

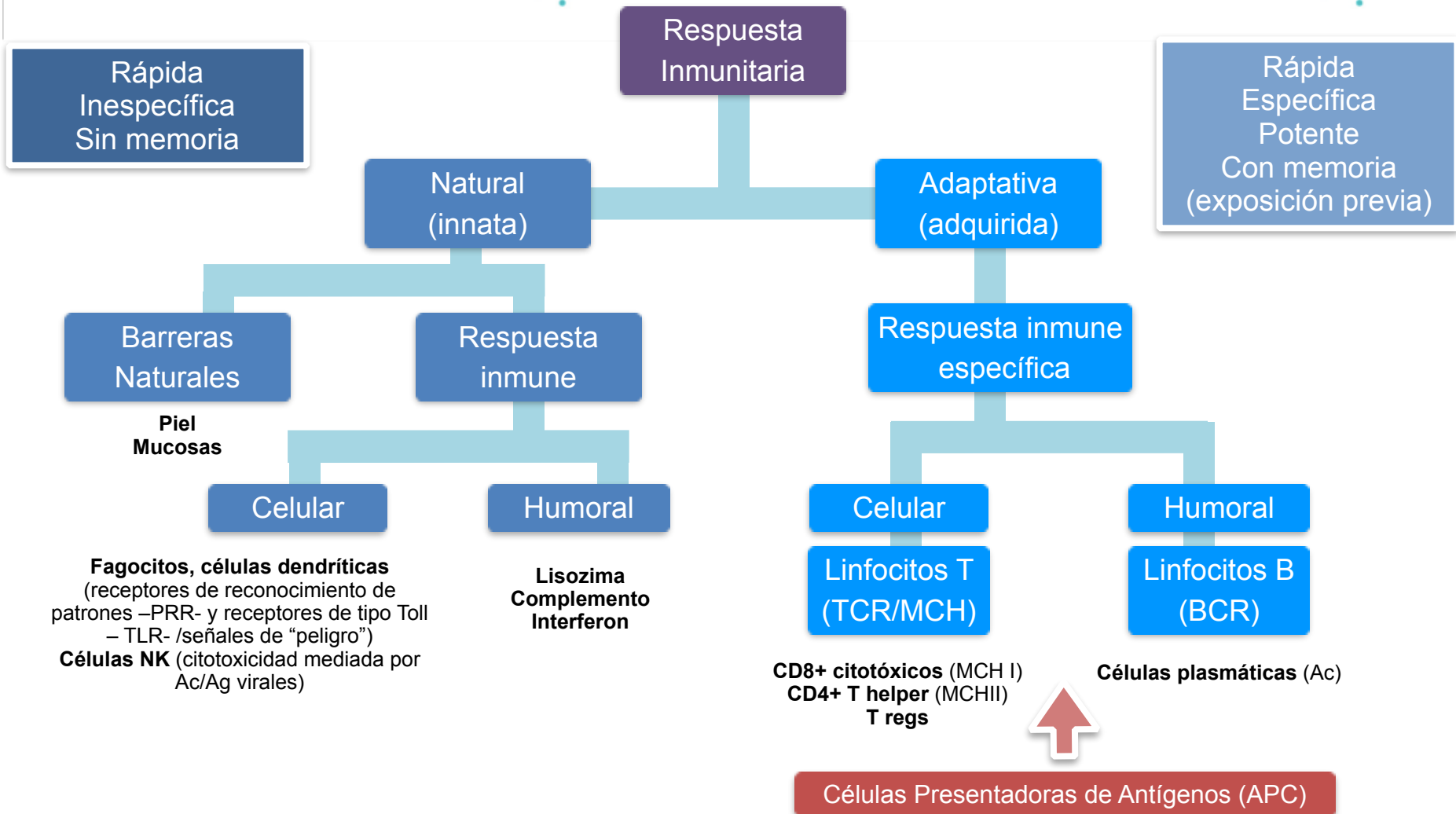


Inmunoterapia en el Banc de Sang i Teixits (BCN)

