico.

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

Preferentemente, dicha ciclofosfamida se formula en una dosis única o en dos dosis, y opcionalmente en donde cada una de dichas dos dosis comprende una concentración de aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal.

Preferentemente, el sujeto:

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

Preferentemente, dicho injerto de células o tejidos:

- (i) se selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas inmaduras, un órgano o tejido de hígado, de páncreas, de bazo, de riñón, de corazón, de pulmón, de piel, de intestino y linfode/hematopoyético; o
- (ii) comprende un co-trasplante de varios órganos.

Preferentemente, dicho injerto de células o tejidos y dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen del mismo donante.

Preferentemente, dicho sujeto es un sujeto acondicionado que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y opcionalmente en donde el acondicionamiento de dicho sujeto acondicionado está bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, y opcionalmente en donde dicho protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterapéutico.

La presente invención también se refiere a la dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso para inducir tolerancia específica del donante en dicho sujeto que necesita dicha célula o injerto de tejido no singénico.

Preferentemente:

- (i) dicha separación se efectúa usando un anticuerpo y opcionalmente en donde dicho anticuerpo está acoplado a un tinte fluorescente, un hapteno o una partícula magnética; o
- (ii) dicha separación se realiza usando citometría de flujo o clasificación de células magnéticas, y opcionalmente en donde dicha clasificación de células magnéticas comprende MACS_{TM}; o
- (iii) dicha separación de dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras se efectúa usando una separación magnética de alto gradiente (HGMS) o usando una columna de separación; o
- (iv) dicha separación de dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras basada en dicho producto secretado por dichos linfocitos T comprende separar los linfocitos T marcados con un producto de secreción, en donde dichos linfocitos T se han acoplado a un resto de captura que se une específicamente a un producto secretado por dichos linfocitos T y en donde dichos linfocitos T se han cultivado en condiciones en donde el producto se secreta y se une a dicho resto de captura, produciendo de esta manera linfocitos T marcados con dicho producto de secreción, en donde dichos linfocitos T no se lisan mediante dicho método y en donde dicho producto de secreción se marca con un resto marcador; o
- (v) que comprende además separar los linfocitos B de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T mediante el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie de linfocitos B; o
- (vi) que comprende además separar los linfocitos B de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T basado en un producto secretado por dichos linfocitos B que comprende separar los linfocitos B marcados con un producto de secreción, en donde dichos linfocitos B se han acoplado a un resto de captura que se une específicamente a un producto secretado por dichos linfocitos B y en donde dichos linfocitos B se han cultivado en condiciones en donde el producto se secreta y se une a dicho resto de captura, produciendo de esta manera linfocitos B marcados con dicho producto de secreción, en donde dichos linfocitos B no se lisan mediante dicho método y en donde dicho producto de secreción se marca con un resto marcador.

Preferentemente:

- (i) dicho producto de secreción se selecciona del grupo que consiste en IFN- γ , IL1, IL2, IL4, IL10, IL12, TGF- β , TNF, GM-CSF y SCF; o
- (ii) dicho resto de captura está acoplado a dichos linfocitos T o linfocitos B a través de un resto de anclaje o en donde dicho resto de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
- (iii) dicho resto marcador es un anticuerpo específico para el producto de secreción o está fluorocromado, es magnetizable o comprende partículas magnéticas.

Preferentemente, dicha ciclofosfamida se administra al sujeto en dos dosis 3 y 4 días después del trasplante.

Breve descripción de los dibujos

Algunos aspectos de la divulgación se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles que se muestran son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de aspectos de la divulgación. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica aspectos de la divulgación.

En los dibujos:

Las FIGURAS 1A-B son gráficos que ilustran el injerto duradero de médula ósea (BM) de un donante no compatible después del trasplante de 'mega dosis' de BM rigurosamente agotada de linfocitos T y ciclofosfamida post-trasplante. Los ratones se acondicionaron con reducción en volumen de linfocitos T (TCD), usando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. Se administraron altas dosis de Ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) en los días +3 y +4 después del trasplante. El quimerismo del tipo de donante se evaluó 35 días (Figura 1A) y 95 días (Figura 1B) después del trasplante.

Las FIGURAS 2A-C son gráficos de puntos que ilustran un análisis de quimerismo FACS típico. La FIGURA 2C muestra que se logró quimerismo mixto en receptores que fueron trasplantados con 'mega dosis' (25×10^6) de BM rigurosamente agotada de linfocitos T y se trataron con dosis altas de CY. Por el contrario, los ratones receptores que recibieron solo el protocolo de acondicionamiento (FIGURA 2A) o que fueron inoculados con solo 5×10^6 células de BM y CY no exhibieron quimerismo de tipo donante (FIGURA 2B).

La FIGURA 3 es un gráfico que ilustra el quimerismo mixto duradero 180 y 225 días después del trasplante en ratones receptores que fueron trasplantados con 'mega dosis' (25×10^6) de células de BM agotadas de linfocitos T y se trataron con dosis altas de CY. Cabe observar que, los ratones que fueron inoculados con 5×10^6 BM agotadas de linfocitos T y CY no exhibieron quimerismo mixto.

Las FIGURAS 4A-B ilustran el trasplante de tipo donante o injertos de piel de terceros en ratones quiméricos. la FIGURA 4A es un injerto que ilustra la aceptación (marcada con "+") o el rechazo (marcado con "-") de injertos de piel del tipo donante (Balb/c) o de terceros (C57BL/6) en receptores de dosis regular (5×10^6) o 'mega dosis' (25×10^6) de BM agotada en T, tratada con dosis altas de CY en los días +3 y +4 después del trasplante. la FIGURA 4B es una fotografía de injerto de piel del tipo donante (Balb/c) (pelaje blanco) o de terceros (C57BL/6) (pelaje negro) en receptores de 'mega dosis' (25×10^6) de BM agotada en T, tratada con dosis altas de CY en los días +3 y +4 después del trasplante.

La FIGURA 5 es un gráfico que ilustra el efecto de diferentes dosis de irradiación sobre el quimerismo de tipo de donante en ratones receptores de 'mega dosis' (25×10^6) de BM agotada en T y se trató con dosis altas de CY después del trasplante.

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

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

Descripción de aspectos específicos de la divulgación

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

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

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

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

Los principales obstáculos para el trasplante de médula ósea de donantes relacionados con el haplotipo completo no coincidentes fueron la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) y el rechazo del injerto. El uso de un gran número de células madre hematopoyéticas con una mínima contaminación residual de linfocitos T y un régimen

inmunosupresor agresivo y mieloablativo ha dado como resultado altas tasas de injerto con EICH poco grave. Sin embargo, la reconstitución inmunitaria se ha retrasado y no completado después de este enfoque y una tasa significativa de mortalidad relacionada con el trasplante (TRM) está provocada por infecciones oportunistas.

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, hombre o mujer a cualquier edad que necesite un trasplante de células o tejidos. Por lo general, el sujeto necesita un trasplante de células o tejidos (también denominado en el presente documento receptor) debido a un trastorno o una afección, estado, o síndrome patológicos o no deseados o una anomalía física, morfológica o fisiológica que es susceptible de tratamiento mediante trasplante de células o tejidos.

De acuerdo con un aspecto el sujeto necesita regeneración de tejidos (tejido sólido o blando) tales como debido al envejecimiento, traumatismo, herida o cualquier afección patológica que dé como resultado la pérdida de la funcionalidad del órgano.

De acuerdo con un aspecto, el sujeto tiene una enfermedad maligna.

De acuerdo con un aspecto, la enfermedad maligna es un cáncer hematopoyético.

Los cánceres hematopoyéticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (T-ALL), leucemia mielocítica aguda (AML), leucemia no linfoblástica aguda (ANLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, Leucemia mielomonocítica juvenil, Linfoma de Hodgkin, Linfoma no Hodgkin, Linfoma extranodal de linfocitos citolíticos naturales/T, Linfoma cutáneo de linfocitos T, Enteropatía tipo linfoma de linfocitos T, Linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, Linfoma anaplásico de células grandes T/células nulas, Linfoma subcutáneo de linfocitos T tipo paniculitis, Linfoma de linfocitos T no especificado, Linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL)/leucemia linfocítica crónica (CLL), Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, Linfomas de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar - linfomas de tejido linfocítico asociados a la mucosa, Linfoma folicular, Linfoma de células del manto, Linfoma nodal de la zona marginal de linfocitos B, linfoma de Burkitt, Tricoleucemia, Linfoma primario del sistema nervioso central, Linfoma esplénico de la zona marginal de linfocitos B, Linfoma linfoplasmocítico, linfoma mediastinal primario de linfocitos B, leucemia/linfoma de linfocitos T precursores, Linfoma MALT, Micosis fungoide y mieloma múltiple.

De acuerdo con un aspecto, el cáncer hematopoyético comprende una leucemia o un linfoma.

De acuerdo con un aspecto, el sujeto tiene una enfermedad no maligna.

De acuerdo con un aspecto, la enfermedad no maligna es una enfermedad o trastorno genético, una enfermedad autoinmune o un trastorno metabólico.

Las enfermedades no malignas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), anemia de células falciformes (anemia de células falciformes), neutropenia congénita, trombocitopenia, anemia aplásica (por ejemplo, anemia aplásica grave), síndrome mielodisplásico, monosomía 7, osteopetrosis, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, leucodistrofia metacromática, leucodistrofia suprarrenal, talasemia, anormalidad hematopoyética congénita o genéticamente determinada, adenosina desaminasa (ADA), lupus, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, diabetes mellitus de tipo I, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, artritis reumatoide, esclerodermia y psoriasis.

De acuerdo con un aspecto, el tema de la presente divulgación puede sufrir alguna enfermedad cardiovascular, una enfermedad reumatoide, una enfermedad glandular, una enfermedad gastrointestinal, una enfermedad cutánea, una enfermedad hepática, una enfermedad neurológica, una enfermedad muscular, una enfermedad nefrítica, una enfermedad del tejido conectivo, una enfermedad sistémica y/o una enfermedad relacionada con la reproducción, tratable por trasplante de células o tejidos.

Como se usa en el presente documento, la frase "injerto de células o tejidos" se refiere a una célula corporal (por ejemplo, una sola célula o un grupo de células) o tejido (por ejemplo, tejidos sólidos o tejidos blandos, que pueden trasplantarse en su totalidad o en parte). Los tejidos ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y tejidos linfoides/hematopoyéticos (por ejemplo, ganglios linfáticos, parches de Peyer, timo o médula ósea). Las células ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, células hematopoyéticas inmaduras incluyendo células madre. La presente divulgación también contempla el trasplante de órganos completos, tales como, por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas o bazo.

De acuerdo con un aspecto, el injerto celular o tisular comprende células hematopoyéticas inmaduras.

De acuerdo con un aspecto, el método se efectúa usando una célula o tejido, que no es singénico con el sujeto.

Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse usando un injerto celular o tisular que sea alogénico o xenogénico con el sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a una célula o tejido que deriva de un donante que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Normalmente, los mamíferos gemelos exogámicos no cigóticos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que un donante alogénico puede ser HLA idéntico o HLA no idéntico (es decir, mostrar uno o más determinantes HLA dispares) con respecto al sujeto.

De acuerdo con un aspecto, el donante alogénico es un hermano compatible con HLA, un donante no relacionado con HLA compatible, un donante relacionado con HLA haploideéntico o un donante que muestra uno o más determinantes HLA dispares.

Como se usa en el presente documento, el término "xenogénico" se refiere a una célula o tejido que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente con respecto a la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Normalmente, los mamíferos exogámicos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

La presente descripción prevé que las células o tejidos xenogénicos derivan de una diversidad de especies tales como, pero no limitado a, bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), porcinos (por ejemplo, cerdo), óvidos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domesticus*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, macaco de la india, mono macaco, tití).

Las células o tejidos de origen xenogénico (por ejemplo, origen porcino) se obtienen preferentemente de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tales como los retrovirus endógenos porcinos. De forma similar, las células o tejidos derivados de humanos se obtienen preferentemente de fuentes sustancialmente libres de patógenos.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, tanto el sujeto como el donante son humanos.

Dependiendo de la aplicación y las fuentes disponibles, el injerto celular o tisular de la presente divulgación puede obtenerse de un organismo prenatal, un organismo postnatal, un adulto o un donante cadáver. Además, dependiendo de la aplicación necesaria, la célula o el injerto de tejido pueden estar sin exposición previa o estar genéticamente modificados. La determinación del tipo de injerto de células o tejidos a usar está dentro de la capacidad de un experto en la materia. Adicionalmente, Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para obtener un injerto de células o tejidos (por ejemplo, para trasplante).

Como se ha mencionado, una dosis de células o tejido hematopoyético agotados en linfocitos T que comprende células hematopoyéticas inmaduras (incluyendo, por ejemplo, CD34+), se trasplanta a un sujeto.

5 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T no son singénicas (por ejemplo, alogénicas o xenogénicas) con el sujeto.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T y la célula o el injerto de tejido son singénicos (por ejemplo, obtenidos del mismo donante).

10 Como se usa en el presente documento la frase "células hematopoyéticas inmaduras" se refiere a un tejido hematopoyético o preparación celular que comprende células hematopoyéticas precursoras. Tal preparación de tejido/célula incluye o deriva de una muestra biológica, por ejemplo, médula ósea, sangre periférica movilizada (por ejemplo, movilización de células CD34 para mejorar su concentración), sangre del cordón umbilical (por ejemplo, cordón umbilical), hígado fetal, saco vitelino y/o placenta. Adicionalmente, las células CD34+ purificadas u otras
15 células madre hematopoyéticas tales como las células CD131+ pueden usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas, ya sea con o sin expansión *ex vivo*.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.

20 Como se usa en el presente documento, la frase "células hematopoyéticas inmaduras agotadas en linfocitos T" se refiere a una población de células hematopoyéticas que están agotadas en linfocitos T. Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, puede incluir, por ejemplo, células CD34+, CD33+ y/o CD56+. Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T pueden estar agotadas de células CD3+, células CD2+, células
25 CD8+, células CD4+, linfocitos T α/β y/o linfocitos T γ/δ .

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden células sanguíneas movilizadas G-CSF agotadas en linfocitos T enriquecidas para células hematopoyéticas inmaduras CD34+.

