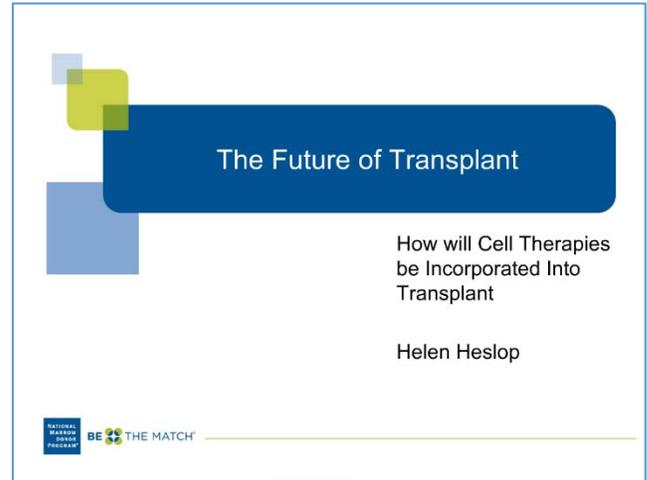


The Future of Transplant

Diapositiva 1

HELEN HESLOP, M.D.: Hoy voy a hablar sobre el futuro del trasplante pero, más específicamente, sobre cómo se podrían incorporar tratamientos celulares al trasplante en los años venideros.



The Future of Transplant

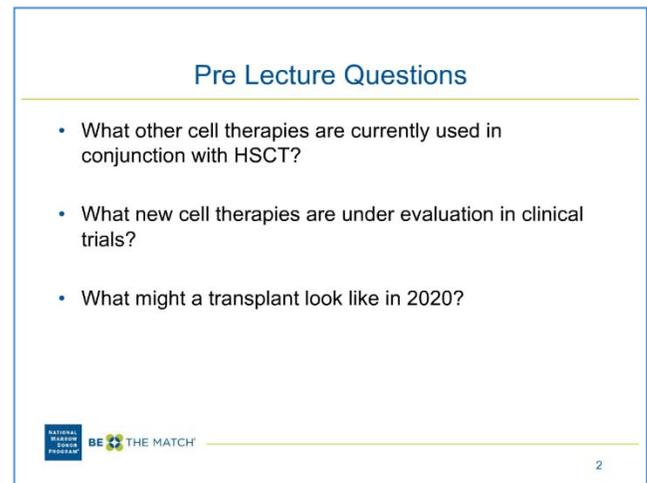
How will Cell Therapies be Incorporated Into Transplant

Helen Heslop

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE  THE MATCH®

Diapositiva 2

Primero que nada, tengo unas preguntas previas a la exposición y la primera es: ¿Qué otros tratamientos celulares se usan en la actualidad en la práctica clínica conjuntamente con el trasplante de células madres hematopoyéticas? La segunda pregunta es: ¿Qué tratamientos celulares nuevos se están evaluando en ensayos clínicos?, y la pregunta final es: ¿Cómo creen que serán los trasplantes en 2020?



Pre Lecture Questions

- What other cell therapies are currently used in conjunction with HSCT?
- What new cell therapies are under evaluation in clinical trials?
- What might a transplant look like in 2020?

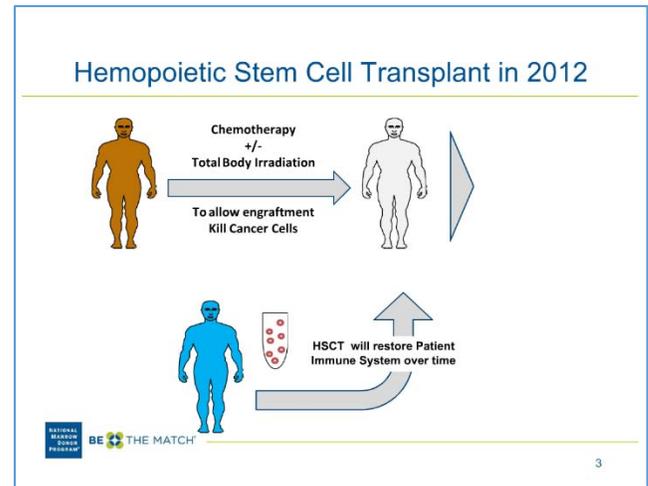
NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE  THE MATCH®

2

Diapositiva 3

Si pensamos en el trasplante de células hematopoyéticas en 2012, el proceso es que se identifica un donante y una vez que se encuentra al donante más compatible, ya sea un familiar, un donante no emparentado o una unidad de sangre de cordón umbilical, el receptor recibe un acondicionamiento con quimioterapia, y a veces radiación adicional, para permitir que el producto de células madres del donante prenda y también para matar las células cancerosas ya que al receptor se le hace un trasplante para un cáncer hematológico. A veces el acondicionamiento puede ser lo que se llama de intensidad total o, si el paciente es mayor o no puede tolerar la intensidad total, se puede hacer un acondicionamiento de intensidad reducida.

Después del acondicionamiento, el paciente recibe células madres hematopoyéticas del donante para reconstituir el sistema inmunitario hematopoyético y, con el tiempo —que puede ser desde tres meses hasta un año—, si no hay enfermedad del injerto contra el huésped, se logrará la reconstitución total del sistema inmunitario y hematopoyético del receptor con las células derivadas del donante.



Diapositiva 4

Ahora bien, hay varias cosas que limitan el trasplante de células madres hematopoyéticas. La primera es que pueden ocurrir complicaciones debido a la alorreactividad o la disparidad genética entre el donante y el receptor. Estas se dividen en dos grupos principales. En el primero, las células donadas detectan diferencias en las células del receptor y las atacan causando la complicación llamada enfermedad del injerto contra el huésped, sobre la que habrán oído hablar en exposiciones anteriores. En el segundo, las células residuales del receptor reconocen diferencias en las células donadas y rechazan el producto de células madres trasplantado. La segunda clase principal de complicaciones posteriores al trasplante incluye las complicaciones debidas al acondicionamiento y esto puede ser toxicidad orgánica en distintos órganos, como los pulmones, los riñones, el corazón y prácticamente cualquier otro sistema corporal. El riesgo de esta complicación está relacionado no solo con el acondicionamiento sino con tratamientos anteriores que el paciente puede haber recibido y también comorbilidades de otras afecciones.