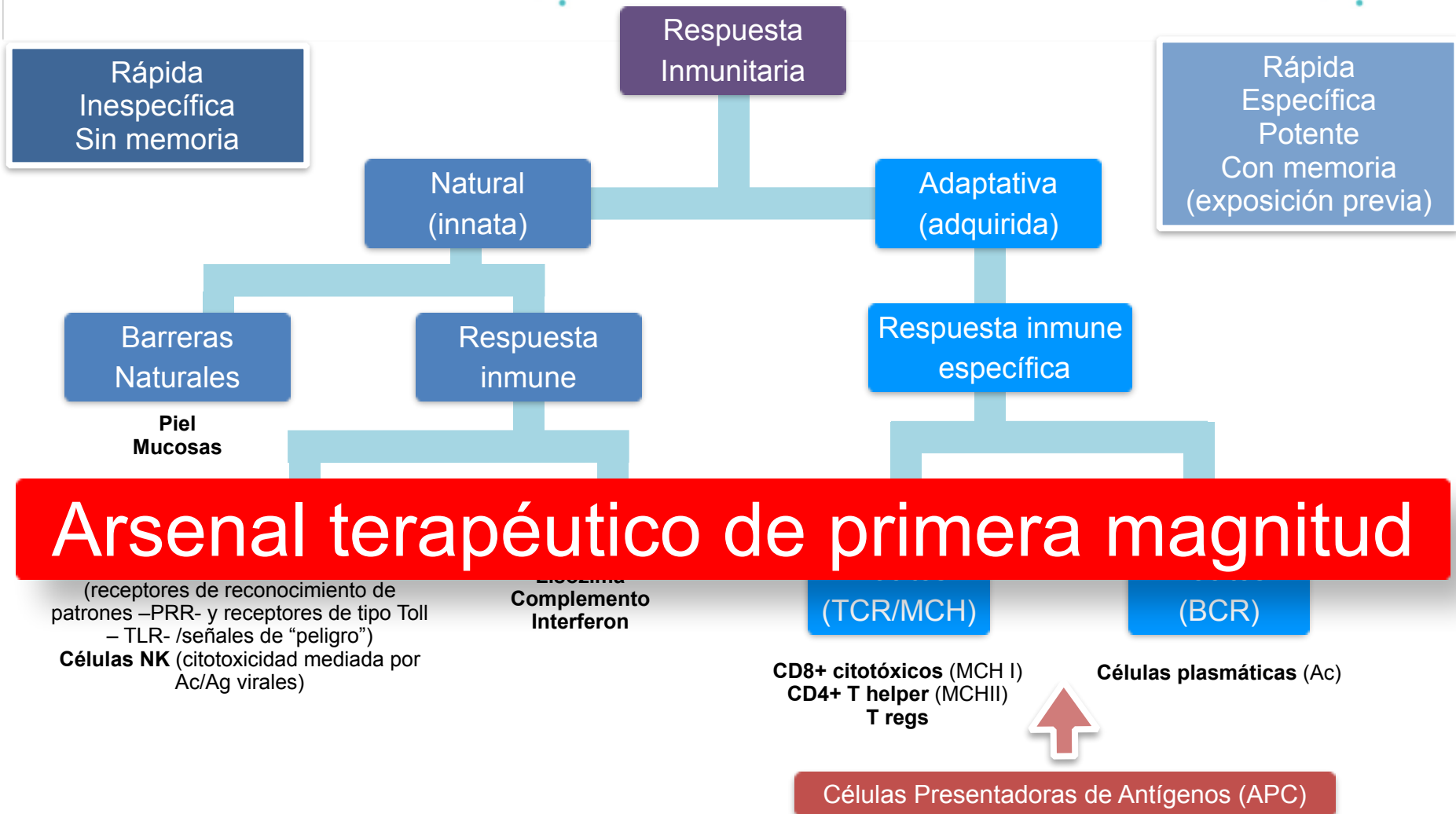
Dra. Ruth Coll
Desarrollo Clínico
Xcelia - División de Terapias Avanzadas
Banc de Sang i Teixits
(www.bancsang.net)