30 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos T CD3+.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 50×10^5 linfocitos T CD3+, 40×10^5 linfocitos T CD3+, 30×10^5 linfocitos T CD3+, 20×10^5 linfocitos T CD3+, 15×10^5 linfocitos T CD3+, 10×10^5 linfocitos T CD3+, 9×10^5 linfocitos T CD3+, 8×10^5 linfocitos T CD3+, 7×10^5 linfocitos T CD3+, 6×10^5 linfocitos T CD3+, 5×10^5 linfocitos T CD3+, 4×10^5 linfocitos T CD3+, 3×10^5 linfocitos T CD3+, 2×10^5 linfocitos T CD3+ o 1×10^5 linfocitos T CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 5×10^5 linfocitos T CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

40 De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 20×10^5 linfocitos T CD3+ pero más de 10 linfocitos T CD3+.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden al menos 1×10^3 - 1×10^5 linfocitos T CD3+.

45 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de células CD8+.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 1×10^4 - 4×10^5 células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 50×10^5 células CD8+, 25×10^5 células CD8+, 15×10^5 células CD8+, 10×10^5 células CD8+, 9×10^5 células CD8+, 8×10^5 células CD8+, 7×10^5 células CD8+, 6×10^5 células CD8+, 5×10^5 células CD8+, 4×10^5 células CD8+, 3×10^5 células CD8+, 2×10^5 células CD8+, 1×10^5 células CD8+, 9×10^4 células CD8+, 8×10^4 células CD8+, 7×10^4 células CD8+, 6×10^4 células CD8+, 5×10^4 células CD8+, 4×10^4 células CD8+, 3×10^4 células CD8+, 2×10^4 células CD8+ o 1×10^4 células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 4×10^5 células CD8+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 4×10^5 células CD8+ pero más de 10 células CD8+.

65 De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 1×10^6 células CD8+ TCR α/β - por kilogramo de peso corporal del sujeto.

- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 1×10^6 células CD8⁺ TCR α/β ⁻, $0,5 \times 10^6$ células CD8⁺ TCR α/β ⁻, 1×10^5 células CD8⁺ TCR α/β ⁻, $0,5 \times 10^5$ células CD8⁺ TCR α/β ⁻, 1×10^4 células CD8⁺ TCR α/β ⁻, $0,5 \times 10^4$ células CD8⁺ TCR α/β ⁻, 1×10^3 células CD8⁺ TCR α/β ⁻ o $0,5 \times 10^3$ células CD8⁺ TCR α/β ⁻ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 1×10^6 células CD8⁺ TCR α/β ⁻ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 1×10^6 células CD8⁺ TCR α/β ⁻ pero más de 10 células CD8⁺ TCR α/β ⁻.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos B.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras están agotadas de linfocitos B (linfocitos B CD19⁺ y/o CD20⁺).
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de 50×10^5 linfocitos B, 40×10^5 linfocitos B, 30×10^5 linfocitos B, 20×10^5 linfocitos B, 10×10^5 linfocitos B, 9×10^5 linfocitos B, 8×10^5 linfocitos B, 7×10^5 linfocitos B, 6×10^5 linfocitos B, 5×10^5 linfocitos B, 4×10^5 linfocitos B, 3×10^5 linfocitos B, 2×10^5 linfocitos B o 1×10^5 linfocitos B por kilogramo de peso corporal del sujeto.
- De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de 4×10^5 linfocitos B por kilogramo de peso corporal del sujeto. De acuerdo con un aspecto específico, las células hematopoyéticas inmaduras comprenden menos de 50×10^5 linfocitos B pero más de 10 linfocitos B.
- El agotamiento de los linfocitos T, por ejemplo, CD3⁺, CD2⁺, TCR α/β ⁺, células CD4⁺ y/o CD8⁺, o linfocitos B, por ejemplo, células CD19⁺ y/o CD20⁺, puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica, tales como por erradicación (por ejemplo, matar) con anticuerpos específicos o por purificación basada en afinidad, tal como mediante el uso de clasificación celular activada magnéticamente (MACS™) disponible de Miltenyi Biotec (representada con detalle adicional a continuación), clasificador FACS y/o captura de marcado ELISA.
- Dichos métodos se describen en el presente documento y en THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volúmenes 1 a 4, (D.N. Weir, editor) y FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 1992). Por ejemplo, las células pueden clasificarse por, por ejemplo, citometría de flujo o FACS. Por lo tanto, puede usarse la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y puede tener diversos grados de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, y canales de impedancia. Cualquier técnica de separación dependiente de ligando conocida en la técnica puede usarse junto con técnicas de separación tanto positivas como negativas que se basan en las propiedades físicas de las células en lugar de la afinidad de anticuerpos, incluyendo pero no limitado a elutriación y centrifugación en gradiente de densidad.
- Otros métodos para la clasificación celular incluyen, por ejemplo, selección y separación usando técnicas de afinidad, incluyendo aquellas técnicas que usan soportes sólidos tales como placas, perlas y columnas. Por lo tanto, las muestras biológicas pueden separarse mediante "barrido" con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, a una placa.
- De manera alternativa, las células pueden clasificarse/separarse mediante técnicas de separación magnética, y algunos de estos métodos utilizan perlas magnéticas. Hay diferentes perlas magnéticas disponibles de varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Dynal (Noruega), Advanced Magnetics (Cambridge, MA, EE.UU.), Immuncon (Filadelfia, EE.UU.), Immunotec (Marsella, Francia), Invitrogen, Stem cell Technologies (EE.UU.), Cellpro (EE.UU.) y Miltenyi Biotec GmbH (Alemania). De manera alternativa, los anticuerpos pueden biotinilarse o conjugarse con digoxigenina y usarse junto con columnas de afinidad recubiertas con avidina o anti-digoxigenina.
- De acuerdo con un aspecto, pueden combinarse diferentes métodos de agotamiento/separación, por ejemplo, la clasificación celular magnética puede combinarse con FACS, para aumentar la calidad de separación o permitir la clasificación por múltiples parámetros.
- De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen mediante reducción en volumen de linfocitos T (TCD).
- La reducción en volumen de linfocitos T puede efectuarse usando anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD8, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD2, anticuerpos anti-TCR α/β y/o anticuerpos anti-TCR γ/δ .
- De acuerdo con un aspecto, el agotamiento de los linfocitos B se efectúa mediante reducción en volumen de

linfocitos B.

La reducción en volumen de linfocitos B puede efectuarse usando anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD19 o anti-CD20. De manera alternativa, la reducción en volumen *in vivo* de los linfocitos B puede lograrse mediante la infusión de anticuerpos anti-CD20.

De manera alternativa, la selección positiva de células madre CD34+ o CD131+ puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, técnicas de separación celular magnética (por ejemplo, MACS™), clasificador FACS y/o captura de marcado ELISA como se describe en más detalle anteriormente.

A continuación se presentan varios ejemplos no limitantes para el agotamiento de las poblaciones de células de interés (por ejemplo, linfocitos T y/o B) de las células hematopoyéticas inmaduras de acuerdo con la presente divulgación antes del trasplante de las mismas:

I. Separación de linfocitos T auxiliares reguladores activados siguiendo las enseñanzas de la publicación PCT n.º WO 2007/110249 y la patente de EE.UU. n.º 8.129.126:

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para separar linfocitos T auxiliares (Th) CD4+ CD25+ reguladores activados a partir de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) mediante el uso del receptor 4-1BB.

Las células reguladoras pueden identificarse y/o separarse mediante la expresión de uno y/o más marcadores. Es posible emplear para este fin cualquier marcador conocido por el trabajador calificado para identificación y/o separación. Los marcadores ejemplares son 4-1BB, CD25, CTLA-4 (antígeno linfocito T citotóxico-4), GITR (receptor de TNF inducido por glucocorticoides), FoxP3, IL-10, CD69, CD40L, ICOS, OX40 y TGFbeta, que se emplean individualmente y/o en combinación. Es posible para este fin también emplear todos los marcadores conocidos por el trabajador calificado para la exclusión o el agotamiento de las células no reguladoras en combinación. Sin embargo, en un aspecto particular, el receptor 4-1BB (CD137) se usa como marcador células reguladoras vivas activadas.

II. Separación de linfocitos T reguladores o linfocitos T no reguladores siguiendo las enseñanzas de la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20110097313:

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para separar linfocitos T reguladores (Tregs) o linfocitos T no reguladores (linfocitos T convencionales) de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) mediante el uso de la molécula CD154 [ligando CD40 (CD40L)].

Como los linfocitos Treg activados (Treg CD4+ CD25+) no expresan CD154, la presente divulgación contempla la separación entre linfocitos T convencionales activados (por ejemplo, activados por antígeno) (células CD154+) y Treg (células CD154-) usando un agente capaz de reconocer CD154 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD154).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para separar linfocitos Treg activados de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) usando un agente capaz de reconocer CD154. La presente divulgación contempla además el uso de marcadores adicionales que son específicos para los linfocitos T reguladores, tales como, por ejemplo, CD25, GITR, CTLA4 o marcadores que son específicos para los linfocitos T reguladores activados, tales como, por ejemplo, CD137, "TGF-beta latente (LAP)", GARP (LRRC32), CD121a/b para la selección positiva de Tregs.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para obtener linfocitos T auxiliares (Th) convencionales activados a partir de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) usando el marcador CD154. Específicamente, usando el marcador CD154, los linfocitos Th convencionales activados (células que expresan CD154) pueden eliminarse de una preparación celular (que comprende linfocitos T reguladores), en particular, cuando los métodos de selección adicionales que usan marcadores para células reguladoras activadas/no activadas (CD137 y CD25, respectivamente) se usan simultánea o posteriormente, lo que permite el uso de la divulgación para identificar el aislamiento de linfocitos Th reguladores específicos de antígeno.

Por lo tanto, después de obtener una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) de un donante y/o un sujeto, los linfocitos T reguladores pueden enriquecerse usando, por ejemplo, CD25. Estas células pueden estimularse posteriormente con un antígeno particular. Para este fin, pueden usarse anticuerpos, péptidos, proteínas, sustancias químicas (o mezclas de las mismas) o patógenos o células. Después de un tiempo de activación particular, los linfocitos Th reguladores se identifican y/o se separan, por ejemplo, a través del uso del marcador CD137. De este modo, los linfocitos Th reguladores específicos de antígeno se identifican y/o se separan preferentemente.

III. Separación de linfocitos T específicos de antígeno siguiendo las enseñanzas de la Patente de EE.UU. n.º 7.659.084:

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un uso de CD154 [ligando CD40 (CD40L)] para el aislamiento de linfocitos T específicos de antígeno en donde la preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) se pone en contacto con un inhibidor del sistema CD40/CD154.

- 5 De acuerdo con un aspecto de la divulgación, los linfocitos T son linfocitos T auxiliares T (Th) CD4+ o CD8+.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se detectan y/o se obtienen linfocitos T inflamatorios, antiinflamatorios, reguladores y/o supresores.

- 10 La divulgación también se refiere a un método para el aislamiento de linfocitos T específicos de antígeno en una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) después de la activación con un antígeno, en cuyo método se pone en contacto la preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) con un inhibidor del sistema CD40/CD154, se efectúa la determinación intra- y/o extracelular de CD154 y se aíslan las células que tienen CD154.

- 15 Se apreciará que tal "puesta en contacto" con un inhibidor del sistema CD40/CD154 de la preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) permite la determinación intra- y/o extracelular de CD154 y, por lo tanto, el aislamiento o la separación de células que tienen CD154, representando las células en particular los linfocitos Th CD4+ específicos de antígeno completos.

- 20 Específicamente, la adición de un inhibidor del sistema CD40/CD154 perjudica o inhibe la interacción y la señalización entre CD40 y CD154. En el sentido de la divulgación, los inhibidores del sistema CD40/CD154 pueden ser cualquiera de las moléculas o incluso exposiciones físicas capaces de bloquear o inhibir la interacción entre CD40 y CD154.

- 25 En consecuencia, el agente inhibidor puede ser un anticuerpo, por ejemplo, uno dirigido contra CD40 o dirigido contra CD154, una molécula, un ion cesio o litio que tiene un efecto sobre la interacción entre CD40 y CD154. El agente también puede ser una sustancia que inhibe la secreción o la endocitosis en la célula, tales como brefeldina A (Bref-A) y/o monensina. Brefeldina A es un metabolito del hongo *Penicillium brefeldianum* y, siendo un ionóforo carboxilado, bloquea el transporte de proteínas recién sintetizadas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y dificulta el intercambio entre endosomas y lisomas, mientras que la circulación entre la membrana celular y los endosomas permanece ventajosamente sin molestias.

- 30 Estas sustancias aseguran que CD40, CD154, la interacción entre los dos, o el sistema CD40/CD154 se modifica de tal manera que CD154 ya no está regulado negativamente y/o degradado en la superficie celular o, siempre que todavía esté dentro de la célula, ya no se transporta en la misma. Tal interrupción del transporte dentro de la célula evita la degradación de CD154. Por consiguiente, CD154 se estabiliza dentro o fuera de la célula como un receptor externo, permitiendo de esta manera la detección y el posterior aislamiento usando métodos de detección bien conocidos por los expertos en la materia (explicados con detalle adicional en el presente documento).

- 40 IV Separación de células siguiendo las enseñanzas de la Publicación PCT n.º WO 94/09117 y la patente de EE.UU. n.º 7.166.423:

- 45 De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para la separación de células (por ejemplo, linfocitos B o linfocitos T) de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) basado en uno o más productos secretados por estas células (por ejemplo, citocinas, que incluyen pero no se limitan a, IFN γ , IL1, IL2, IL4, IL10, IL12, TGF-beta, TNF, GM-CSF y SCF, anticuerpos, hormonas, enzimas y proteínas). El método permite capturar productos secretados por las células (por ejemplo, linfocitos B o linfocitos T) en la superficie de la célula (por ejemplo, linfocitos B o linfocitos T). El producto capturado permite que la célula (por ejemplo, linfocitos B o linfocitos T) se clasifique de acuerdo con la presencia, ausencia o cantidad de producto presente. Los medios de captura comprenden un resto de captura que se ha anclado a la superficie celular por un medio adecuado para que la célula se clasifique.

- 50 El resto de captura puede estar acoplado a los medios de anclaje (el "resto de anclaje") opcionalmente a través de un resto de enlace, y también puede incluir un resto de enlace que multiplica el número de restos de captura disponibles y, por lo tanto, el potencial de captura del producto, tales como polímeros ramificados, incluyendo, por ejemplo, moléculas de dextrano modificadas, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona.

- 60 Los restos de anclaje adecuados a la superficie celular incluyen moléculas lipófilas tales como ácidos grasos. Los ejemplos de moléculas de superficie celular adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cualquier molécula asociada a la superficie celular. Las moléculas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, marcadores de la superficie celular tales como CD45 (pan leucocito), CD3 (linfocitos T (activación)), CD4, CD8, CD19, CD20, CD14, CD16, CD15, moléculas MHC de clase I y MHC de clase II, CD34, CD38, CD33, receptor de linfocitos T CD56, receptor Fc, beta2microglobulina o inmunoglobulina, y otros marcadores de CD o moléculas de adhesión celular. De manera alternativa, también podrían usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a las moléculas de la

superficie celular tales como los antígenos o glucoproteínas del MHC.