La tercera clase de complicaciones puede describirse en términos amplios como las complicaciones debidas a un retraso en la recuperación inmunitaria. Después del trasplante, el paciente reconstituye su sistema hematopoyético e inmunitario a partir del producto infundido. Y según cuántas células recibió el paciente, si tuvo enfermedad del injerto contra el huésped y si recibió inmunosupresión adicional, y otros factores relacionados con el sistema inmunitario del receptor, esta recuperación puede tardar desde unos pocos meses hasta varios años. En algunos casos, y durante ese lapso, el paciente corre riesgo de complicaciones por infecciones que en una persona con un sistema inmunitario normal pueden causar tan solo un leve malestar, pero que pueden causar gran morbilidad en los pacientes cuyo sistema inmunitario está debilitado después del trasplante. Y este tipo de complicaciones incluyen infecciones por virus como el citomegalovirus, que el sistema inmunitario en general controla fácilmente, pero que, después de un trasplante, pueden causar considerable morbilidad. La última complicación sucede a los pacientes cuando el cáncer recaída después del trasplante. Ahora, hay maneras posibles de superar todas estas limitaciones mediante tratamientos celulares.

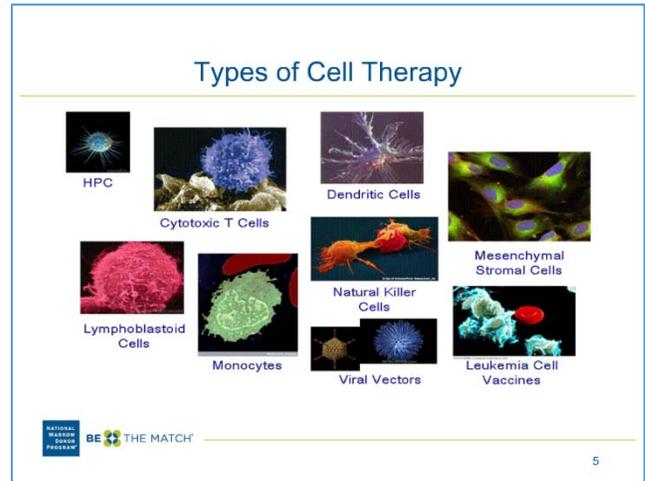
Limitations of HSCT

- Complications due to alloreactivity
 - Graft versus host disease
 - Rejection
- Complications due to conditioning
 - Organ toxicity
- Complications due to delay in immune recovery
 - Infections
- Relapse of primary malignancy

- All amenable to cell therapy approaches

Diapositiva 5

Esta diapositiva muestra distintos tipos de tratamientos celulares y pueden ver que las células progenitoras hematopoyéticas en sí son un tipo de tratamiento celular, pero también hay varias maneras distintas en las que las células inmunitarias pueden expandirse y volver a administrarse a los pacientes, y esto incluye células como los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos citolíticos naturales y las células dendríticas. También se pueden dar ciertas vacunas a los pacientes y las vacunas pueden ser células inmunitarias, como las células dendríticas, o algunos protocolos incluso fabrican vacunas con el tumor del paciente. También hay un tipo de célula llamada célula mesenquimatosa del estroma, que tiene una serie de aplicaciones en medicina regenerativa y que se está explorando para usar después del trasplante. También hay otras modalidades de tratamiento, como el génico, pero en esta charla voy a concentrarme en la administración de células que no sean las células regenerativas hematopoyéticas, es decir células del sistema inmunitario o células mesenquimatosas del estroma.



Diapositiva 6

Así que, si pensamos en la situación en 2012, cuáles tratamientos son estándar de atención, en el trasplante hay solo uno, y ese es el tratamiento con linfocitos T, es decir la infusión de linfocitos del donante. Este consiste en dar al paciente, después que ha recibido el trasplante, una dosis adicional de linfocitos del donante del trasplante. Esto se hace en varias indicaciones clínicas, probablemente la más común sea tratar la recaída en pacientes con cánceres hematológicos, pero a veces se hace para intentar revertir un quimerismo que está declinando o para aportar acción antiviral. Cada enfermedad maligna responde de manera distinta a la infusión de linfocitos del donante, y la mayor tasa de respuesta se ve en la leucemia mielógena crónica, que no es una indicación en la que se recomiende el trasplante con mucha frecuencia en la actualidad, como solía hacerse, debido a que ahora hay otros tratamientos específicos alternativos. No obstante, todavía se usan infusiones de linfocitos del donante con bastante frecuencia para tratar recaídas de otras enfermedades y para las otras indicaciones que he mencionado. Este tipo de tratamiento, obviamente, no es una opción para un paciente que ha recibido un trasplante de sangre de cordón umbilical.

The slide titled "T Cell Therapy as Standard of Care" lists the following points:

- Donor lymphocyte infusions often used clinically
 - To treat relapse
 - To reverse declining chimerism
 - To provide antiviral activity
- Highest response rate in CML

The slide includes the National Marrow Donor Program logo and the text "BE THE MATCH" in the bottom left corner, and the number "6" in the bottom right corner.

Diapositiva 7

También hay varias otras maneras posibles de usar los linfocitos T después de trasplante... para mejorar la reconstitución inmunitaria y tratar la recaída, y se hace expandiendo poblaciones específicas de linfocitos T. He mencionado varios tipos de linfocitos T sobre los que voy a hablar en las próximas diapositivas y son linfocitos T que se han activado de manera no específica, linfocitos T que reconocen antígenos específicos, linfocitos T genéticamente modificados y linfocitos T reguladores. Creo que es importante darse cuenta de que todos estos son tratamientos en investigación, de modo que todos se han realizado bajo una solicitud de autorización de un fármaco experimental nuevo de la FDA, pero espero que, antes de 2020, algunos de estos tratamientos estén camino de transformarse en tratamientos estándar tras la aprobación de la FDA.