Inmunidad

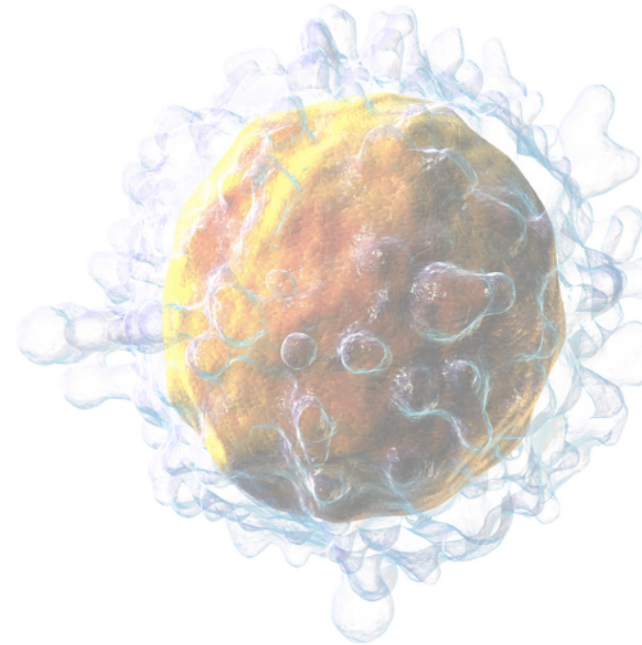


Inmunidad

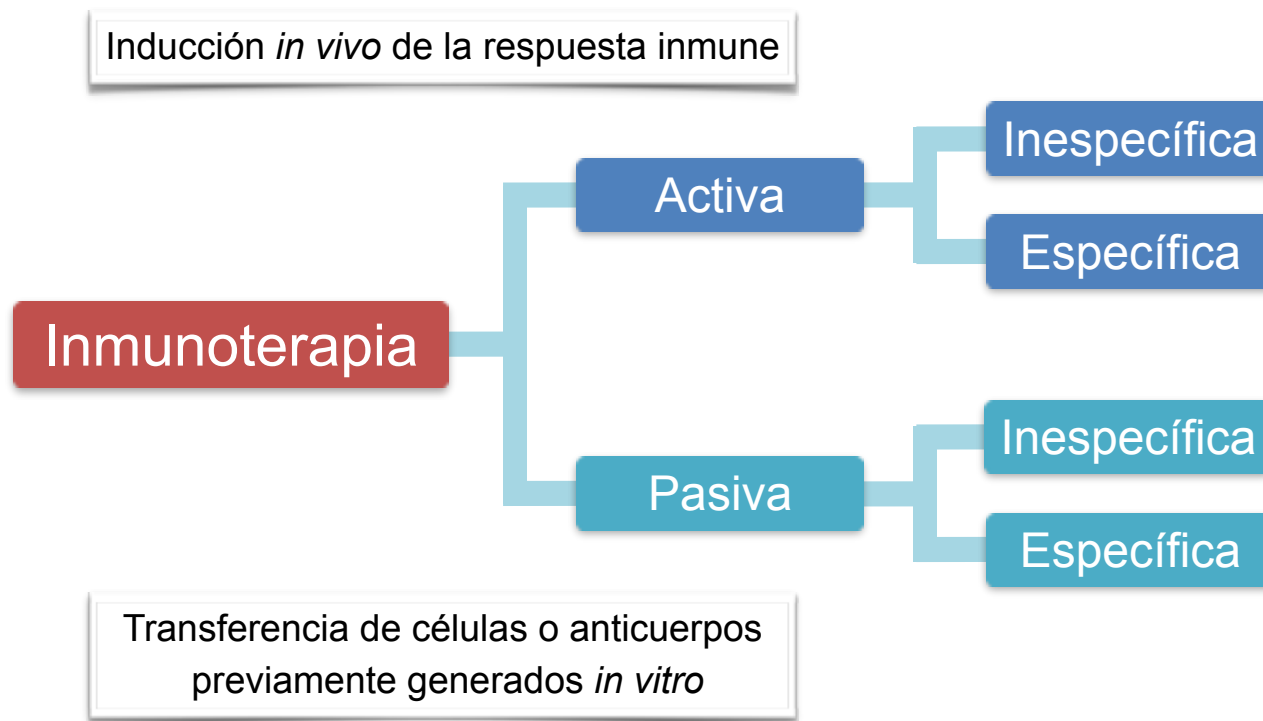


Inmunoterapia

- Estrategias de tratamiento para estimular o restaurar el sistema inmune frente al cáncer, infecciones y otras enfermedades
- Objetivo
 - profiláctico** (preventivo)
 - terapéutico** (curativo)



Tipos de Inmunoterapia



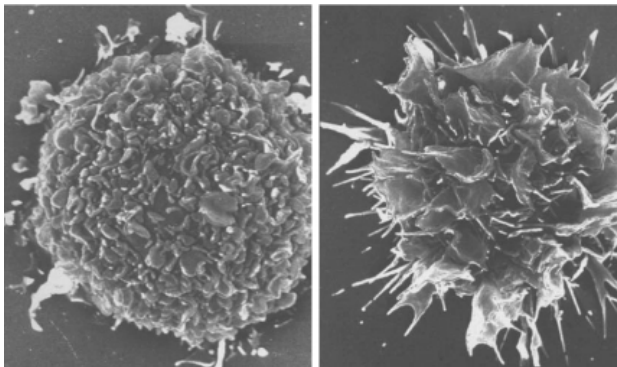
Mecanismos de acción en Inmunoterapia



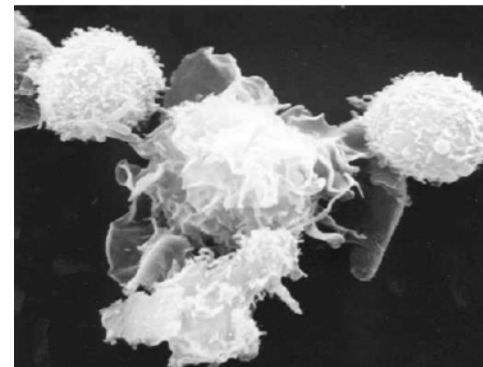
	Vacunas	ACT
Ventajas	Coste bajo Segura	Alta eficacia
Desventajas	Baja eficacia	Caro Toxicidad potencial Requiere tiempo
Otros	Aumenta eficacia en tratamiento temprano	Puede administrarse en patología avanzada

Células dendríticas

- Células presentadoras de antígenos (APC)
- < 2% de las CMN de SP
- Diferentes tipos según la expresión de marcadores y funciones.
- Elevada expresión de Ag MHC clase II
- Ausencia de marcadores de linaje
- Fenotipo variable según estado de maduración y activación
- Presentan moléculas de adhesión común con los monocitos y macrófagos
- Plasticidad funcional: respuesta inmunitaria o tolerogénica
- Respuestas inmunitarias altamente específicas
- Pueden generarse in vitro para aplicación clínica (GMP)



Immature dendritic cells (left) that capture antigen extend processes and mature into APCs (right).
COURTESY OF GEROLD SCHULER AND NIKOLAUS ROMANI
Vol. 204, No. 10, October 1, 2007;2245-2248



Célula dendrítica interactuando con linfocitos
Antigen Presentation Research Group (APRG)
Imperial College London

Células dendríticas (II)

CDs Immunogénicas

Cáncer
Melanoma
Colon
Mama
Próstata
Glioma
Enfermedades infecciosas (HIV)