Los compañeros de unión específicos incluyen restos de captura y restos marcadores. Los restos de captura son aquellos que unen tanto a la célula, ya sea directa o indirectamente, como al producto. Los restos marcadores son aquellos que se adhieren al producto y pueden marcarse directa o indirectamente. Los compañeros de unión específicos incluyen cualquier resto para el cual existe una afinidad y especificidad relativamente altas entre el producto y su compañero de unión, y en donde la disociación del complejo producto:compañero es relativamente lenta de modo que el complejo producto:compañero asociado se detecta durante la técnica de marcado o separación celular.

Los restos marcadores específicos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos anti-producto fluorocromados, que pueden incluir, perla magnética conjugada, perla coloidal conjugada, FITC, Ficoeritrina, PerCP, AMCA, partículas fluorescentes o anticuerpos conjugados con liposomas.

Los compañeros de unión específicos pueden incluir, pero no se limitan a, sustratos o análogos de sustrato a los que se unirá un producto. Estos sustratos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polisacáridos, esteroides, biotina, digitoxina, digitonina y otras moléculas capaces de unirse al producto secretado y en un aspecto específico incluirán anticuerpos. Cuando el resto de captura es un anticuerpo, puede denominarse "anticuerpo de captura" o "anticuerpo de atrape". Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende incluir policlonal y monoclonal.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, haptenos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y moléculas que son equivalentes de anticuerpos en el sentido de que se unen específicamente a un epítipo en el antígeno del producto. Los anticuerpos biespecíficos, también conocidos como anticuerpos bifuncionales, tienen al menos un sitio de reconocimiento de antígeno para un primer antígeno y al menos un sitio de reconocimiento de antígeno para un segundo antígeno. Tales anticuerpos pueden producirse por métodos de ADN recombinante o químicamente por métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos biespecíficos creados químicamente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se han reducido y reformado para retener sus características bivalentes y anticuerpos que se han acoplado químicamente para que tengan al menos dos sitios de reconocimiento de antígeno para cada antígeno. Los anticuerpos biespecíficos incluyen todos los anticuerpos o conjugados de anticuerpos, o formas poliméricas de anticuerpos que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes. Los anticuerpos pueden inmovilizarse en un polímero o partícula.

De acuerdo con un aspecto, el resto de captura se puede unir a una membrana celular mediante una diversidad de métodos. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, acoplamiento químico dirigido a grupos amino de los componentes proteicos; acoplamiento a tioles (formados después de la reducción de puentes disulfuro) de los componentes proteicos; acoplamiento indirecto a través de anticuerpos (incluyendo pares de anticuerpos); anclaje en la bicapa lipídica por medio de un resto de anclaje hidrófobo; y unión a la superficie celular cargada negativamente por policationes.

En otros aspectos de la divulgación, el resto de captura se introduce usando dos o más etapas, por ejemplo, marcando las células con al menos un resto de anclaje que permite el acoplamiento del resto de captura al resto de anclaje directamente, por ejemplo, mediante un complejo de biotina/avidina o indirectamente a través de un resto o restos de unión adecuados.

Los métodos para el acoplamiento químico directo de anticuerpos a la superficie celular son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, acoplamiento usando glutaraldehído o anticuerpos activados con maleimida. Los métodos para el acoplamiento químico utilizando procedimientos de múltiples pasos incluyen, por ejemplo, biotinylación, acoplamiento de TNP o digoxigenina usando, por ejemplo, ésteres de succinimida de estos compuestos. La biotinylación puede lograrse mediante, por ejemplo, el uso de D-biotinil-N-hidroxysuccinimida. Los grupos succinimida reaccionan eficazmente con grupos amino a valores de pH superiores a 7, y preferentemente entre aproximadamente pH 8,0 y aproximadamente pH 8,5. La biotinylación también se puede lograr mediante, por ejemplo, el tratamiento de las células con ditiotretol (DTT) seguido de la adición de biotina maleimida.

El acoplamiento a los linfocitos también puede lograrse usando anticuerpos contra los antígenos de la superficie celular ("marcadores"). Los anticuerpos generalmente dirigidos a antígenos de superficie pueden ser necesarios en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1 µg de anticuerpo por 10⁷ células, sin embargo, este requisito variará ampliamente en respuesta a la afinidad del anticuerpo con el producto y deberá determinarse empíricamente. Una determinación tal está dentro de la habilidad de un experto en la materia. Por lo tanto, la cantidad apropiada de anticuerpo debe determinarse empíricamente y está dentro de la habilidad de un experto en la materia. Esto permite el acoplamiento a células específicas en la expresión del marcador específico del tipo de célula. Por ejemplo, las clases de células basadas tales como los linfocitos T o subconjuntos de los mismos pueden marcarse específicamente. Como un resto de captura, puede usarse un anticuerpo biespecífico que tiene un sitio de reconocimiento de antígeno para la célula o un resto de anclaje colocado sobre el mismo, y el producto.

Un resto de captura, particularmente los anticuerpos de captura deben seleccionarse en función de la cantidad de

producto secretado. Por ejemplo, para células que secretan solo unas pocas moléculas, debe elegirse un anticuerpo de alta afinidad para atrapar la mayoría de las moléculas secretadas. De manera alternativa, en el caso donde la célula secreta muchas moléculas durante el tiempo de incubación, puede preferirse un anticuerpo de menor afinidad para evitar la saturación demasiado temprana de la matriz de captura. La determinación de las afinidades adecuadas para el nivel de proteínas secretadas se determina empíricamente y está dentro de la habilidad de un experto en la materia.

En algunos aspectos de la divulgación, el resto de captura está acoplado a la célula mediante restos de anclaje hidrófobos a la membrana celular. Los restos de anclaje hidrófobos adecuados que interactuarán con la bicapa lipídica de la membrana son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos y detergentes no iónicos (incluyendo, por ejemplo, Tween-80). Una desventaja de la unión del resto de captura a la célula mediante la inserción de un resto de anclaje es que la tasa de integración del resto de anclaje en la célula es baja. Por lo tanto, a menudo se requieren altas concentraciones del resto de anclaje. Esta última situación a menudo no es económica cuando el resto de captura es una sustancia relativamente limitada o costosa, por ejemplo, un anticuerpo. El bajo rendimiento de restos de anclaje hidrófobos que se incrustan en la membrana es relevante solo cuando estas moléculas están disponibles en cantidades relativamente limitadas. Este problema puede superarse mediante el uso de un sistema de puente que incluye un resto de anclaje y un resto de captura, en donde uno de los restos es de mayor disponibilidad, y en donde las dos partes del sistema de puente tienen un alto grado de especificidad y afinidad entre sí. Por ejemplo, en un aspecto, la avidina o estreptavidina se une a la superficie celular a través de un resto de anclaje hidrófobo, mientras que el resto de captura es un anticuerpo antiproducido biotinilado.

En otro aspecto, la superficie celular está marcada con digoxigenina seguida de anticuerpos biespecíficos que tienen especificidad tanto por digoxigenina como por el producto. Este enfoque puede usarse con otros pares de moléculas capaces de formar un enlace, incluyendo, por ejemplo, hapteno con anticuerpos antihapteno o NTA con restos de polihistidina. Un aspecto específico es aquel que permite la "amplificación" del sistema aumentando el número de restos de captura por resto de anclaje.

En un aspecto ilustrativo, un dextrano ramificado está unido al ácido palmítico, proporcionando de esta manera una multiplicidad de sitios de unión disponibles. El dextrano se acopla a su vez a la biotina y se trata con un anticuerpo conjugado con avidina específico para el producto. Por supuesto, se contempla dentro de los aspectos de la divulgación que puedan usarse restos enlazadores entre el resto de anclaje y el resto de captura cuando el resto de anclaje se acopla de cualquier manera a la superficie celular. Por lo tanto, por ejemplo, un resto enlazador de biotina avidina (o estreptavidina) puede unir un resto de anclaje de anticuerpo con un resto de captura. Los sistemas de anticuerpos biespecíficos también pueden actuar como restos enlazadores.

Para seleccionar células que tienen la capacidad de secretar el producto de interés, las células modificadas como anteriormente para contener el resto de captura se incuban en condiciones que permiten la producción y la secreción del producto en una cantidad suficiente para permitir la unión y detección de las células que contienen el producto capturado. Estas condiciones son conocidas por aquellos expertos en la materia e incluyen, entre otros, temperatura, pH y concentraciones de sales adecuados, factores de crecimiento y sustratos en el medio de incubación, así como las concentraciones apropiadas de gas en la fase gaseosa. Cuando es deseable distinguir entre células productoras altas y bajas, el tiempo de incubación es tal que la secreción del producto por las células todavía está en una fase lineal. Las condiciones apropiadas pueden determinarse empíricamente y tal determinación está dentro de la habilidad de un experto en la materia.

Adicionalmente, la secreción por las células puede modificarse, que está regulada positivamente, inducida o reducida usando un modificador biológico. Los modificadores biológicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, moléculas y otras células. Las moléculas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fármacos, citocinas, moléculas pequeñas, hormonas, combinaciones de interleucinas y otros agentes estimulantes, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y otros agentes que modifican las funciones celulares o la expresión de proteínas. Otras células incluyen, pero no se limitan a, interacciones directas de célula a célula tales como entre un tumor y un linfocito T e interacciones indirectas de célula a célula tales como las inducidas por la proximidad de otras células que secretan un modificador biológico. Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células sanguíneas, células periféricas de médula ósea (PBMC) y diversas líneas celulares. Los modificadores biológicos pueden añadirse en cualquier momento, pero preferentemente se añaden al medio de incubación.

De manera alternativa, las células pueden tratarse previamente con estos agentes o células antes de la etapa de incubación. Las condiciones de incubación también son tales que el producto secretado por las células productoras no es esencialmente capturado por otra célula, por lo que es posible distinguir las células no productoras de las células productoras o los productores altos de los productores bajos. En general, el tiempo de incubación es de entre 5 minutos y diez horas, y más habitualmente es de entre 1 y 5 horas. El medio de incubación puede incluir opcionalmente una sustancia que ralentiza la difusión del producto secretado desde la célula productora. Las sustancias que inhiben la difusión del producto en medios líquidos y que no son tóxicas para las células son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una diversidad de sustancias que gelifican parcial o completamente, incluyendo, por ejemplo, alginato, agarosa de bajo punto de fusión y gelatina.

Al variar la viscosidad o permeabilidad del medio, la captura local por una célula productora de ciertos tamaños de productos secretados puede modularse. La exclusión por tamaño del peso molecular del medio puede ajustarse para optimizar la reacción. La composición óptima del medio puede determinarse empíricamente y está influenciada por la concentración celular, el nivel de secreción y el peso molecular del producto y la afinidad de los anticuerpos de captura por el producto. Una determinación tal está en la habilidad de un experto en la materia.

Preferentemente, Los geles se solubilizan después de la incubación para permitir el aislamiento de las células o grupos de células de los medios mediante técnicas de clasificación celular. Por lo tanto, por ejemplo, los geles pueden estar unidos por enlaces disulfuro que pueden estar disociados por agentes reductores de sulfhidrilo como/3-mercaptopetanol o DTT o los geles pueden contener reticulaciones iónicas, incluyendo, por ejemplo, iones calcio, que se solubilizan mediante la adición de un agente quelante como EDTA.

En un aspecto específico, durante la fase de secreción, las células se incuban en un medio gelatinoso y, preferentemente, la limitación de tamaño de la penetración en el gel impide que el producto entre sustancialmente en el gel.

Una alternativa o adición al uso de un medio viscoso o gelatinoso para evitar la contaminación cruzada celular inespecífica es proporcionar un sistema de captura para capturar productos no capturados por el sistema de captura de la superficie celular en la célula secretora. Por ejemplo, Esta técnica puede usarse en el caso de que muchos tipos de células produzcan un producto o si no puede crearse una barrera de difusión suficiente entre las células. Esto puede lograrse añadiendo al medio que rodea las perlas de las células (por ejemplo, perlas de látex) conjugadas con un producto de anticuerpo del sobrenadante. De manera alternativa, podrían emplearse geles con anticuerpos inmovilizados u otros restos capaces de retirar el producto no unido del medio. Estos restos de atrapamiento son capaces de retener estos productos no deseados o evitar que se unan a las células no secretoras uniéndose a los productos no retenidos. Este "sistema de captura de basura" puede consistir en inmovilizarse en la matriz de gel o puede estar unido a partículas magnéticas u otros tipos. La ubicación y las características de captura del sistema de captura de basura deben ajustarse para que suficientes moléculas de producto se unan específicamente a las células secretoras, minimizando así el fondo en las células no productoras.

Al final de la fase de secreción, la matriz de gel (si la hay) se solubiliza. Las células que contienen el producto capturado se marcan con un resto marcador. El marcaje puede realizarse por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos antiproduitos pueden usarse para marcar directa o indirectamente las células que contienen el producto. Los marcadores usados son aquellos que son adecuados para su uso en sistemas en donde las células se analizarán o clasificarán en función de la unión del resto de marcador al producto.

En otros aspectos, pueden detectarse restos de captura que no contienen producto capturado. Esto permite, por ejemplo, el aislamiento de células que secretan grandes cantidades de producto mediante el empleo de un método de separación negativa, es decir, detección de células no altamente saturadas con producto. Las células pueden marcarse con otras sustancias que reconocen, incluyendo, pero no limitado a, marcadores de superficie celular, tipo celular, parámetros celulares tales como el contenido de ADN, estado de la célula o número de restos de captura.

La enumeración de los restos de captura reales puede ser importante para compensar las cantidades variables de estas moléculas debido a, por ejemplo, diferentes potenciales de conjugación de las células. Puede ser especialmente importante para el aislamiento de células raras excluir células con capacidad disminuida o aumentada para unir el sistema de captura del producto, incluyendo los restos de ancla y captura.

El análisis de la población celular y la clasificación celular en función de la presencia del marcador puede lograrse mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica y se describen con más detalle en el presente documento.