Investigational T Cell Therapies

- Activated T cells
- Antigen Specific T cells
- Genetically modified T cells
- Regulatory T cells

• All studies conducted under IND

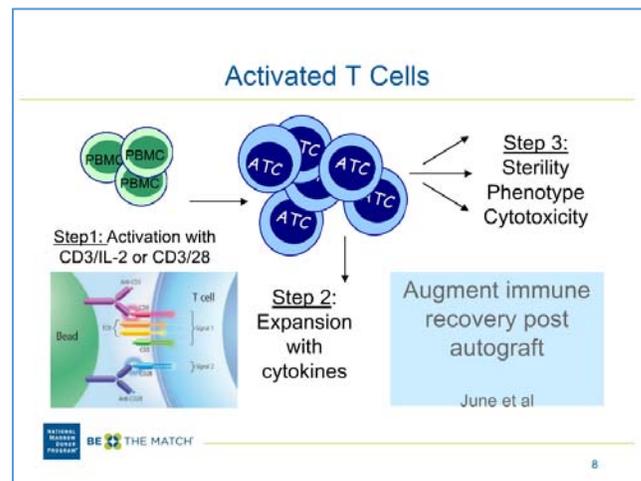
NATIONAL BONE MARROW TRANSPLANT FOUNDATION BE THE MATCH

7

Diapositiva 8

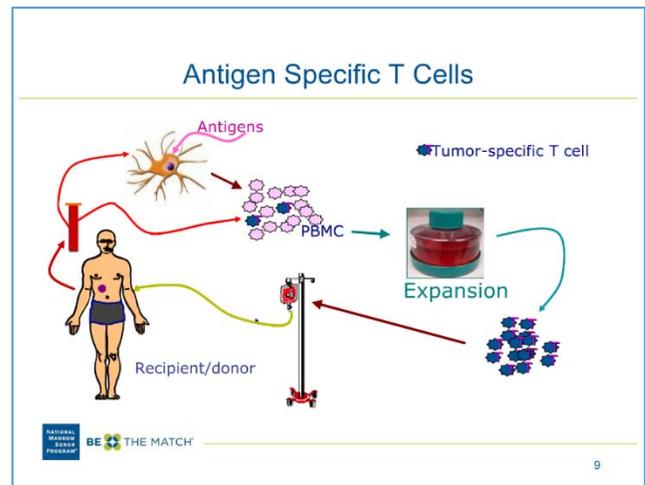
El primer tipo de célula del que voy a hablar son los linfocitos T activados y la manera en que se obtienen es tomando células mononucleares de sangre periférica del donante o, a veces, para esta aplicación en el trasplante autólogo, del mismo paciente. Estas células se activan de manera no específica y probablemente la manera más común sea con microesferas, si bien a veces se hace con anticuerpos, y se estimulan generalmente con una combinación de CD3 para estimular el receptor del linfocito T y CD28 para aportar coestimulación. Después de esta activación inicial, se expanden con citocinas y, después de que se prueban para verificar que sean estériles, y para caracterizarlas por fenotipo y citotoxicidad, se pueden administrar a los pacientes.

Ahora, en el caso del trasplante autólogo, Carl June y otros investigadores de la Universidad de Pennsylvania han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos para mostrar que esta población de células puede incrementar la intensidad de la recuperación inmunitaria después de un trasplante autólogo y prolongar el tiempo durante el cual el paciente es capaz de responder a las infecciones y, con suerte, esto se traducirá en un menor riesgo de recaída. Esto también se está estudiando en algunas aplicaciones después del trasplante alogénico.



Diapositiva 9

Otro procedimiento es administrar linfocitos T específicos en vez de una población masiva de linfocitos T activados de manera no específica. Y este esquema muestra cómo se hace. Y en este caso, se obtiene sangre del receptor, si es en una aplicación autóloga, o del donante si es en una aplicación alogénica, y se estimula con antígenos expresados en una célula presentadora de antígeno. Y el razonamiento es que, al hacerlo, se aísla una población de células que es poco frecuente, que se muestran aquí como células azul oscuro, en una población de células mononucleares de sangre periférica que puede expandirse mediante estimulación con el antígeno en condiciones estériles para que el producto final esté enriquecido con estos linfocitos T con la especificidad deseada, y la especificidad deseada puede ser que responda a un antígeno viral o a un antígeno tumoral, y estas células luego pueden infundirse al receptor para brindarle protección.



Diapositiva 10

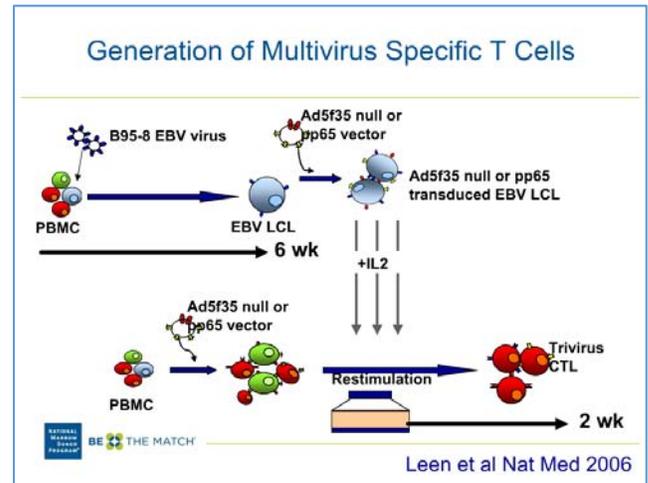
Ahora, si se van a generar linfocitos T específicos, hay varios requisitos. En primer lugar, es necesario tener una buena célula presentadora de antígeno y los investigadores han usado varias células distintas. Han usado células dendríticas, que es un tipo de célula presentadora de antígeno profesional, pero también han usado monocitos y linfocitos B. También se necesita una fuente de antígenos para el antígeno al que se quiere apuntar. Y aquí también se han usado distintas clases de productos, algunos han usado lisados virales, otros antígenos virales de longitud completa y, ahora, es más frecuente que se usen péptidos de una mezcla de péptidos superpuestos derivados de un antígeno. También es importante considerar, al elegir cómo hacerlo, cuál se puede trasladar más fácilmente al laboratorio para fabricar el producto que se va a administrar en la práctica clínica. Creo, obviamente, que pulsarlas con péptidos, que puede ser un procedimiento muy estéril, es preferible a usar un lisado viral, para lo que habría que hacer muchas pruebas de seguridad para asegurarse de no transferir virus al receptor. También resulta útil tener un donante inmune que ya haya estado en contacto con el antígeno porque es mucho más fácil volver a generar una respuesta inmunitaria secundaria *ex vivo* que una respuesta inmunitaria primaria. Por lo tanto es más fácil de hacer cuando apuntamos a un virus que la mayoría de las personas han tenido que a un antígeno tumoral, que normalmente los donantes no han visto.