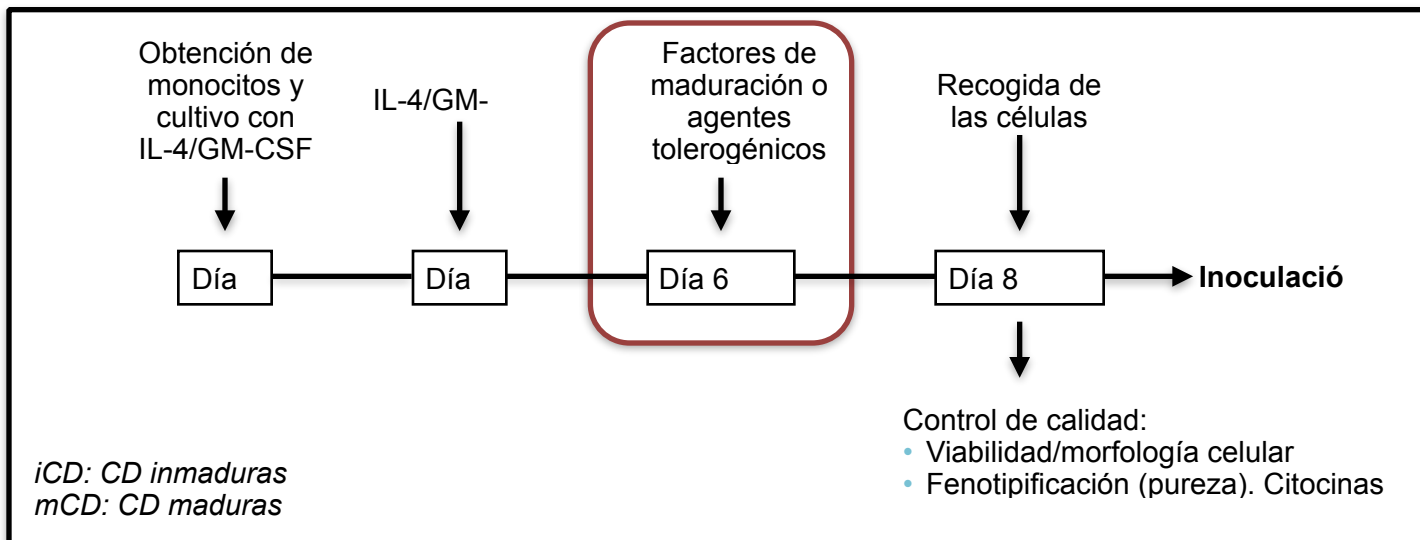
CDs Tolerogénicas

Alergia
Evitar rechazos en trasplantes
Autoinmunidad (EM, DM, AR)
Enfermedades de base inmune
(EII, Psoriasis, Lupus)

TABLA I. Compuestos utilizados en la generación de células dendríticas tolerogénicas.

- Agentes inmunosupresores o antiinflamatorios:
 - Corticosteroides (dexametasona)
 - Vitamina D3
 - Ácido micofenólico
 - Rapamicina
- Compuestos químicos:
 - AMPc
 - Prostaglandinas
 - Histamina
 - Neuropeptidos
- Citocinas antiinflamatorias:
 - rhIL-10
 - TGF- β