V Separación de linfocitos T específicos de antígeno siguiendo las enseñanzas de la Patente de EE.UU. n.º 6.576.428:

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para la separación celular de linfocitos T específicos de antígeno de una preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) basado en uno o más productos secretados por estos linfocitos T (por ejemplo, citocinas o factores de crecimiento, que incluyen pero no se limitan a, IL-3, GM-CSF, IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-10 y/o IL-13) en respuesta a la estimulación antigénica. Los linfocitos T se proporcionan con un resto de captura (por ejemplo, anticuerpo) para el producto, que después puede usarse directamente como marcador en algunos casos, o el producto unido puede marcarse más a través de restos de etiqueta (es decir, resto detectable) que se unen específicamente al producto y que se marcan con materiales de marcaje tradicionales tales como fluoróforos, isótopos radiactivos, cromóforos o partículas magnéticas. Las células marcadas se separan después usando técnicas de clasificación de células convencionales basadas en estos marcadores. Dichas técnicas incluyen citometría de flujo, separación por gradiente magnético, centrifugación, y similares (como se describe con detalle adicional en el presente documento).

De acuerdo con un aspecto, la estimulación de antígeno se logra exponiendo la preparación celular (por ejemplo,

células hematopoyéticas inmaduras) a al menos un antígeno en condiciones eficaces para provocar la estimulación específica de antígeno de al menos un linfocito T. El marcaje con el producto se logra modificando la superficie de las células para contener al menos un resto de captura, cultivar las células en condiciones en donde el producto se secreta, se libera y se une específicamente ("se captura" o "se atrapa") al resto de captura; y marcar el producto capturado con un resto marcador, donde las células marcadas no se lisan como parte del procedimiento de marcaje o como parte del procedimiento de separación.

De acuerdo con otro aspecto, la preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) puede someterse adicionalmente a uno o más protocolos de separación basados en la expresión de marcadores de superficie celular. Por ejemplo, las células pueden someterse a una selección positiva basado en la expresión de uno o más polipéptidos de la superficie celular, incluyendo, pero no limitado a, marcadores de la superficie celular del "grupo de diferenciación (CD)" tales como CD2, CD3, CD4, CD8, TCR, CD45, CD45RO, CD45RA, CD11b, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD40L; otros marcadores asociados a la activación de linfocitos, tales como el producto del gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), molécula de activación de linfocitos de señalización (SLAM), T1/ST2; receptores de quimiocinas tales como CCR3, CCR4, CXCR3, CCR5; receptores de migración dirigida tales como CD62L, CD44, CLA, CD146, alpha.4.beta.7, alpha.E.beta.7; marcadores de activación tales como CD25, CD69 y OX40; y lipoglucanos presentados por CD1. De manera alternativa, la preparación celular (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) puede someterse adicionalmente a una selección negativa para el agotamiento de células no T y/o subconjuntos particulares de linfocitos T. La selección negativa puede realizarse sobre la base de la expresión en la superficie celular de una diversidad de moléculas, incluyendo, pero no limitado a, marcadores de linfocitos B tales como CD19 y CD20; marcador de monocitos CD14; el marcador de linfocitos NK CD56.

Como se ha mencionado, La reducción en volumen de linfocitos T o linfocitos B puede realizarse *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en un donante antes de adquirir células hematopoyéticas inmaduras a partir del mismo).

A continuación se presentan varios ejemplos no limitantes para llevar a cabo la reducción en volumen de linfocitos T/B de acuerdo con la presente divulgación.

I. MACS™ siguiendo las enseñanzas de la Publicación PCT n.º WO 2009/066180.

De acuerdo con un aspecto, la reducción en volumen *in vitro* de linfocitos T o B (TCD y/o BCD) se efectúa mediante la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS™). Por lo tanto, MACS™ proporciona medios para la separación de una célula viva particular de una población de células vivas.

La separación celular se realiza típicamente añadiendo un anticuerpo a la población de células que se une específicamente a un epítipo extracelular de un marcador de superficie (en este caso marcador de linfocitos T/B, por ejemplo, un grupo de diferenciación, es decir, CD, polipéptido). Es ventajoso que el anticuerpo esté marcado con un agente detectable adecuado para la clasificación celular (separación celular), tal como un tinte fluorescente (por ejemplo, FITC) o un agente magnéticamente sensible (por ejemplo, perla).

Por lo tanto, el anticuerpo puede estar acoplado a un agente magnéticamente sensible, con lo cual el anticuerpo puede usarse para separar la célula unida a él en condiciones suficientes para unir específicamente los anticuerpos al epítipo (antígeno).

De acuerdo con un aspecto y como se enseña en el documento WO/2009/066180, el método comprende además las siguientes etapas: inmovilizar la célula que expresa el marcador de superficie que se une específicamente al anticuerpo marcado con un agente magnéticamente sensible en una matriz ferromagnética (descrita con más detalle a continuación) a través de un campo magnético; lavar la matriz para retirar las células no unidas; y retirar el campo magnético para eluir la célula de la matriz. De este modo, se proporciona una muestra celular enriquecida o que consiste en células que expresan el marcador de superficie.

La elución de la matriz ferromagnética puede realizarse usando flujo por gravedad, centrifugación, filtración al vacío o por presión positiva, por ejemplo, usando un émbolo.

La frase "clasificación de células magnéticas" como se usa en el presente documento se refiere a procedimientos para la separación de células (clasificación de células) incluyendo, pero no limitado a, separación magnética usando anticuerpos unidos a partículas magnéticas coloidales, cromatografía de afinidad y agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o se usan junto con cualquier técnica de separación dependiente de anticuerpos conocida en la técnica.

En un aspecto ejemplar, los anticuerpos monoclonales se usan junto con micropartículas superparamagnéticas coloidales que tienen un recubrimiento orgánico por, por ejemplo, polisacáridos (Miltenyi *et al.* (1990) *Citometry* 11:231-238). Estas partículas pueden usarse con un tamaño de 10 a 200 nm, preferentemente entre 40 y 100 nm, y puede conjugarse directamente con anticuerpos o usarse en combinación con perlas específicas anti-inmunoglobulina, avidina o anti-hapteno. Las partículas superparamagnéticas recubiertas de polisacárido están

disponibles en el mercado en Miltenyi Biotec GmbH, Alemania.

Los métodos para preparar partículas superparamagnéticas como se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.770.183 pueden combinarse con las presentes enseñanzas.

Con respecto a la terminología, como es el uso general en la técnica:

Como se usa en el presente documento, el término "ferromagnético" se refiere a materiales que son muy susceptibles a los campos magnéticos y son capaces de retener propiedades magnéticas cuando se retira el campo. El ferromagnetismo se produce solo cuando los electrones no apareados en el material están contenidos en una red cristalina permitiendo así el acoplamiento de los electrones no apareados.

Como se usa en el presente documento, el término "superparamagnético" se refiere a materiales que son altamente susceptibles magnéticamente, es decir, se vuelven fuertemente magnéticos cuando se colocan en un campo magnético, pero, pierden rápidamente su magnetismo. El superparamagnetismo se produce en materiales ferromagnéticos cuando el diámetro del cristal disminuye a menos de un valor crítico.

Se apreciará que el grado de magnetización que es adquirido por una partícula es función de su susceptibilidad magnética y del campo magnético aplicado. La magnetización es una función del momento magnético resultante y del volumen de la partícula. Cuanto mayor sea el momento magnético y menor sea el volumen, mayor será la magnetización.

II. MACS™ siguiendo las enseñanzas de la Patente de EE.UU. N.º 5.411.863.

De acuerdo con un aspecto, y como se enseña en la Patente de EE.UU. N.º 5.411.863, la separación celular [reducción en volumen *in vitro* de linfocitos T o B (TCD y/o BCD)] puede llevarse a cabo en una separación magnética de alto gradiente (HGMS), a saber, mediante un procedimiento para retener selectivamente materiales magnéticos o dianas no magnéticas marcadas con partículas magnéticas en una cámara o columna dispuesta en un campo magnético. Por lo tanto, por ejemplo, el fluido que contiene las partículas magnéticas se hace pasar a través de un recipiente o columna que está dispuesta en un gradiente magnético. En formas deseables para realizar separaciones celulares, el recipiente se llena con una matriz que es capaz de crear altos gradientes magnéticos en la vecindad de su superficie. Mientras que la fuerza del campo magnético impuesto sobre las partículas determina su magnetización, su retención es una función de la fuerza del gradiente magnético. Las partículas magnetizadas son retenidas por altos gradientes magnéticos. Las matrices típicas son metales filamentosos o particulados tales como lana de acero, alambres o filamentos o particulados o rejillas.

La presente divulgación proporciona además un método para recubrir tales matrices que protege de manera tanto eficiente como eficaz los materiales biológicos sometidos al paso a través de la matriz del daño que sería causado por la exposición de estos materiales a la superficie metálica. El recubrimiento en la matriz previene eficazmente la corrosión de las superficies metálicas y evita el paso de cualquier ion que pueda formarse en la superficie al fluido circundante. Adicionalmente, el revestimiento impermeable proporcionado por la descripción añade estabilidad física a la matriz.

Las publicaciones adicionales que describen una diversidad de sistemas HGMS se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 4.452.773, la Patente de EE.UU. N.º 4.230.685, la Solicitud PCT WO 85/04330, la Patente de EE.UU. N.º 4.770.183 y el documento PCT/EP89/01602; los sistemas también se describen en el N.º de serie de EE.UU. 07/291.177 y en el N.º de serie de EE.UU. 07/291.176.

III. Aparato de separación magnética (MACS™) siguiendo las enseñanzas de las patentes de EE.UU. N.º 5.786.161 y 5.711.871.

De acuerdo con un aspecto, puede usarse un dispositivo de separación magnética de acuerdo con la presente divulgación.

De acuerdo con un aspecto, un dispositivo de separación magnética para procedimientos de separación magnética contiene matrices que proporcionan poros o canales uniformes que reducen el atrapamiento de aire o sustancias no diana y disminuyen la pérdida de sustancias diana debido a la interrupción mecánica. Las células diana (por ejemplo, linfocitos B o T), de diversas muestras biológicas se marcan junto con un miembro de unión específico adecuado (por ejemplo, anticuerpo específico de linfocitos T/B, como se describe anteriormente) y se aíslan usando los dispositivos y métodos de la presente divulgación.

El sistema de separación puede seleccionar y separar específicamente una población definida de células (células diana) de una población de células mixtas, tales como sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical o placenta, sangre fetal o un producto de leucaféresis.

De acuerdo con un aspecto, se usa un dispositivo de separación magnética de alto gradiente (HGMS) de acuerdo con la presente divulgación.

Las matrices convencionales de separación magnética de alto gradiente se preparan típicamente a partir de materiales tales como alambres, fibra recubierta de metal o lana de acero. En el dispositivo de separación magnética mejorado de la presente divulgación, la matriz intensificadora de gradiente del separador magnético de alto gradiente se forma a partir de pequeñas esferas de material magnéticamente susceptible o ferromagnético. Dichos materiales incluyen, pero no se limitan a hierro, acero, cobalto, níquel y otros metales ferromagnéticos de tierras raras o aleaciones de los mismos. Por ejemplo, el material de la matriz puede incluir esferas metálicas ferromagnéticas tales como esferas de hierro (por ejemplo, MARABU Balls, Kugelfabrik Schulte & Co., Wermelskirchen, Alemania).

Se conocen muchos métodos diferentes de fabricación de esferas. Habitualmente las esferas tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 1,5 mm para la separación de células grandes o complejos celulares, y aproximadamente 0,05 a 0,2 mm de diámetro para material subcelular. Específicamente, las esferas tienen un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 0,5 mm y más específicamente, las esferas se seleccionan para tener un diámetro promedio que varía de aproximadamente 0,2 a 0,3 mm. Es deseable que el tamaño de las esferas sea relativamente homogéneo, habitualmente no variando más del 15 % del tamaño promedio, más habitualmente en no más de aproximadamente el 10 % y preferentemente en no más de aproximadamente el 5 %.

Las esferas están compuestas por un material ferromagnético (por ejemplo, hierro, acero, etc.), que puede recubrirse con un recubrimiento impermeable para evitar el contacto de las células con el metal. Por recubrimiento impermeable se entiende un recubrimiento polimérico que contiene sustancialmente menos del 30 % en peso de agua, que no permite el paso de iones y que se forma en la esfera como resultado de la aplicación pasiva, reticulación o polimerización de un polímero o copolímero relativamente hidrófobo. Los polímeros adecuados incluyen poliestirenos, poliácridamidas, polieteruretanos, polisulfonas, polímeros fluorados o clorados tales como cloruro de polivinilo, polietilenos y polipropilenos, policarbonatos y poliésteres, etc.

La matriz de esferas debe tener un área superficial adecuada para crear gradientes de campo magnético suficientes en el dispositivo de separación para permitir la retención eficiente de células marcadas magnéticamente. El volumen necesario para una separación dada puede determinarse empíricamente y variará con el tamaño de la célula, la densidad de antígeno en la superficie celular, la afinidad del anticuerpo, etc. El caudal estará determinado por el tamaño de la columna, pero generalmente no requerirá una cánula o válvula para regular el flujo.

Las células marcadas se retienen en el dispositivo de separación magnética en presencia de un campo magnético, habitualmente al menos aproximadamente 100 mT, más habitualmente al menos aproximadamente 500 mT, habitualmente no más de aproximadamente 2 T, más habitualmente no más de aproximadamente 1 T. La fuente del campo magnético puede ser un imán permanente o electroimán. Después de la unión inicial, el dispositivo puede lavarse con cualquier tampón fisiológico adecuado para eliminar las células no unidas.

Las células unidas se liberan del medio de separación magnética retirando el campo magnético y eluyendo en un tampón adecuado. Las células pueden recogerse en cualquier medio apropiado, preferentemente uno que mantiene la viabilidad de las células. Diversos medios están disponibles en el mercado y pueden usarse de acuerdo con la naturaleza de las células, incluyendo dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, PBS-EDTA, PBS, medio de Iscove, etc., que pueden suplementarse con suero de ternera fetal, BSA, HSA, etc. Las células pueden usarse después según sea apropiado y como se enseña en el presente documento.

En su forma más simple, el sistema de separación celular de la presente descripción tiene dos componentes principales: un separador magnético y un reactivo de separación celular. Un dispositivo de separación más complejo incluye pasajes de fluido, recipientes de recogida y almacenamiento y la columna de separación. El circuito de fluido puede construirse con válvulas integradas o las válvulas pueden aplicarse externamente a las vías de fluido.

Se describen dispositivos de separación magnética adicionales que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación en el documento WO/90/07380, el documento PCT/US96/00953 y el documento EP 438.520, el documento US 5.779.892, el documento US 6.417.011.