Requirements for Generation of CTLs

- Good antigen presenting cell
 - Dendritic cells
 - Monocytes
 - B cells
- Source of antigen
 - Viral lysate
 - Transduce with full length viral antigen(s)
 - Pulse with peptides
- Helpful to have immune donor

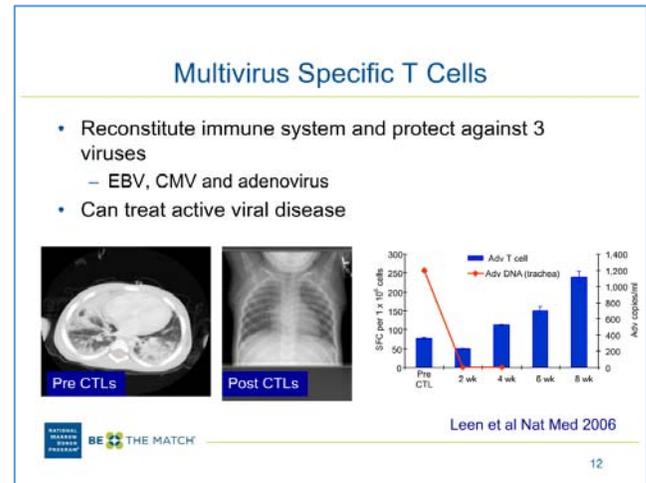
Diapositiva 11

Esta diapositiva solo muestra una aplicación en particular. Cómo producimos linfocitos T en un estudio que se hizo en nuestro centro que apuntó a tres virus. Es una diapositiva un poco compleja. Solo quiero mostrarles cómo se pueden hacer estas células y luego regresaremos más adelante a cómo, quizá, se puede hacer de manera más simple. Así que, en este protocolo, estamos intentando producir células que detecten tres virus que pueden causar infecciones después del trasplante: adenovirus, EBV y CMV. Así que, para la primera estimulación, que se muestra en la esquina inferior, arriba del logotipo del NMDP, obtuvimos sangre periférica del donante y adherimos los monocitos durante la noche y luego los infectamos con un vector adenoviral que contenía un antígeno de CMV llamado PP65 para que los linfocitos T que respondían a esta primera estimulación vieran adenovirus y CMV. En las estimulaciones subsiguientes, que se ven arriba a la izquierda de la diapositiva, usamos linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr como célula presentadora de antígeno, y también linfocitos B genéticamente modificados con el vector que contiene el PP65 de CMV en el vector adenoviral. De modo que, para esta estimulación subsiguiente, los linfocitos T que respondieron estaban viendo antígeno de CMV en el vector adenoviral, antígenos adenovirales en el vector adenoviral, y antígenos de EBV en los linfocitos B transformados. De modo que, al producir células de este modo, pudimos hacer células específicas para los tres virus.



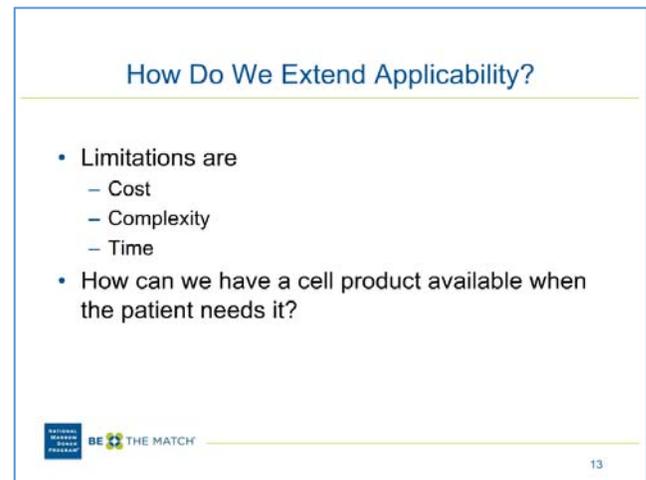
Diapositiva 12

En un estudio que publicó Ann Leen en *Nature Medicine* en 2006 usamos estas células para administrarlas a los pacientes después del trasplante, y encontramos que podían reconstituir el sistema inmunitario y proteger contra tres virus a la mayoría de los pacientes. Esta diapositiva muestra a un paciente representativo que tenía una enfermedad virósica activa, que era infección por adenovirus, y pueden ver en la tomografía computarizada a la izquierda que tenía la enfermedad muy extendida y de hecho estaba con respirador en esa etapa, lo que normalmente es un factor pronóstico muy desfavorable para un paciente después del trasplante con una infección virósica. Recibió linfocitos T específicos contra múltiples virus y, como pueden ver en la gráfica a la extrema derecha, después de recibirlas se encontró ADN completo de adenovirus en el aspirado traqueal que se muestra en la línea roja, asociado con el aumento en la respuesta inmunitaria al adenovirus, que se muestra en las barras azules según se midió en el ensayo y, en coincidencia con la disminución en el ADN de adenovirus y el aumento de la respuesta inmunitaria, sus síntomas clínicos mejoraron como pueden ver en la radiografía de tórax, y continúa en remisión seis años después.



Diapositiva 13

De modo que esta fue una respuesta muy alentadora, pero la metodología que les mostré para hacer esas células era muy compleja. Así que, la pregunta ahora es cómo extendemos la aplicabilidad para poder ofrecer protección antivírica a un número mucho mayor de pacientes. Así que creo que, con el método que les mostré, las limitaciones serían el costo, la complejidad y el tiempo, y la pregunta importante ahora será cómo podemos obtener un producto de células más rápidamente cuando el paciente lo necesita, en vez de tener que esperar las seis semanas o más que se tarda en hacer estas células.

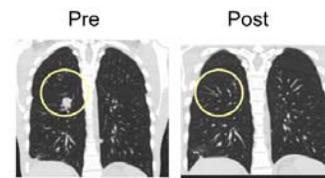


Diapositiva 14

Creo que hay varias maneras de hacerlo. Una manera que varios centros están explorando actualmente es usar linfocitos T de terceros de un banco de linfocitos. Así que, lo que se puede hacer es generar estos linfocitos T por estos métodos largos y complicados pero a partir de un banco de donantes con tipos celulares comunes, lo que hemos hecho en colaboración con el NDMP, para identificar donantes que tengan haplotipos comunes y luego almacenar estas células en el congelador para que, si un paciente contrae una infección virósica, se le puedan administrar los linfocitos en poco tiempo. Esto se ha evaluado en varios estudios y el grupo de Sloan Kettering ha informado este año sobre un estudio en el que administraron linfocitos T de un tercero específicos contra el EBV a cuatro pacientes que habían enfermado de linfoma EBV-positivo tras un trasplante de sangre de cordón umbilical, y los cuatro tuvieron una respuesta completa. Nuestro centro también ha participado en un estudio multicéntrico liderado por el NHLBI, en el cual administramos los linfocitos específicos contra múltiples virus que les mostré en las diapositivas anteriores a pacientes infectados por uno de tres virus: EBV, CMV o adenovirus, y hemos visto respuestas en más del 75 por ciento de los pacientes tratados en este estudio multicéntrico que tenían infecciones y recibieron el producto de linfocitos T más compatible. Uno de estos pacientes, que se muestra en la diapositiva, tenía un linfoma EBV-positivo con una lesión en el pulmón y pueden ver que se resolvió después de haber recibido los linfocitos T. Así que esta es una de las maneras en que se puede hacer que los linfocitos T estén a disposición de los pacientes más rápido.