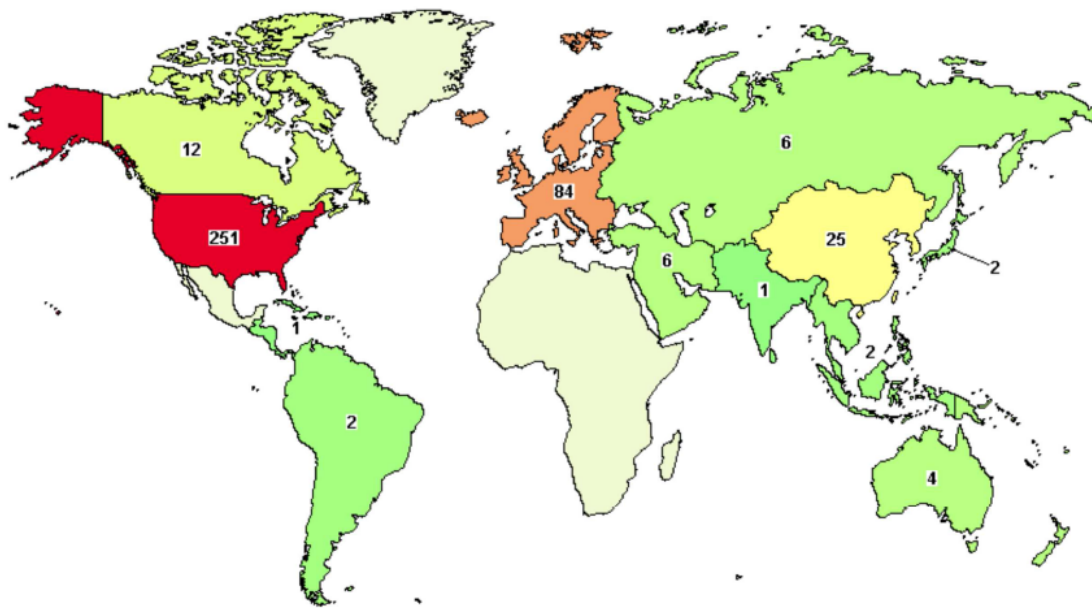
Obtención de células dendríticas a partir de monocitos



Ensayos Clínicos con Células Dendríticas

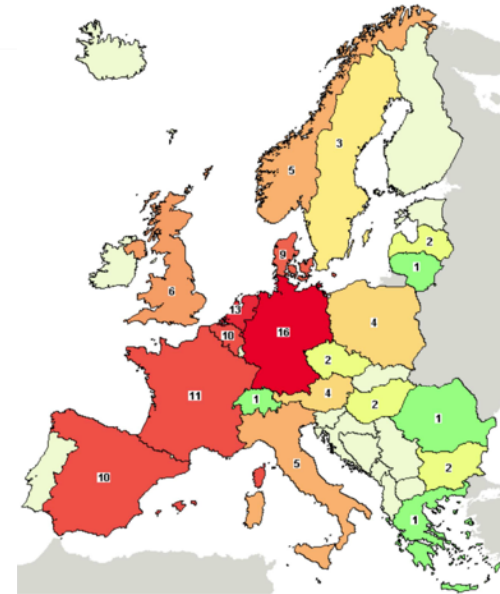
389 ensayos

Source: www.clinicaltrial.gov (19SEP2014)



Colors indicate number of studies with locations in that region
Least  Most
Labels give exact study count

Source: <http://ClinicalTrials.gov>



Terapia Celular Adoptiva en Infecciones Virales

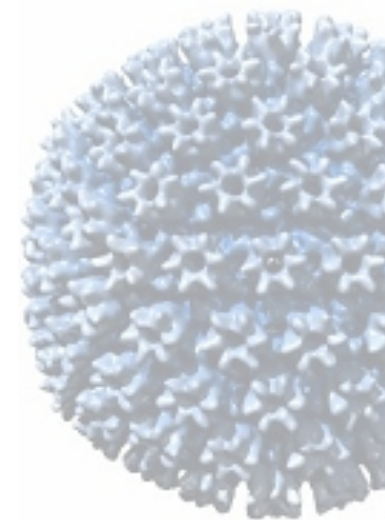
Papel **pivotal** de los Linfocitos T

Infecciones víricas post trasplante

- Reconstitución inmune retardada por tratamiento inmunosupresor / depleción de linfocitos T
- Elevada morbi / mortalidad
- Patógenos: CMV, EBV, ADV, BK, VZV
- Relevancia del estatus serológico Donante/Receptor