IV MACS™ siguiendo las enseñanzas de la Patente de EE.UU. N.º 6.900.029.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, puede seleccionarse una población de células usando partículas y sedimentación por gravedad como se enseña en la Patente de EE.UU. N.º 6.900.029. Por lo tanto, la reducción en volumen de linfocitos T/B puede llevarse a cabo mediante la retirada de una población o subpoblación de células no deseada (por ejemplo, células que expresan CD20, CD19, CD2, CD4, CD8) separándolas de una muestra biológica (por ejemplo, muestra de fluido), tales como sangre completa o médula ósea, rápidamente y con un alto rendimiento usando una pluralidad de partículas densas, relativamente pesadas que tienen uno o más reactivos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, unidos a las mismas mezclados con la muestra biológica (por ejemplo, muestra de fluido). Los anticuerpos unidos a las partículas pueden dirigirse a los linfocitos T o B que se retirarán de la muestra biológica. Las partículas con las células unidas a las mismas se dejan sedimentar de manera diferencial por gravedad y después la muestra restante (que comprende la muestra agotada de linfocitos T/B, por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) se retira para su uso posterior. Esto potencia el número de

células restantes de interés (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras) en la muestra que no se marcaron como diana por las partículas. Por consiguiente, se proporciona un alto rendimiento de las células de interés incluso después de múltiples etapas de retirada. Los anticuerpos unidos a las partículas también pueden dirigirse a las células de interés (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras que expresan, por ejemplo, CD34). Las células diana (por ejemplo, células hematopoyéticas inmaduras CD34+) pueden retirarse después de las partículas para su uso adicional.

De acuerdo con un aspecto, el material de partículas puede ser níquel. La partícula de níquel puede calentarse para esterilizar la partícula donde se desee. Si la muestra se ha purgado y va a trasplantarse a un humano, puede utilizarse un campo magnético y un procedimiento de lavado (como se describe en detalle anteriormente) para retirar células no deseadas adicionales (por ejemplo, glóbulos rojos) y para garantizar que todas las partículas densas se hayan retirado de la muestra biológica.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T (por ejemplo, que comprenden células CD34+) comprenden células de médula ósea agotadas de linfocitos T, células progenitoras de sangre periférica movilizadas agotadas de linfocitos T (por ejemplo, movilizadas por G-CSF), sangre del cordón umbilical/hígado fetal/saco vitelino agotada de linfocitos T y/o, células CD34+ purificadas (recolectadas de todas las fuentes mencionadas anteriormente, por ejemplo, de médula ósea y/o células progenitoras de sangre periférica movilizadas con G-CSF) y seleccionadas por selección positiva (por ejemplo, con perlas magnéticas usando un anticuerpo anti-CD34, por ejemplo, como se describió anteriormente usando MACS™). Además, los presentes métodos también contemplan células CD34+ purificadas expandidas *ex vivo* para aumentar el número de células.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el sujeto se administra con una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprende al menos aproximadamente, 4×10^6 , $4,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $5,5 \times 10^6$, 6×10^6 , $6,5 \times 10^6$, 7×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 8×10^6 , $8,5 \times 10^6$, 9×10^6 , $9,5 \times 10^6$, 10×10^6 , $12,5 \times 10^6$, 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 , 30×10^6 , 35×10^6 , 40×10^6 , 45×10^6 , 50×10^6 , 60×10^6 , 70×10^6 , 80×10^6 , 90×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal.

De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden al menos aproximadamente 10×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal.

De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal.

De acuerdo con un aspecto, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprende un intervalo de aproximadamente $4-30 \times 10^6$, $4-40 \times 10^6$, $4-50 \times 10^6$, $4-60 \times 10^6$, $4-70 \times 10^6$, $4-80 \times 10^6$, $4-90 \times 10^6$, $4-100 \times 10^6$, $5-10 \times 10^6$, $5-20 \times 10^6$, $5-30 \times 10^6$, $5-40 \times 10^6$, $5-50 \times 10^6$, $5-60 \times 10^6$, $5-70 \times 10^6$, $5-80 \times 10^6$, $5-90 \times 10^6$, $5-100 \times 10^6$, $10-20 \times 10^6$, $10-30 \times 10^6$, $10-40 \times 10^6$, $10-50 \times 10^6$, $10-60 \times 10^6$, $10-70 \times 10^6$, $10-80 \times 10^6$, $10-90 \times 10^6$, $10-100 \times 10^6$, $20-30 \times 10^6$, $20-40 \times 10^6$, $20-50 \times 10^6$, $20-60 \times 10^6$, $20-70 \times 10^6$, $20-80 \times 10^6$, $20-90 \times 10^6$, $20-100 \times 10^6$, $30-40 \times 10^6$, $30-50 \times 10^6$, $30-60 \times 10^6$, $30-70 \times 10^6$, $30-80 \times 10^6$, $30-90 \times 10^6$, $30-100 \times 10^6$, $40-50 \times 10^6$, $40-60 \times 10^6$, $40-70 \times 10^6$, $40-80 \times 10^6$, $40-90 \times 10^6$, $40-100 \times 10^6$, $50-60 \times 10^6$, $50-70 \times 10^6$, $50-80 \times 10^6$, $50-90 \times 10^6$, $50-100 \times 10^6$, $60-70 \times 10^6$, $60-80 \times 10^6$, $60-90 \times 10^6$, $60-100 \times 10^6$, $70-80 \times 10^6$, $70-90 \times 10^6$, $70-100 \times 10^6$, $80-90 \times 10^6$, $80-100 \times 10^6$ células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.

De acuerdo con un aspecto específico, al sujeto se le administra una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T que comprenden un intervalo de aproximadamente $5-40 \times 10^6$ células CD34+ por kilogramo de peso corporal.

Las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T de la presente divulgación pueden trasplantarse en un receptor usando cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tales como pero no limitado a, infusión celular (por ejemplo, I.V.), a través de una vía intraperitoneal o por vía intraósea.

Como se ha mencionado, el sujeto de la presente divulgación puede ser trasplantado además con un injerto de células o tejidos (por ejemplo, hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y/o tejidos linfoides/hematopoyéticos).

El trasplante de la célula o el tejido en el sujeto puede efectuarse de muchas maneras, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo de célula o tejido; el tipo, la fase o la gravedad de la enfermedad del receptor (por ejemplo, insuficiencia orgánica); los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto; y/o el resultado terapéutico deseado.

El trasplante de un injerto celular o tisular de la presente divulgación puede efectuarse trasplantando el injerto celular o tisular en cualquiera de las diversas ubicaciones anatómicas, dependiendo de la aplicación. La célula o el injerto de tejido pueden trasplantarse a una ubicación anatómica homotópica (una ubicación anatómica normal para el

trasplante), o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el trasplante). Dependiendo de la aplicación, la célula o el injerto de tejido puede implantarse ventajosamente debajo de la cápsula renal o en el riñón, la grasa testicular, el sub cutis, el epiplón, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad del corazón, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, la piel, el páncreas y/o el espacio intraabdominal.

Por ejemplo, un tejido hepático de acuerdo con las presentes enseñanzas puede trasplantarse en el hígado, la vena porta, la cápsula renal, el sub-cutis, el epiplón, el bazo y el espacio intra-abdominal. El trasplante de un hígado en diversas ubicaciones anatómicas como estas se practica comúnmente en la técnica para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante hepático (por ejemplo, insuficiencia hepática). De forma similar, el trasplante de un tejido pancreático de acuerdo con la presente divulgación puede efectuarse ventajosamente trasplantando el tejido en la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, el sub-cutis, el epiplón, un asa intestinal (la subserosa de un asa en U del intestino delgado) y/o el espacio intra-abdominal. El trasplante de tejido pancreático puede usarse para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante pancreático (por ejemplo, diabetes). Asimismo, el trasplante de tejidos tales como un tejido de riñón, de corazón, de pulmón o cutáneo puede llevarse a cabo en cualquier ubicación anatómica descrita anteriormente con el fin de tratar a receptores que padecen, por ejemplo, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, insuficiencia pulmonar o daño en la piel (por ejemplo, quemaduras).

Opcionalmente, cuando se trasplanta una célula o injerto de tejido de la presente divulgación en un sujeto que tiene un órgano defectuoso, puede ser ventajoso retirar primero al menos parcialmente el órgano fallido del sujeto para permitir el desarrollo óptimo del trasplante y la integración estructural/funcional del mismo con la anatomía/fisiología del sujeto.

El método de la presente descripción también prevé el co-trasplante de varios órganos (por ejemplo, corazón y pulmón, hígado y bazo, páncreas y médula ósea, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, riñón y médula ósea, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, etc.) en caso de que el sujeto pueda verse beneficiado por dicho procedimiento.

De acuerdo con un aspecto, el co-trasplante comprende el trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y un tejido/órgano sólido o varios órganos/tejidos sólidos.

De acuerdo con un aspecto, las células hematopoyéticas inmaduras y el órgano sólido se obtienen del mismo donante.

De acuerdo con un aspecto, la célula o el injerto de tejido (por ejemplo, órgano sólido) se trasplanta en el sujeto antes de, concomitantemente con o después del trasplante de las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T (por ejemplo, que comprenden células CD34+) en el sujeto.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Se apreciará que en situaciones en donde el injerto de célula o de tejido (por ejemplo, un órgano sólido) se trasplanta antes de que las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, es aconsejable usar agentes inmunosupresores generales (por ejemplo, ciclosporina A, como se describe en detalle adicional a

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

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

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

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

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

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

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

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

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

De acuerdo con un aspecto específico, el TLI comprende una dosis de irradiación dentro del intervalo de 0,5-1 Gy, 0,5-1,5 Gy, 0,5-2,5 Gy, 0,5-5 Gy, 0,5-7,5 Gy, 0,5-10 Gy, 0,5-15 Gy, 1-1,5 Gy, 1-2 Gy, 1-2,5 Gy, 1-3 Gy, 1-3,5 Gy, 1-4 Gy, 1-4,5 Gy, 1-1,5 Gy, 1-7,5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy, 10-15 Gy, 10-20 Gy, 10-30 Gy, 10-40 Gy, 10-50 Gy, 0,5-20 Gy, 0,5-30 Gy, 0,5-40 Gy o 0,5-50 Gy.

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

De acuerdo con un aspecto, el tratamiento con TLI se administra al sujeto 1-10 días (por ejemplo, 1-3 días) antes del trasplante. De acuerdo con un aspecto, el sujeto se acondiciona una vez con TLI 2-7 días antes del trasplante.

De acuerdo con un aspecto, El acondicionamiento comprende un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, Busulfán, Myleran, Busulfex, Fludarabina, Melfalán y Tiotepa y ciclofosfamida. Los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse al sujeto en una dosis única o en varias dosis, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante. De acuerdo con un aspecto, al sujeto se le administra un agente quimioterapéutico (por ejemplo, Fludarabina, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 30 mg/m²/día) durante 5 días consecutivos antes del trasplante (por ejemplo, en los días -7 a -3).

De acuerdo con un aspecto, el acondicionamiento comprende una inmunoterapia con anticuerpos. Los anticuerpos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab vendido bajo las

marcas de, por ejemplo, Campath, Mab-Campath, Campath-1H y Lemtrada) y un agente anti-timocito globulina (ATG) [por ejemplo, Timoglobulina (ATG de conejo, rATG, disponible de Genzyme) y Atgam (ATG equino, eATG, disponible de Pfizer)]. La inmunoterapia de anticuerpos adicional puede comprender agentes anti-CD3 (OKT3), anti-CD4 o anti-CD8. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo se administra al sujeto en una dosis única o en varias dosis, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante (por ejemplo, 6 días antes de trasplante).

De acuerdo con un aspecto, el sujeto no se trata crónicamente (por ejemplo, durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, durante más de 10 días) con profilaxis de GVHD después del trasplante.

De acuerdo con un aspecto, en caso de recaída después del trasplante de células madre hematopoyéticas, el sujeto puede recibir tratamiento adicional mediante infusiones de linfocitos de donantes (DLI). Por ejemplo, el sujeto puede administrarse con dosis graduadas de linfocitos T como se describió previamente por Dazzi et al [Dazzi, Szydlo et al., Blood, (2000) 96: 2712-6].

De acuerdo con un aspecto, el sujeto puede tratarse con una infusión de aproximadamente $0,5 - 5 \times 10^4$ linfocitos CD3+ por kg de peso corporal del receptor (por ejemplo, 1×10^4 linfocitos CD3+, por ejemplo, linfocitos CD3+ no manipulados, por kg de peso corporal del receptor) para el tratamiento de la recaída después del trasplante haploidéntico agotado de linfocitos T.

De acuerdo con un aspecto, un paciente con recaída molecular y/o hematológica temprana se tratará además con una primera dosis de aproximadamente 1×10^4 células CD3+ por kg de peso corporal del receptor. En ausencia de EICH, la segunda infusión de aproximadamente 1×10^5 células CD3+ por kg de peso corporal del receptor generalmente se administrará aproximadamente 45 días después, seguido 2 meses después por una tercera dosis de aproximadamente 1×10^6 células CD3+ por kg de peso corporal del receptor. Se apreciará que los donantes típicamente se someten a una leucaféresis para recolectar linfocitos antes de la movilización de células hematopoyéticas (por ejemplo, para trasplante). Los productos congelados se descongelan según sea necesario y se infusionan rápidamente durante un período de 5-10 minutos. Los pacientes que presentan EICH aguda o que no demuestran el injerto hematológico generalmente no recibirán ningún DLI.

De acuerdo con un aspecto, un paciente con linfoma no Hodgkin de linfocitos B de recaída generalmente se tratará con rituximab (por ejemplo, 375 mg/m^2 semanalmente durante aproximadamente 4 semanas) con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab.

De acuerdo con un aspecto, un paciente con mieloma múltiple de recaída recibirá tratamiento adicional con bortezomib (por ejemplo, $1,3 \text{ mg/m}^2$ en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.

De acuerdo con un aspecto, no se usarán agentes inmunosupresores posteriores a DLI junto con los presentes métodos.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, comprendiendo el método: (a) trasplantar en un sujeto acondicionado una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 5×10^5 células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras, comprendiendo el método: (a) acondicionar a un sujeto bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, en donde el acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterapéutico; (b) trasplantar en el sujeto una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 5×10^5 células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (c) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para inducir tolerancia específica del donante en un sujeto que necesita un injerto de células o tejido no singénico, comprendiendo el método: (a) trasplantar a un sujeto una dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T obtenidas de un donante no singénico, en donde las células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprenden menos de 5×10^5 células CD3+ por kilogramo de peso corporal del sujeto y en donde la dosis comprende al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto; y posteriormente (b) administrar

al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal, tratando de esta manera al sujeto.

Como se usa en el presente documento, la frase "tolerancia específica del donante", como se usa en el presente documento se refiere a una afección en donde hay una disminución de la capacidad de respuesta de las células del receptor (por ejemplo, linfocitos T del receptor) cuando entran en contacto con las células del donante (por ejemplo, células hematopoyéticas del donante) en comparación con el capacidad de respuesta de las células del receptor en ausencia de dicho método de tratamiento.