Use Banked Third Party CTLs

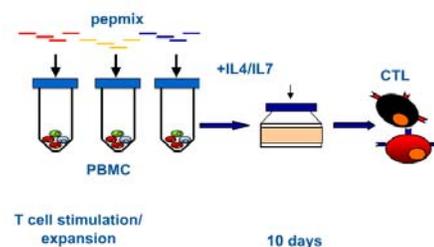
- Responses in 4 patients who received third party EBV CTLs to treat EBV lymphoma after cord transplant (MSKCC)
- Responses in over 75% patients treated in multicenter study using banked trivirus specific CTLs



Diapositiva 15

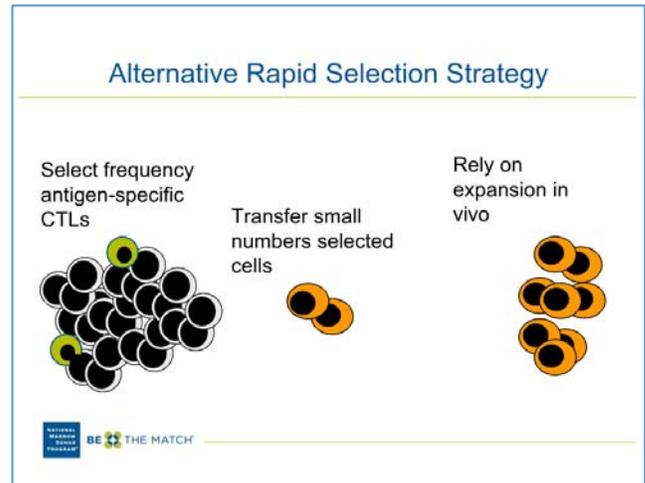
Otra manera es simplificar la manera en que generamos los linfocitos T para que podamos hacerlos a pedido cuando el paciente contrae una infección. La diapositiva muestra un método publicado este año por Ulrike Gerdemann y colegas en el que usaron células mononucleares de sangre periférica del donante, las pulsaron con péptidos derivados de varios virus que pueden causar problemas después del trasplante y luego hicieron una expansión mucho más breve en citocinas optimizadas para producir una línea de linfocitos T en 10 días. Este procedimiento tiene la ventaja de que no emplea virus, como el otro, y es mucho más rápido, de modo que las células pueden estar listas para el paciente en tan solo 10 días.

Making Virus CTL Production Simpler



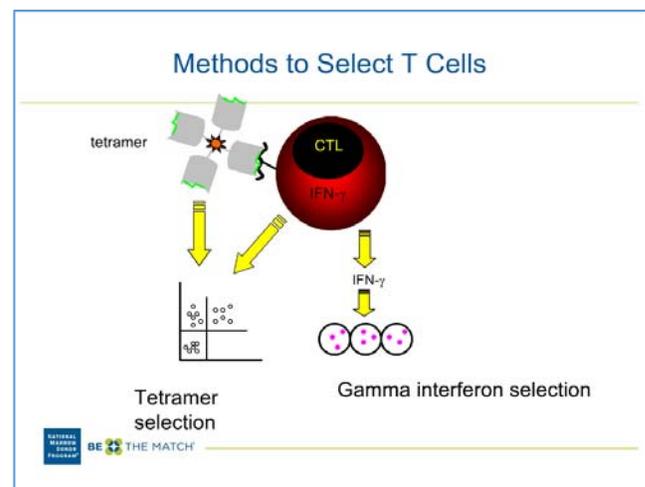
Diapositiva 16

Hay otras estrategias posibles que son incluso más rápidas y se basan también en procurar seleccionar linfocitos T de sangre periférica que estén presentes con poca frecuencia. Por ejemplo, los linfocitos T contra el CMV pueden constituir hasta el uno por ciento de los linfocitos T de un donante normal pero, si podemos seleccionarlos y transferirlos al receptor, entonces podemos confiar en que ocurrirá una expansión in vivo en el receptor que tiene la infección, entonces estaríamos presentando el antígeno que estimulará a los linfocitos T.



Diapositiva 17

Hay un par de maneras de hacerlo que se están evaluando en ensayos clínicos en este momento. Una es la selección de tetrámeros, en la que se utilizan complejos de HLA específicos para un péptido en particular para seleccionar linfocitos T que reaccionan con ese péptido. Así que, si tenemos un tipo de HLA común y una respuesta inmunodominante del linfocito T, podemos elegir un péptido con el que reaccionarán los linfocitos T de un porcentaje significativo de donantes, y luego transferirlo al receptor. Este procedimiento tiene la ventaja de ser simple y breve. Y tiene la desventaja de que se transfiere una respuesta inmunitaria más limitada, de modo que podría haber un mecanismo de escape en el receptor. Un segundo método es estimular linfocitos T del donante con el antígeno viral y luego después de un breve cultivo *ex vivo*, seleccionar los linfocitos que responden por su capacidad de liberar interferón gamma, y mediante esta metodología, llamada 'captura por interferón gamma', podemos seleccionar un grupo más amplio de linfocitos T que vayan a reaccionar con el virus que podemos transferir al receptor.



Diapositiva 18

Todos estos procedimientos se han probado en las primeras fases de ensayos clínicos y tienen actividad clínica. Cada uno de ellos presenta algunas ventajas y desventajas. Obviamente con las células almacenadas tenemos el riesgo de rechazo porque no son completamente compatibles o por el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped. Como mencioné, las células seleccionadas por los tetrámeros pueden tener una especificidad restringida y, para las células capturadas mediante interferón gamma, a veces se necesita una gran cantidad de sangre del donante. A veces se usa extracción por aféresis en vez de extracción de sangre. Pero creo que todos estos métodos distintos se están evaluando y debería quedar claro en los próximos años cuál es el método óptimo o qué combinación de métodos se pueden entonces llevar a la práctica clínica.