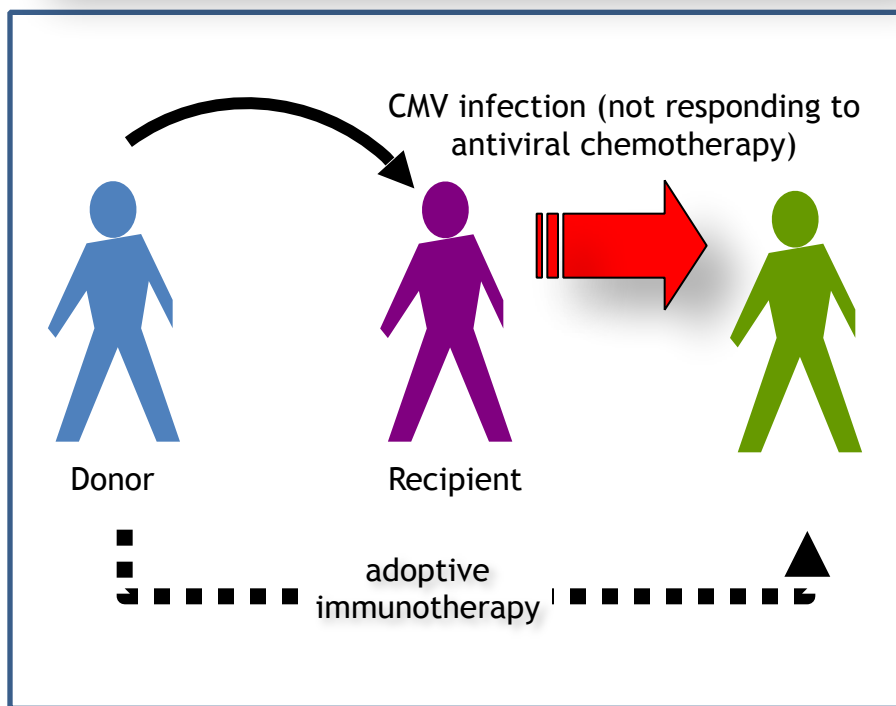
Indicación

- Reconstitución inmunidad antiviral
- Tratamiento de infecciones virales activas

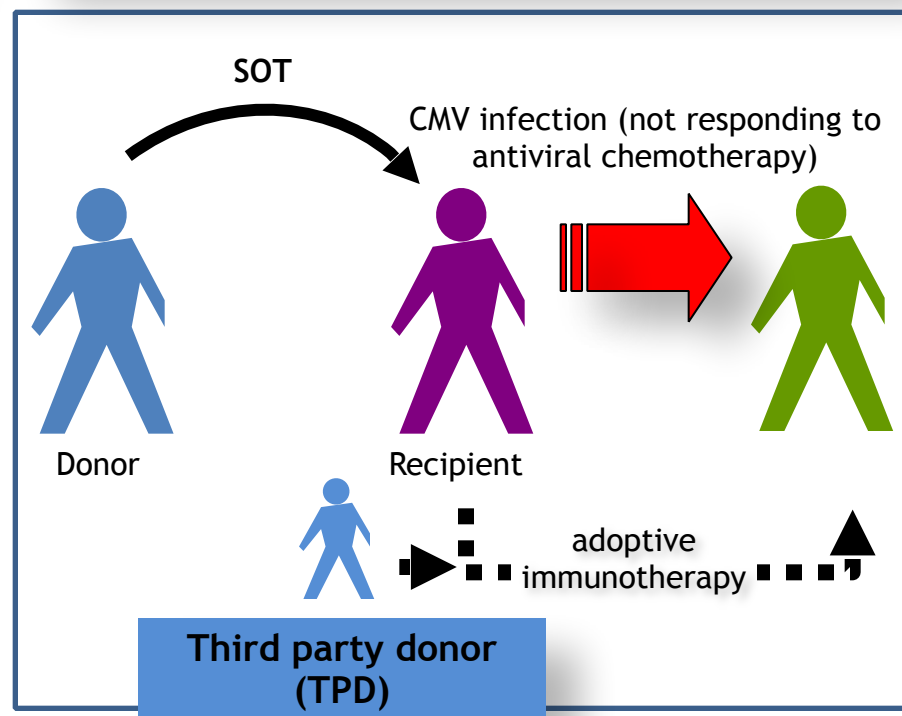


Contexto para la Inmunoterapia Adoptiva contra CMV

Trasplante de progenitores hematopoyéticos (HSCT) de donante disponible seropositivo