La inducción de tolerancia permite el trasplante de una célula o injerto de tejido (como se describe en detalle adicional anteriormente) con un riesgo reducido de rechazo del injerto o EICH.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir infusiones de linfocitos de donantes (DLI).

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, DLI puede comprender 1×10^3 - 1×10^6 linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor.

De acuerdo con un aspecto, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir una dosis única o varias dosis (dos, tres, cuatro, cinco o más dosis) de DLI.

Por lo tanto, por ejemplo, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir una primera dosis de 1×10^4 linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor. En ausencia de enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), puede administrarse una segunda infusión de 1×10^5 linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor, por ejemplo, 45 días después, seguido, por ejemplo, 2 meses después de una tercera dosis de 1×10^6 linfocitos T CD3+/kg de peso corporal del receptor.

De acuerdo con un aspecto, los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana pueden recibir irradiación corporal total (TBI), irradiación linfode total (TLI), un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.

Por lo tanto, por ejemplo, los pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B recidivantes pueden recibir rituximab (por ejemplo, a una dosis de 375 mg/m² semanalmente) durante aproximadamente 4 semanas con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab.

Por lo tanto, por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple de recaída podrán tratarse con bortezomib (por ejemplo, a una dosis de 1,3 mg/m² en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm$ el 10 %.

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugaciones significan "que incluye pero no se limita a".

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

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

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

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

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

segundo, y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

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

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

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

Ejemplos

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

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en las Patentes de EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8a Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos de los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

EJEMPLO 1

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

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales

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

Protocolo de trasplante

Las células BM Balb/c-Nude de dosis baja (5×10^6) y alta (25×10^6) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T) se trasplantaron en receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de

linfocitos T (TCD) *in-vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. La dosis alta de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administró en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 35 y 95 días después del trasplante usando anticuerpos anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D^d etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K^k marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

Protocolo de injerto de piel

Los injertos de piel del donante (Balb/c) y de terceros (C57BL/6) se trasplantaron a los receptores quiméricos mixtos como se describe anteriormente [es decir, a aquellos ratones que se trasplantaron previamente con mega dosis (25 x 10⁶) de BM agotada de linfocitos T y se trataron con dosis alta de CY] y a los ratones receptores que se inocularon con una dosis regular de células BM (5 x 10⁶) agotadas de linfocitos T y se trataron con alta dosis de CY.

RESULTADOS

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

Los ratones receptores (C3H/Hen) se trataron con un protocolo de acondicionamiento antes del trasplante de un trasplante de médula ósea con linfocitos T agotados. Específicamente, los ratones se trataron *in vivo* con reducción en volumen de linfocitos T (TCD) usando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. A continuación, células BM Balb/c-Nude de dosis baja (5 x 10⁶) y alta (25 x 10⁶) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T, ya que los ratones desnudos tienen números minúsculos de linfocitos T maduros) se trasplantaron a receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0. Se administraron altas dosis de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) en los días +3 y +4 después del trasplante. La evaluación del injerto de células de médula ósea se evaluó por quimerismo de tipo de donante a los 35 y 95 días después del trasplante.

Como se muestra en las Figuras 1A-B y las Figuras 2A-B, el análisis de quimerismo en el día 35 y el día 95 reveló que ninguno de los ratones control (acondicionados con TCD, 2 Gy TBI y opcionalmente CY, pero no recibieron BM) expresó quimerismo de tipo donante. De forma similar, ninguno de los receptores de ratones BM que fueron trasplantados con una dosis regular de 5 x 10⁶ BM agotadas de linfocitos T, en presencia o ausencia de tratamiento con ciclofosfamida, expresó quimerismo de tipo donante. Sin embargo, cuando la dosis de BM agotada de linfocitos T se aumentó a 25 x 10⁶ células, se logró un quimerismo de mezcla duradero en 4 de 7 ratones que también fueron tratados con ciclofosfamida en los días +3 y +4 después del trasplante (véanse las Figuras 1A-B y la Figura 2C).

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

La inducción de tolerancia se midió por trasplante de injertos de piel de donante (Balb/c) y de terceros (C57BL/6) a los receptores quiméricos mixtos que se trasplantaron con mega dosis (25 x 10⁶) de BM con agotamiento de linfocitos T y fueron tratados con dosis altas de CY (como se describió anteriormente), en comparación con los receptores que fueron inoculados con una dosis regular (5 x 10⁶) de células BM agotadas de linfocitos T (como se describió anteriormente).

Como se muestra en las Figuras 4A-B, tres de los 4 ratones quiméricos que fueron trasplantados con 25 x 10⁶ BM agotadas de linfocitos T aceptaron el injerto de donante y rechazaron los injertos de piel de terceros. Por el contrario, los ratones receptores que fueron inoculados con 5 x 10⁶ células BM agotadas de linfocitos T y CY rechazaron tanto los injertos de piel del donante como de terceros (Figura 4A).

Estos resultados ilustran que la combinación de mega dosis de células BM agotadas de linfocitos T y tratamiento de dosis altas de ciclofosfamida permite el injerto exitoso de células madre hematopoyéticas, bajo acondicionamiento de intensidad reducida, junto con la inducción de tolerancia.

Alentados por estos resultados, se inició un conjunto de experimentos de calibración para determinar la irradiación óptima y la dosis de ciclofosfamida para mejorar la inducción del quimerismo mediante este enfoque.

EJEMPLO 2

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

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales

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

Protocolo de trasplante

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

RESULTADOS

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

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

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

EJEMPLO 3

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

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

40 *Animales*

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

45 *Protocolo de trasplante*

50 Las células BM Balb/c-Nude de dosis alta (25×10^6) (que proporcionan una fuente de BM agotadas de linfocitos T) se trasplantaron en receptores alogénicos (C3H/Hen) el día 0 después de la reducción en volumen de linfocitos T (TCD) *in-vivo* con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 53.6.72) (300 µg cada uno; Bio X Cell, NH, EE.UU.) administrados en el día -6, y por exposición a 2,0 Gy de irradiación corporal total (LCT) en el día -1. Diferentes dosis de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg, 125 mg/kg o 150 mg/kg, Baxter Oncology, Alemania) se administraron en los días +3 y +4 después del trasplante y se evaluó el quimerismo de tipo donante 30 días después del trasplante usando anticuerpos anti-hospedador y H-2 de fluoresceína (por ejemplo, anticuerpo anti-H-2D^d etiquetado con F1TC específico para células de tipo donante y anticuerpo anti-H-2K^k marcado con PE específico para células de tipo hospedador).

RESULTADOS

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

65 Como puede verse en la Figura 6, el aumento de la dosis de CY a 125 mg/kg o 150 mg/kg no proporcionó una mejora significativa del quimerismo. Por lo tanto, los ratones receptores que se trataron con 100 mg/kg, 125 mg/kg o

150 mg/kg de CY exhibieron un promedio de $57,5 \pm 25,8$, $66,5 \pm 20,6$ o $67,4 \pm 27,4$ de quimerismo de tipo donante, respectivamente. No se encontró significancia estadística cuando los receptores tratados con 100 mg/kg se compararon con los tratados con 125 mg/kg o 150 mg/kg ($P = 0,5$ y $p = 0,469$ respectivamente).

5 EJEMPLO 4

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

10 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales

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

15 *Protocolo de trasplante*

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

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

RESULTADOS

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

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

45 EJEMPLO 5

Protocolo clínico

50 DISEÑO DEL ESTUDIO

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

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

Duración del estudio

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

Definiciones

65 El injerto sostenido estable se define como neutrófilos, más de 1000/µl por tres días consecutivos, y plaquetas, más

de 20000/ μ l por tres días consecutivos, sin transfusión.

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

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

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

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

Tabla 1A: Estadificación clínica de la EICH aguda

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

Tabla 1B: Clasificación clínica de la EICH aguda

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

Consideraciones estadísticas

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

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

Criterios de inclusión - Paciente

- Edad: más o igual a 18 años y menos o igual a 70 años
- Pacientes con CLL con refractariedad a fludarabina u otra quimioterapia debida a la pérdida de p53 por delección de 17p y/o mutación de TP53
- Linfoma folicular con citogenética desfavorable tales como cariotipo complejo, del17p, del 6q23-26, mutaciones en TP53, menos 1p
- Relapso de linfoma de Hodgkin después de un trasplante autólogo, no elegible para inmunoterapia con anti-CD30
- Mieloma múltiple con recaída después del trasplante autólogo, con citogenética desfavorable en remisión parcial o completa
- Anemia aplásica severa recurrente después de la inmunoterapia
- Ausencia de un donante familiar con HLA totalmente compatible o un locus HLA no compatible
- Ausencia de donante no relacionado emparejado o inelegibilidad para la búsqueda de donantes en el registro de donantes (IBMDR)
- Presencia de donante familiar haploide y respaldo de células madre autólogas del paciente
- Condiciones clínicas estables y esperanza de vida de más de 12 semanas
- Karnofsky - más del 70 %
- Consentimiento informado por escrito

Evaluación previa al tratamiento

- historia clínica completa y examen y determinación del estado funcional y el área de superficie corporal.
- hemograma completo
- grupo sanguíneo, subgrupos de glóbulos rojos, titulación de aglutinina anti-A y/o anti-B
- aclaramiento de creatinina, ácido úrico, ferritina, LDH, beta 2 microglobulina, electroforesis de proteínas, SGOT, SGPT, análisis de orina, glucosa en sangre, nitrógeno en sangre, niveles de inmunoglobulina, Pruebas de Coombs.
- prueba de embarazo

- VIH-ab, HBsAg, HBVDNA, HCV-ab, HCVRNA, CMV-ab, Toxoplasma-ab, HSVab
- ECG y medición de la fracción de eyección por ultrasonido o prueba gammagráfica.
- radiografía de pecho.
- tomografía computarizada del pulmón, tomografía computarizada del cerebro, TC de seno maxilar.
- 5 - Radiografía dental y examen.
- biopsia y aspirado de médula ósea para análisis morfológicos y citogenéticos, buscar un marcador molecular (si no se conoce) y un análisis FACS (según la enfermedad subyacente).
- examen neurológico y punción lumbar en pacientes en riesgo.
- exploración radiológica (CT, RMN) de la localización conocida de la enfermedad.
- 10 - tipificación serológica y molecular completa de HLA, cultivos ML y prueba de citotoxicidad con los donantes seleccionados.
- anticuerpos citotóxicos anti HLA.
- Ecografía abdominal

15 Criterios de exclusión - Paciente

- Historia de localización de la enfermedad del sistema nervioso central
- Positividad para el VIH, VHC, HCVRNA, HBsAg, HBVDNA
- Neumonía activa y documentada de cualquier tipo, infección fúngica del tejido, cultivos víricos positivos de secreción respiratoria o sangre
- 20 - bilirrubina de más de 2 veces lo normal
- aclaramiento de creatinina en sangre inferior a 50 ml/min
- DLCO menos del 50 % del valor predicho
- fracción de eyección inferior al 45 % (o accidente cerebrovascular miocárdico en el último año)
- 25 - embarazo o lactancia
- trastornos psiquiátricos

Criterios de elegibilidad - Donante

- 30 - Ausencia de enfermedad hematopoyética o relacionada con la función medular que interfiere con la recolección de un número suficiente de células progenitoras normales.
- Ausencia de cualquier afección médica que represente un riesgo grave para la salud al someterse a la extracción de células madre de sangre periférica
- Pruebas de VIH, HTLV-1 negativas
- 35 - Cualquier miembro de la familia sano será considerado para la donación de células madre hematopoyéticas. La selección de un donante se basará en la tipificación de los loci HLA-A, B, C, DR que se llevará a cabo en el receptor, hermanos, padres y posiblemente otros miembros de la familia como tíos, tías y primos. Un posible donante relacionado debe ser al menos genotípicamente haploidentico HLA-A, B, C, DR para el paciente, pero puede diferir en 2-3 alelos HLA en el haplotipo no compartido.
- 40 - El donante se seleccionará preferentemente sobre la base de la aloreactividad NK donante frente a receptor.

Evaluación de donantes

- 45 - Historia completa, examen físico y examen de venas físicas por el servicio de fésis para determinar la idoneidad para la fésis a través de venas periféricas.
- Análisis de sangre: WBC, PLT, Hb, PT, PTT, proteína total, albúmina, electrolitos, glucosa, SGOT/SGPT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, LDH, ácido úrico, creatinina.
- CMV, EBV, HSV, VZV, Hepatitis B + C, VIH, serología de Toxoplasma.
- Completar la tipificación de glóbulos rojos
- 50 - Serología para Sífilis, CMV, EBV, HSV, VZV, Hepatitis B + C, HTLV-1, VIH, Toxoplasmosis.
- Las pruebas de enfermedades transmitidas por transfusión deben realizarse entre 30 y 7 días antes de la recolección de células madre
- Radiografía de pecho
- EKG
- 55 - Análisis VNTR por PCR
- Los donantes serán priorizados en función de la edad más joven, mejor salud y ser CMV negativo para receptores CMV negativos.

Criterios de exclusión - Donante

- 60 - Una prueba de VIH o HTLV-1 positiva o evidencia de infección de hepatitis vírica activa/persistente excluirá al donante de participar en este estudio.
- Presencia de cualquier afección médica que represente un riesgo grave para la salud al someterse a la extracción de células madre de sangre periférica (es decir, diabetes insulino-dependiente, trastornos cardiovasculares, enfermedades inflamatorias crónicas).
- 65

PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO

Movilización de donantes HSC y procesamiento de injertos.

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

La aféresis se realizará a través de las venas antecubitales.

Tabla 2: Régimen de acondicionamiento

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

- 25 Como se describe en la Tabla 2, anterior, la fludarabina se administrará por vía intravenosa diariamente durante 5 días secuenciales, -7, -6, -5, -4 y -3, a una dosis de 30 mg/m². Cada dosis se infundirá durante 30 minutos. Se dará TBI 200 cGy el día -1 en una sola fracción.