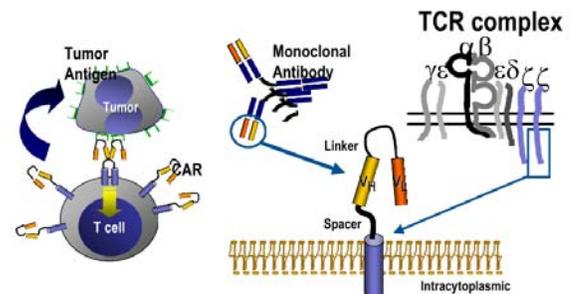
Rapidly Available T Cells

- All have clinical activity
- Allogeneic banked cells
 - Risk of rejection
- Tetramer selected cells
 - Restricted specificity
- Gamma interferon capture selected cells
 - Large volumes blood needed

Diapositiva 19

Otro tipo de linfocitos T que está dando resultados muy interesantes en los ensayos clínicos son los linfocitos T que han sido genéticamente modificados para expresar un receptor artificial llamado receptor antigénico quimérico. Este receptor artificial se crea yuxtaponiendo el dominio de reconocimiento del antígeno de un anticuerpo monoclonal con un dominio de señalización, generalmente beta, del complejo TCR conjuntamente con la porción coestimuladora, y si este receptor artificial se injerta en un linfocito T, dicho linfocito T adquiere la capacidad de reconocer el antígeno reconocido por ese anticuerpo monoclonal, y cuando reconoce y capta el antígeno, se activará y lizará la célula tumoral.

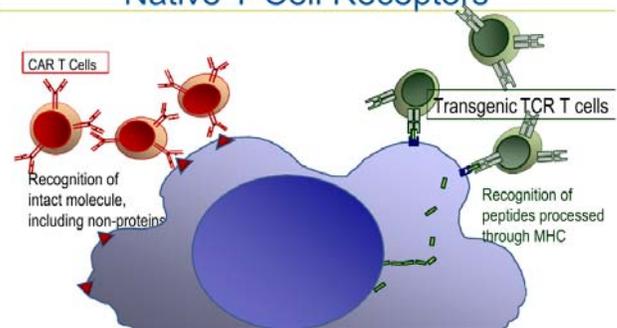
Chimeric Antigen Receptors



Diapositiva 20

Esta diapositiva resume en qué difiere este método de los linfocitos T que reconocen el antígeno mediante un receptor del TCR transgénico. El receptor artificial reconoce y detecta moléculas en la superficie de la célula, incluso no proteicas, mientras que el receptor nativo del linfocito T reconoce péptidos procesados y presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad, o MHC.

Chimeric vs. Transgenic Native T-Cell Receptors



Diapositiva 21

Una de las dianas que se han explorado hasta ahora en muchos estudios es CD19, y esta es una diana atractiva porque está presente en los linfocitos B desde una etapa muy temprana hasta una etapa muy tardía de la diferenciación, e incluye la mayoría de los linfomas y leucemias de linaje B. No está expresado en las células madres hematopoyéticas de modo que apuntar a este antígeno no debería causar efectos secundarios como neutropenia u otras toxicidades orgánicas, y el único efecto secundario que se debería ver es depleción de linfocitos B normales.

CD19 as a Target

- Present on B lineage cells from the pro-B cell stage to mature B cells
- High expression most B lineage lymphoma and leukemia
- **NOT** expressed on hematopoietic stem cells (or other tissues)
 - Should not be myelosuppressive effects
 - Should not be other organ toxicities
- Will cause depletion normal B cells

Diapositiva 22

Varios ensayos han explorado el uso de linfocitos T dirigidos a CD19 y el que ha logrado la respuesta más notable es un estudio de la Universidad de Pennsylvania en pacientes con CLL que se publicó en 2011 en el New England Journal y en *Science Translational Medicine*. Trataron a pacientes con cargas tumorales muy elevadas y tuvieron respuestas clínicas importantes con dos respuestas completas sostenidas y una respuesta parcial. Observaron algunas toxicidades debidas a la liberación de citocinas asociadas con estas respuestas de la enfermedad, pero también vieron una expansión muy notable de linfocitos T modificados con este receptor artificial *in vivo*. Hicieron cálculos para determinar que se erradicó alrededor de un kilo de tumor en cada paciente administrando cantidades relativamente pequeñas de linfocitos T, lo que es una respuesta clínica muy notable.

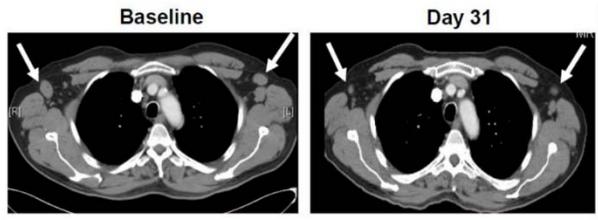
CD19 Redirected T Cells in CLL

- Treated patients with high disease burdens have had major clinical benefit with 2 CR, 1 PR ongoing
- Significant toxicities associated with disease responses
- >1000 fold in vivo expansion of CART19+ cells
- Treatment eradicated on average an estimated ~1 Kg of tumor (i.e. $\sim 10^{12}$ leukemia cells) in each patient

Diapositiva 23

Y aquí se ve la respuesta en un paciente, es una imagen de ese artículo del New England Journal, y pueden ver que los ganglios linfáticos agrandados indicados por las flechas en la tomografía de referencia básicamente se habían resuelto un mes después de la infusión. Así que creo que estos son resultados muy prometedores. Creo que probablemente hay que trabajar para obtener un beneficio clínico sin algunos de los efectos secundarios, pero este método tiene el potencial de aplicarse a muchos otros antígenos expresados en las células tumorales después del trasplante.