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

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

Ordenes especiales de gestión

- 35 a. se colocará una línea venosa central de doble luz antes del régimen de acondicionamiento;
- b. para la profilaxis de urato se administrará alopurinol 300 mg por os;
- 40 c. la terapia antiemética se administrará de acuerdo con las pautas de un solo centro;
- d. transfusión de productos sanguíneos filtrados e irradiados. Mantener el nivel de hemoglobina más de 8 g/l y las plaquetas más de 15000/ μl en ausencia de fiebre o signos de sangrado;
- 45 Monitorización del paciente durante el tratamiento
- a. recuento sanguíneo completo diario y diferencial
- b. creatinina en suero, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, bilirrubina diarios durante la quimioterapia y la hiper-hidratación
- 50 c. pruebas de función hepática, albúmina, pruebas de coagulación con antitrombina III, antigenemia por citomegalovirus y PCR dos veces por semana.

d. cultivos de vigilancia de acuerdo con las pautas del centro

EVALUACIÓN DE TOXICIDAD

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

Tabla 3: Criterios de toxicidad de la OMS

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Hematológico					
Hemoglobina	≥ 11,0 g/dl ≥ 6,8 mmol/l	9,5- 10,9 g/dl 5,6- 6,7 mmol/l	8,0-9,4 g/dl 4,9-5,6 mmol/l	6,5-7,9 g/dl 4,0-4,9 mmol/l	< 6,5 g/dl < 4,0 mmol/l
Leucocitos (1000/mm)	≥ 4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	< 1,0
Granulocitos (1000/mm)	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	< 0,5
Plaquetas (1000/mm)	≥ 100	75-99	50-74	25-49	<25
Hemorragia	Ninguno	Petequias	Pérdida de sangre leve	Pérdida de sangre	Pérdida de sangre debilitante
Gastrointestinal					
Bilirrubina	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Transaminasas (SGOT SGPT)	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Fosfatasa alcalina	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5,1-10 x N*	> 10 x N*
Oral	Sin cambio	Dolor/eritema	Eritema, úlceras: puede comer sólidos	Úlceras: requiere solo dieta líquida	La alimentación no es posible
Náuseas/vómitos	Ninguno	Náuseas	Vómitos transitorios	Vómitos que requieren terapia	Vómitos intratables
Diarrea	Ninguno	Transitoria < 2 días	Tolerable, pero > 2 días	Intolerable, que requiere terapia	Hemorrágica, deshidratación
Renal					
Urea o creatinina en sangre	≤ 1,25 x N*	1,26-2,5 x N*	2,6-5 x N*	5-10 x N*	> 10 x N*
Proteinuria	Sin cambio	1 + < 0,3 g % < 3 g/l	2- 3 + 0,3-1,0 g % 3- 10 g/l	4 + > 1,0 g % > 10 g/l	Síndrome nefrótico
Hematuria	Sin cambio	Microscópico	Craso	Craso + coágulos	Uropatía obstructiva
Pulmonar	Sin cambio	Síntomas leves	Disnea de esfuerzo	Disnea en reposo	Se requiere reposo en cama completo
Fiebre con fármacos	Ninguno	Fiebre < 38 °C	Fiebre 38-40 °C	Fiebre > 40 °C	Fiebre con hipotensión
Alérgico	Sin cambio	Edema	Broncoespasmo: no se necesita terapia parenteral	Broncoespasmo: se requiere terapia parenteral	Anafilaxia
Cutáneo	Sin cambio	Eritema	Descamación seca, vesiculación, prurito	La mayoría descamación, ulceración	Dermatitis exfoliativa: necrosis que requiere intervención quirúrgica
Cabello	Sin cambio	Pérdida de cabello mínima	Moderada, alopecia irregular	Alopecia completa pero reversible	Alopecia no reversible
Infección (especificar sitio)	Ninguno	Infección menor	Infección moderada	Infección mayor	Infección mayor con hipotensión

(continuación)

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Cardíaco					
Ritmo	Sin cambio	Taquicardia sinusal, > 110 en reposo	PVC unifocal, arritmia auricular	PVC multifocal	Taquicardia ventricular
Función	Sin cambio	Asintomático, pero signo cardíaco anormal	Disfunción sintomática transitoria: no se requiere terapia	Disfunción sintomática sensible a terapia	Disfunción sintomática que no responde a terapia
Pericarditis	Sin cambio	Derrame asintomático	Sintomático: no se requiere grifo	Taponamiento: grifo requerido	Taponamiento: cirugía requerida
Neurotoxicidad					
Estado de consciencia	Alerta	Terapia transitoria	Somnolencia < 50 % de las horas de vigilia	Somnolencia > 50 % de las horas de vigilia	Coma
Periférico	Ninguno	Parestesias y/o disminución de los reflejos tendinosos	Parestesias severas y/o debilidad leve	Parestesias intolerables y/o pérdida motora marcada	Parálisis
Estreñimiento **	Ninguno	Leve	Moderado	Distensión abdominal	Distensión y vómitos
Dolor	Ninguno	Leve	Moderado	Grave	Intratable
N* Límite superior del valor normal de la población en estudio. ** Esto no incluye el estreñimiento resultante de narcóticos + Solo se considera el dolor relacionado con el tratamiento, dolor no relacionado con la enfermedad. El uso de narcóticos puede ser útil para clasificar el dolor según la tolerancia del paciente.					

CUIDADOS DE APOYO

5 Monitorización y tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas

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

15 Profilaxis, monitorización y tratamiento de infecciones por citomegalovirus

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

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

25 Evaluación de laboratorio posterior al trasplante:

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

linfocitos circulantes, evaluación de la función de células citolíticas activada por el linfocito citolítico natural y la linfocina, respuestas de transformación de linfocitos a mitógenos de linfocitos T y linfocitos B y niveles de inmunoglobulina.

5 Seguimiento

Hasta el día +90 recuentos sanguíneos completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, función hepática y renal completa se evaluarán dos veces por semana.

10 Cada dos semanas hasta +90 el fenotipo de sangre periférica (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, HLADR), radiografía de pecho.

Cada dos semanas desde +90 hasta +180:

hemogramas completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, Función hepática y renal completa.

15 Mensualmente:

niveles de inmunoglobulina, electroforesis de proteínas,

20 después de +90 fenotipo de sangre periférica (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, HLADR), radiografía de pecho.

después de +180 hemogramas completos, antigenemia y PCR para CMV, proteína C reactiva, Función hepática y renal completa.

25 La restauración completa de la enfermedad se realizará 2, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 meses después del trasplante, después anualmente, esto incluirá la evaluación del quimerismo del donante mediante análisis de PCR de HLA en células de sangre periférica y médula ósea.

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

30 Tabla 4: Escala de rendimiento de Karnofsky

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

INFUSIONES PROGRAMADAS DE LINFOCITOS DE DONANTE

35 Las infusiones de linfocitos de donantes (DLI) son eficaces para tratar las recaídas después de un TCMH alogénico. No obstante, el éxito DLI se ha visto limitado en cierta medida por la morbilidad y la mortalidad asociadas a la EICH. Las dosis graduadas de linfocitos T tienen menos probabilidades de producir EICH que una sola infusión grande y parecen ser tan eficaces para inducir la remisión [Dazzi, Szydlo *et al.*, Blood, (2000) 96: 2712-6]. Un estudio reciente de búsqueda de dosis ha demostrado que 1×10^4 linfocitos CD3+ no manipulados/kg de peso corporal del receptor pueden infundirse de forma segura en pacientes que han recibido un trasplante haploideéntico agotado de linfocitos T [Lewalle P. *et al.* Bone Marrow Transplant (2002) 29 (supl 2): S26, 0164a].

40 Los pacientes con recaída molecular y/o hematológica temprana recibirán una primera dosis de 1×10^4 células CD3+/kg de p.c. del receptor; en ausencia de EICH, la segunda infusión de 1×10^5 células Cd3+/kg se dará 45 días después, seguidas 2 meses después por una tercera dosis de 1×10^6 CD3+ célula/kg. Los donantes se someterán a

una leucaféresis para recolectar linfocitos antes de la movilización de las células hematopoyéticas porque se ha demostrado que G-CSF tiene un efecto inmunomodulador en algunos subconjuntos de linfocitos T, disminuyendo su capacidad de respuesta a estímulos alogénicos. Los productos congelados se descongelarán e infundirán rápidamente durante un período de 5-10 minutos. Los pacientes con EICH aguda o que no demuestran el injerto hematológico no recibirán ningún DLI.

Los pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B recidivantes recibirán rituximab 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas con DLI concomitante con la segunda dosis de rituximab. Los pacientes con mieloma múltiple de recaída recibirán tratamiento con bortezomib (1,3 mg/m² en los días 1, 4, 8 y 11) antes de comenzar DLI.

No se usarán agentes inmunosupresores posteriores a DLI.

REIVINDICACIONES

1. Una dosis de células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados comprenden menos de 5×10^5 células CD3+ por kilogramo de peso corporal de un sujeto y en donde dicha dosis comprende al menos aproximadamente 5×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal de dicho sujeto, y en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras de linfocitos T agotados se obtienen separando dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras, mediante un método seleccionado del grupo que consiste en:
- (I) un método que comprende:
- (i) añadir un anticuerpo a las células hematopoyéticas inmaduras que se une específicamente a un marcador de superficie, en donde dicho marcador de superficie comprende un marcador de superficie de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD8 y TCR α/β o un marcador de superficie celular hematopoyético inmaduro seleccionado del grupo que consiste en CD34, CD33 y CD131, en donde dicho anticuerpo está marcado con un agente magnéticamente sensible;
- (ii) inmovilizar dichas células hematopoyéticas inmaduras unidas específicamente a dicho anticuerpo marcado con dicho agente magnéticamente sensible en una matriz a través de un campo magnético;
- (iii) lavar dicha matriz para retirar las células no unidas; y
- (iv) eliminar dicho campo magnético para eluir las células unidas de dicha matriz; y
- (II) basado en una expresión de al menos un marcador de superficie de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD8 y TCR α/β ; y una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclofosfamida, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz comprende 25-200 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que necesita un injerto de células o tejidos no singénicos y en donde dicha ciclofosfamida se administra al sujeto después del trasplante de dicho injerto de células o tejidos y además en donde dicho sujeto no se trata con profilaxis de EICH durante más de 10 días después del trasplante.
2. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto condicionado y opcionalmente en donde el condicionamiento de dicho sujeto condicionado:
- (I) está bajo protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, y opcionalmente en donde dicho protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida comprende un protocolo de acondicionamiento no mieloablativo, y opcionalmente en donde dicho protocolo de acondicionamiento no mieloablativo comprende al menos uno de una irradiación corporal total (TBI), una irradiación linfóide total (TLI), un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos, y opcionalmente en donde:
- (i) dicho TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo seleccionado del grupo que consiste en 1-7,5 Gy y 1-3,5 Gy; o
- (ii) dicho agente quimioterapéutico comprende al menos uno de Busulfán, Fludarabina, Melfalán y Tiotepa; o
- (iii) dicho anticuerpo comprende al menos uno de un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo antitimocito globulina (ATG) y un anticuerpo anti-CD3 (OKT3);
- o
- (II) Reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* y opcionalmente en donde dicha reducción en volumen de linfocitos T *in vivo* se efectúa mediante anticuerpos.
3. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una dosis de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T comprende $5 - 40 \times 10^6$ células CD34+ por kilogramo de peso corporal del sujeto.
4. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T:
- (i) comprende menos de 1×10^6 células CD8+ TCR α/β por kilogramo de peso corporal del sujeto; o
- (ii) se obtienen por MACS™.
5. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cuando dicho marcador de superficie:
- es un marcador de superficie de linfocitos T, dichas células no unidas comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T; o
- es un marcador de la superficie celular hematopoyética inmadura, dichas células unidas comprenden células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T.

6. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

- (i) dicha matriz es una matriz ferromagnética o comprende esferas de material magnéticamente susceptible o ferromagnético; o
- (ii) dicho agente magnéticamente sensible comprende una partícula superparamagnética, y opcionalmente en donde dicha partícula superparamagnética se conjuga con dicho anticuerpo en combinación con una perla específica anti-inmunoglobulina, avidina y/o anti-hapteno.

7. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen de un donante no singénico.

8. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha concentración de dicha ciclofosfamida es de aproximadamente 100 - 200 o aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal.

9. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha ciclofosfamida se formula en una dosis única o en dos dosis, y opcionalmente en donde cada una de dichas dos dosis comprende una concentración de aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal.

10. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto:

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

11. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho injerto de células o tejidos:

- (i) se selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas inmaduras, un órgano o tejido de hígado, de páncreas, de bazo, de riñón, de corazón, de pulmón, de piel, de intestino y linfóide/hematopoyético; o
- (ii) comprende un co-trasplante de varios órganos.

12. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho injerto de células o tejidos y dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T se obtienen del mismo donante.

13. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un sujeto acondicionado que necesita un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y opcionalmente en donde el acondicionamiento de dicho sujeto acondicionado está bajo un protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida, y opcionalmente en donde dicho protocolo de acondicionamiento de intensidad reducida comprende una irradiación corporal total (TBI) y un agente quimioterapéutico.

14. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para inducir tolerancia específica del donante en dicho sujeto que necesita dicho injerto de células o tejidos no singénicos.

15. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

- (i) dicha separación se efectúa usando un anticuerpo y opcionalmente en donde dicho anticuerpo está acoplado a un tinte fluorescente, un hapteno o una partícula magnética; o
- (ii) dicha separación se realiza usando citometría de flujo o clasificación de células magnéticas, y opcionalmente en donde dicha clasificación de células magnéticas comprende MACS™; o
- (iii) dicha separación de dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras se efectúa usando una separación magnética de alto gradiente (HGMS) o usando una columna de separación; o
- (iv) dicha separación de dichos linfocitos T de dichas células hematopoyéticas inmaduras basada en dicho producto secretado por dichos linfocitos T comprende separar los linfocitos T marcados con un producto de secreción, en donde dichos linfocitos T se han acoplado a un resto de captura que se une específicamente a un

producto secretado por dichos linfocitos T y en donde dichos linfocitos T se han cultivado en condiciones en donde el producto se secreta y se une a dicho resto de captura, produciendo de esta manera linfocitos T marcados con dicho producto de secreción, en donde dichos linfocitos T no se lisan mediante dicho método y en donde dicho producto de secreción se marca con un resto marcador; o

(v) que comprende además separar los linfocitos B de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T mediante el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie de linfocitos B; o

(vi) que comprende además separar los linfocitos B de dichas células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T basado en un producto secretado por dichos linfocitos B que comprende separar los linfocitos B marcados con un producto de secreción, en donde dichos linfocitos B se han acoplado a un resto de captura que se une específicamente a un producto secretado por dichos linfocitos B y en donde dichos linfocitos B se han cultivado en condiciones en donde el producto se secreta y se une a dicho resto de captura, produciendo de esta manera linfocitos B marcados con dicho producto de secreción, en donde dichos linfocitos B no se lisan mediante dicho método y en donde dicho producto de secreción se marca con un resto marcador.

16. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde:

(i) dicho producto de secreción se selecciona del grupo que consiste en IFN- γ , IL1, IL2, IL4, IL10, IL12, TGF- β , TNF, GM-CSF y SCF; o

(ii) dicho resto de captura está acoplado a dichos linfocitos T o linfocitos B a través de un resto de anclaje o en donde dicho resto de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o

(iii) dicho resto marcador es un anticuerpo específico para el producto de secreción o está fluorocromado, es magnetizable o comprende partículas magnéticas.

17. La dosis de células hematopoyéticas inmaduras agotadas de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha ciclofosfamida se administra al sujeto en dos dosis 3 y 4 días después del trasplante.

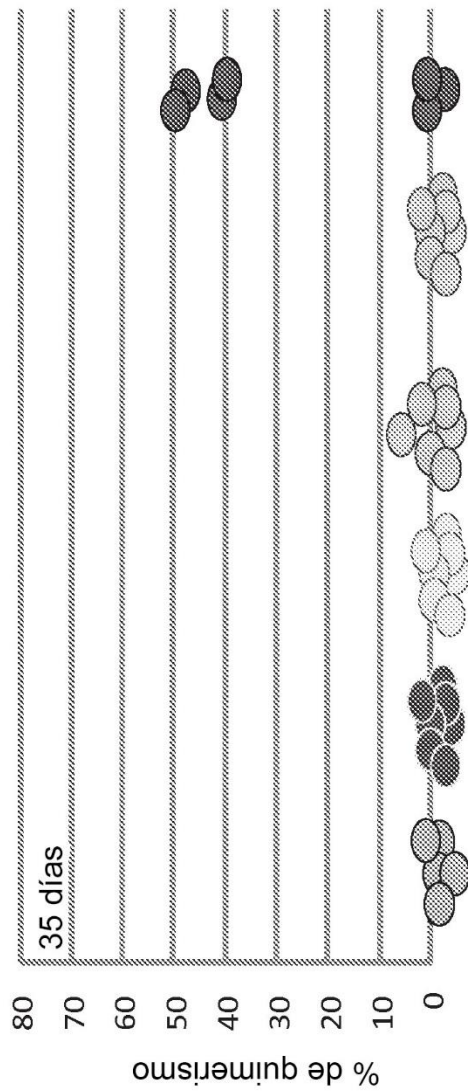


FIG. 1A

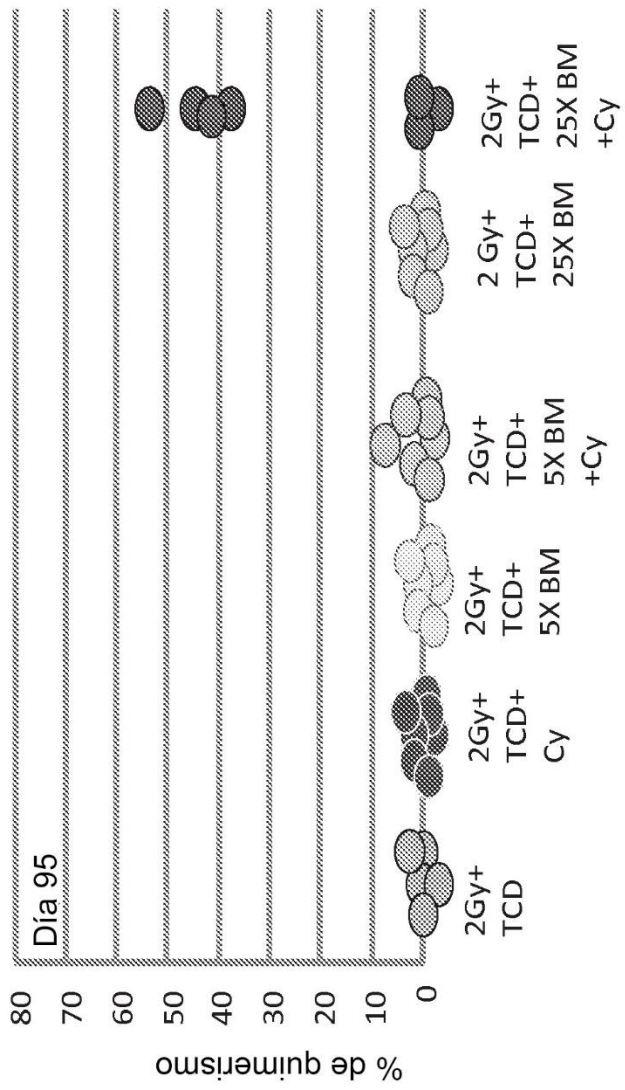


FIG. 1B

FIG. 2A

2 GY +TCD
+Ciclofosfamida

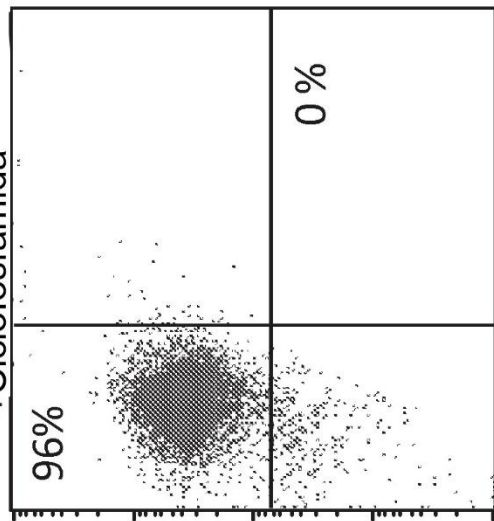


FIG. 2B

2 GY +TCD + 5x10⁶ BM
Ciclofosfamida

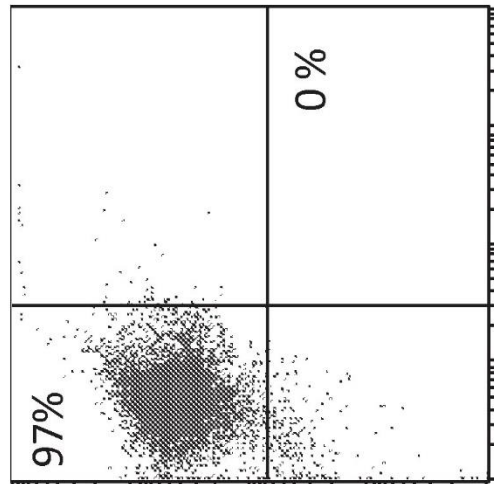


FIG. 2C

2 GY +TCD + 25x10⁶ BM
Ciclofosfamida

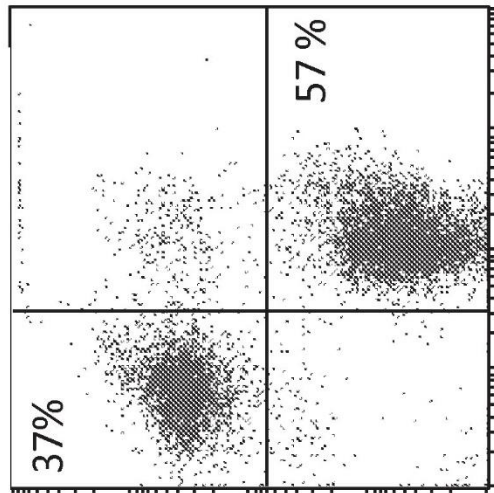


FIG. 4A

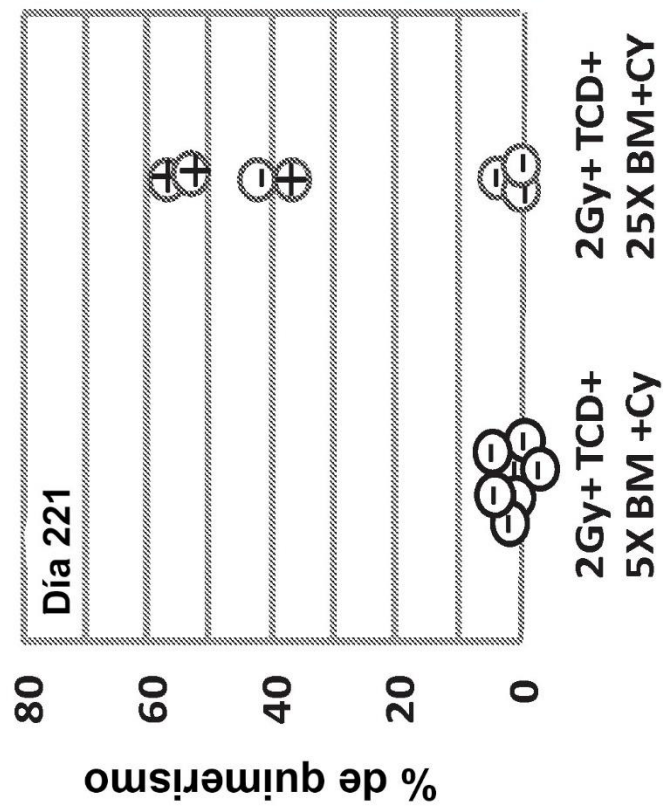


FIG. 4B

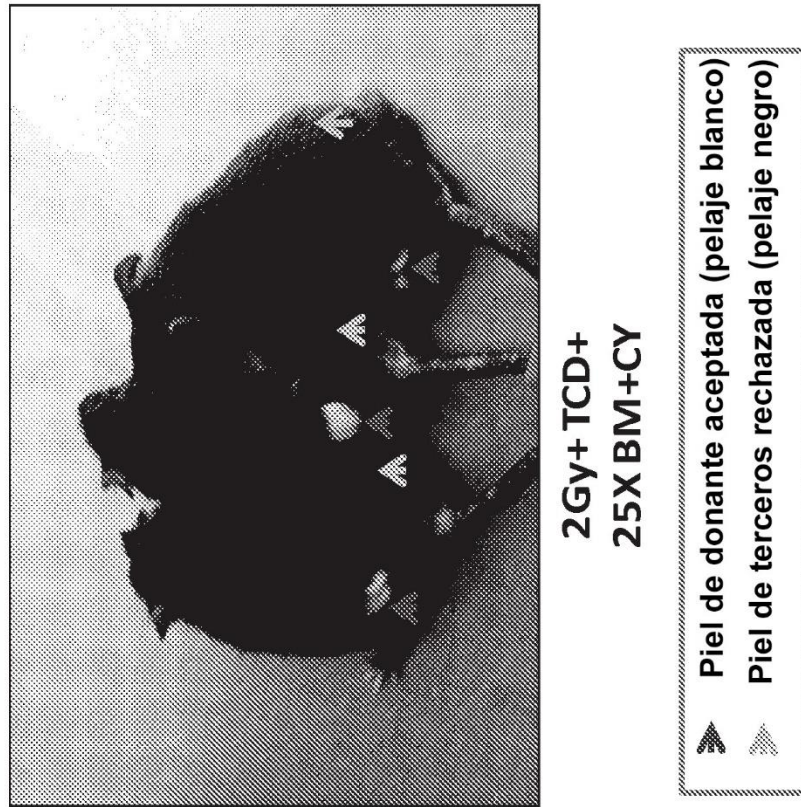


FIG. 5

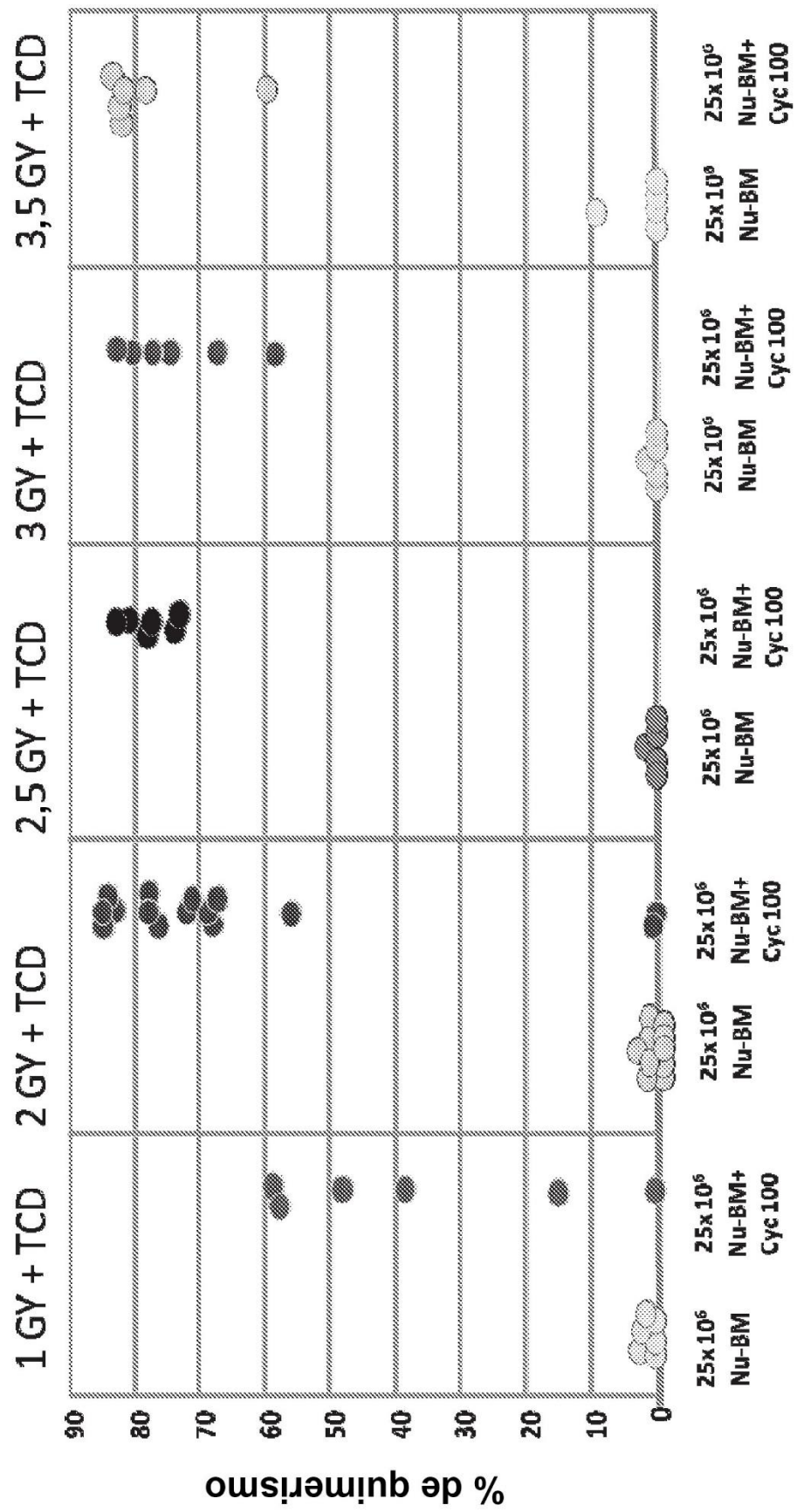


FIG. 6