Clinical Response After CART-19 Infusion:
UPN 03 CT Imaging



M. Kalos et al NEJM 2011

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH CENTER BE THE MATCH

Diapositiva 24

Quisiera cambiar a un tipo distinto de linfocitos ahora y hablar un poco de los linfocitos citolíticos naturales, o NK. Los linfocitos NK son una población singular de linfocitos que coexpresan CD56 y CD3 negativo, y estas células tienen respuestas antivirales y antitumorales innatas. Hay distintos subgrupos de linfocitos NK que tienen fenotipos y características funcionales distintos. La mayoría son linfocitos CD56 de fluorescencia débil, que son muy citotóxicos, pero también hay una población que es CD56 de fluorescencia brillante que tiene más funciones inmunoreguladoras. Estos linfocitos también son de interés porque se encuentran entre las primeras células en recuperarse después del trasplante, generalmente a las dos o tres semanas.

NK Cells

- Unique CD56+CD3- cell population
- Innate antiviral and antitumor immune response
- Different cell subsets with distinct phenotypic and functional characteristics
 - 90% are highly cytotoxic CD56 dim cells
 - 10% are immunoregulatory CD56 bright cells
- Recover 2 to 3 weeks post-transplant

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH CENTER BE THE MATCH

24

Diapositiva 25

La principal función de los linfocitos citolíticos naturales es reconocer lo propio de lo ajeno y esto lo logran a través de receptores llamados receptores similares a inmunoglobulina conocidos como KIR. Se han identificado varios KIR, principalmente en el cromosoma 19, y estos aportan especificidad hacia ligandos de moléculas HLA, particularmente HLA-C. Algunos de estos son activadores y otros inhibidores. El esquema en esta página muestra que, si tenemos un linfocito NK que se enfrenta a una célula diana y tiene un receptor activador pero también un receptor inhibidor, no la matará. Pero en un caso en el que hay un receptor activador y ningún receptor inhibidor, el linfocito NK podrá matar la célula diana. Esta capacidad se puede explotar en el trasplante seleccionando donantes en los que tenemos el receptor activador que esperamos permitirá a las células donadas erradicar las células leucémicas del receptor. Esto se muestra en la próxima diapositiva, en la que podría haber blastocitos leucémicos del receptor, y la presencia de un ligando activador sin un ligando inhibidor permite la lisis de estas células tumorales.

(Killer Ig-like Receptors)KIRs

- Means by which NK cells recognize self from non-self
- Multiple KIRs currently identified on chromosome 19
- Ligand specificity for HLA molecules particularly HLA-C
- Some are activating and some are inhibitory

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH 25

Diapositiva 26

De modo que hay una serie de métodos que buscan explotar la alorreactividad de los linfocitos NK después del trasplante. Muchos centros ahora incluyen la genotipificación de KIR en sus criterios de selección de donantes, para elegir un donante para el receptor con una incompatibilidad que permita la lisis mediante KIR, y también hay varios investigadores que están desarrollando protocolos con expansión ex vivo de los linfocitos NK para prevenir la recaída posterior al trasplante.

Killing of Tumor Cells by NK Cells with KIR Mismatch

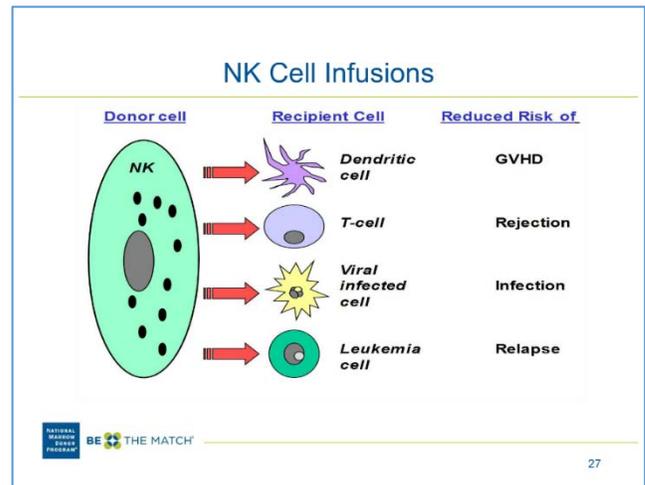
Exploiting NK Cell Alloreactivity

- 1) Donor selection criteria to include KIR genotyping
- 2) Ex vivo expansion of NK cells for adoptive transfer

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH 26

Diapositiva 27

La siguiente diapositiva muestra todas las maneras diferentes en que los linfocitos citolíticos podrían usarse además de para tratar la recaída; los linfocitos NK con actividad contra las células dendríticas del receptor podrían reducir el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped. Los linfocitos NK podrían tener actividad contra linfocitos T residuales del receptor para reducir el riesgo de rechazo, y luego la actividad antiviral y antitumoral de la que hemos hablado podría tener un efecto en las infecciones y la recaída.



Diapositiva 28

Las células mesenquimatosas del estroma, o MSC, son otro tipo de célula que se está explorando en aplicaciones clínicas. Estas células son células adherentes que pueden diferenciarse en varios tipos de células y secretar citocinas, y también tienen actividad inmunomoduladora. Debido a estas propiedades, hay ensayos que están explorando su actividad en pacientes con enfermedad del injerto contra el huésped aguda y también en pacientes con daño orgánico y funcionamiento medular deficiente. Las MSC también podrían tener un papel en el tratamiento del cáncer debido a que preferentemente migran hacia los tumores y pueden incorporarse en el microentorno del tumor. Esto plantea la posibilidad de usar estas células como vehículo para administrar fármacos contra el cáncer. Otra ventaja de las MSC es que se pueden usar bancos de terceros para un gran número de receptores.

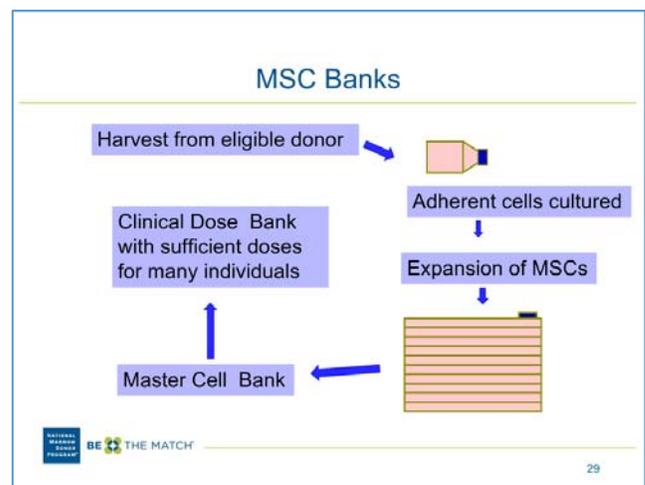
Mesenchymal Stromal Cells (MSCs)

- Treatment of
 - Acute GVHD
 - Organ damage (liver, pulmonary)
 - Poor marrow function
- Role in cancer therapy
 - MSCs preferentially migrate to tumors and incorporate in the tumor microenvironment
 - ? Role as vehicle to deliver anticancer drugs
- 3rd party banks can be used

Logos for 'NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM' and 'BE THE MATCH' are visible at the bottom left of the slide.

Diapositiva 29

La siguiente diapositiva muestra cómo se pueden generar esos bancos. Se puede hacer una extracción de un donante apto y las células adherentes se pueden cultivar y luego expandir en gran número para tener un banco maestro de células que creará un banco de dosis clínicas y así tener suficientes dosis para muchas personas. Así que las MSC se han evaluado como tratamiento posterior al trasplante para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped, para tratar el daño orgánico y para fomentar que el injerto prenda, y este es un campo muy activo con muchos ensayos clínicos en curso en este momento.



Diapositiva 30

Otra población de interés son los linfocitos T reguladores y hay varias poblaciones de linfocitos T que regulan las respuestas inmunitarias. El fenotipo que más se ha explorado es el de CD4+, CD25+, FoxP3+, y estas células en muchos modelos preclínicos pueden suprimir la GVHD, así que hay mucho interés por investigar y probar estas células en la práctica clínica.

Regulatory T Cells

- Several populations of T cells that regulate immune responses termed regulatory T cells have been identified.
- Phenotype CD4+CD25+FoxP3+
- Can suppress GVHD
- Many investigators testing these cells in the clinic

Diapositiva 31

El año pasado un grupo italiano publicó en *Blood* el informe de un ensayo en el que infundieron linfocitos T reguladores, o T-REG, antes de administrar linfocitos T convencionales a 28 pacientes con cánceres hematológicos de riesgo alto, que estaban recibiendo trasplantes de células madres hematopoyéticas de familiares haploidentícos. Este estudio sugirió que la infusión de T-REG previno la enfermedad del injerto contra el huésped que normalmente se podría esperar dada la dosis de linfocitos T convencionales que habían administrado, y promovió la reconstitución linfoide. No pudieron identificar ningún efecto perjudicial en el efecto del injerto contra la leucemia. Ahora bien, estos obviamente son resultados preliminares, pero creo que son interesantes para mostrar el potencial de este tipo de población celular para modular la función inmunitaria después del trasplante.

Regulatory T Cells

- Early infusion of Tregs, followed by conventional T cells in 28 patients with high-risk hematologic malignancies who underwent HLA-haploidentical HSCT.
- Treg infusion prevented GVHD and promoted lymphoid reconstitution,
- No effect on graft-versus-leukemia effect.

Di Ianni et al Blood 2011

Diapositiva 32

Las vacunas antitumorales son otra aplicación en la que se podría usar el tratamiento celular. Hay mucho interés en las vacunas con células dendríticas. Las células dendríticas, como expliqué antes, son células presentadoras de antígeno sumamente potentes y hay una vacuna de células prostáticas llamada Provenge elaborada a partir de células dendríticas pulsadas con antígenos expresados en cáncer de próstata, que actualmente es el primer producto de tratamiento celular autorizado en los Estados Unidos. Hay varios investigadores también interesados en usar vacunas de células dendríticas dirigidas a cánceres hematológicos para reducir el riesgo de recaída después del trasplante. También hay otros tipos de vacunas que se han usado en la clínica. Hay algunas que usan bancos de células presentadoras de antígeno, como K562, y también hay vacunas de péptidos, y dos de las que se usan más comúnmente son los péptidos derivados de los antígenos PR1 y WT1, que a menudo están sobrepresados en los pacientes con cánceres mieloides.

Tumor vaccines

- Dendritic cell vaccines
 - Prostate cell vaccine Provenge is first licensed cell therapy product in United States
 - Dendritic cell vaccines evaluated post transplant to reduce risk of relapse
- Vaccines with APC
- Peptide vaccines – PR1 and WT1 in patients with myeloid malignancies

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH 32

Diapositiva 33

Así que creo que, en esta media hora, hemos explicado muchos productos celulares distintos que podrían aplicarse al trasplante. Así que, si pensamos cómo podrían diseñarse los trasplantes en el futuro, podemos tener un paciente que reciba quimioterapia y radiación, esperemos que con tratamientos más específicos y menos tóxicos para permitir que el injerto prenda y erradicar el cáncer después del trasplante. Pero el trasplante podría ser ahora de células madres hematopoyéticas más purificadas para poder ser más selectivos al administrar células del sistema inmunitario y otras células después del trasplante. Así que podríamos administrar linfocitos T reguladores para prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped, linfocitos citolíticos para prevenir la recaída, linfocitos T específicos para determinados virus para reconstituir la inmunidad a los virus y quizá, con el tiempo, otras infecciones, linfocitos T genéticamente modificados si un paciente de hecho recaída, y MSC si es necesario en pacientes con complicaciones orgánicas.

Engineering Transplants

The diagram illustrates the process of engineering transplants. It starts with a patient receiving chemotherapy and total body irradiation to allow for engraftment and kill cancer cells. This is followed by a hematopoietic stem cell transplant (HSCT). The diagram then shows the addition of various engineered cells: Tregs to prevent GVHD, NK cells to prevent relapse, virus-specific T cells, CAR T cells for relapse, and MSCs for tissue repair.

Chemotherapy +/- Total Body Irradiation
To allow engraftment Kill Cancer Cells

HSCT

T regs to prevent GVHD
NK cells to prevent relapse
Virus specific T cells
CAR T cells for relapse
MSCs for tissue repair

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM BE THE MATCH 33

Diapositiva 34

Así que, finalmente, quiero volver a mis preguntas previas a la exposición, y creo que los otros tratamientos celulares que se usan en la actualidad conjuntamente con el trasplante de células hematopoyéticas se limitan a la infusión de linfocitos del donante, pero creo que hay varios tratamientos celulares nuevos que se están evaluando en ensayos clínicos que es de esperar que se conviertan en tratamientos estándar más adelante, y he dado mi impresión de cómo creo que será un trasplante en 2020 y creo que hay muchas otras permutaciones y combinaciones.

Gracias.

Pre Lecture Questions

- What other cell therapies are currently used in conjunction with HSCT?
- What new cell therapies are under evaluation in clinical trials?
- What might a transplant look like in 2020?