Trasplante de Órganos Sólidos (SOT) SCU, Donante seronegativo



Citomegalovirus (CMV)

- Infección de mas del 50% de la población
- Tras la primera infección (generalmente silente en inmunocompetentes) se produce una infección crónica controlada por la inmunovigilancia
- La reactivación del CMV es una causa mayor de morbimortalidad tras un trasplante hematopoyético
- Toxicidad, resistencia y reactivación de virus tardía con el uso de antivirales.
- Relevancia del estatus serológico:

human cytomegalovirus (HCMV) virion
EMD-5696

Dai XH, Yu XK, Gong H, Jiang XH, Abenes G, Liu HR, Shivakoti S, Britt W, Zhu H, Liu FY, Zhou ZH

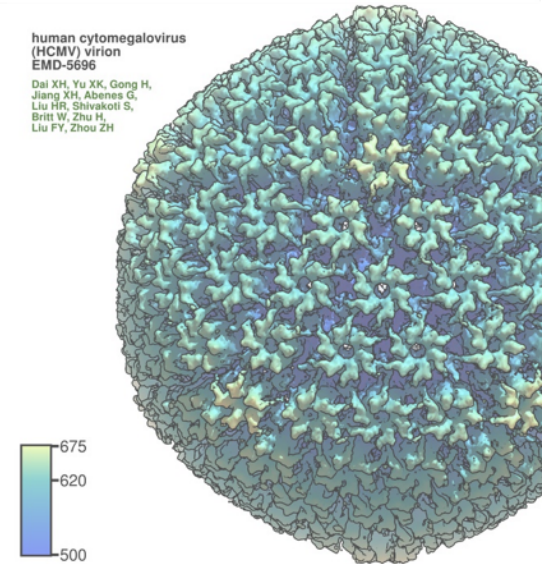


Table 1. Characteristics of allogeneic HSCT cohort, cumulative CMV reactivation, and crude incidence rates to day +100, DFCI/BWH April 2000-June 2004

Characteristic	No.	CMV reactivation*	%	P	Days after HSCT†	IR (95% CI)‡	IRR (95% CI)§
Cohort	606	225	37.1	—	45064	0.499 (0.438-0.569)	—
CMV serostatus				< .001			
CMV D-/R-	246	45	18.3		20982	0.215 (0.160-0.287)	1
CMV D+/R-	115	36	31.3		8881	0.405 (0.292-0.562)	1.89 (1.19-3.00)
CMV D+/R+	110	55	50.0		7289	0.755 (0.579-0.983)	3.52 (2.33-5.34)
CMV D-/R+	135	89	65.9		7912	1.130 (0.914-1.390)	5.25 (3.63-7.68)

- Riesgo



+ Riesgo

Marty *et al.* (2007) *Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis.* Blood 110(2): 490-500.

Terapia celular adoptiva en infección por CMV: Requerimientos

Donante:

- Serología negativa (HIV I/II, VHB, VHC, Lúes)
- Seropositivo para el CMV
- Test de estimulación positivo ($\geq 1\%$ de los Linfocitos totales deben ser susceptibles de producir IFN- γ frente a la estimulación correspondiente)
- Pueda ser candidato a aféresis

Receptor:

- Sin esteroides o a dosis bajas ($< 20\text{mg/d}$)
- Sin tratamientos linfólícticos
- Sin otras infecciones graves activas

Metodología

- Obtención de CMNs
- Estimulación de LT específicos contra CMV consiguiendo secreción de IFN- γ
- Captura de células productoras de IFN- γ
- Marcaje magnético de estas células
- Expansión / selección de linfocitos productores de IFN- γ
- Concentración y acondicionamiento del producto
- Controles de calidad

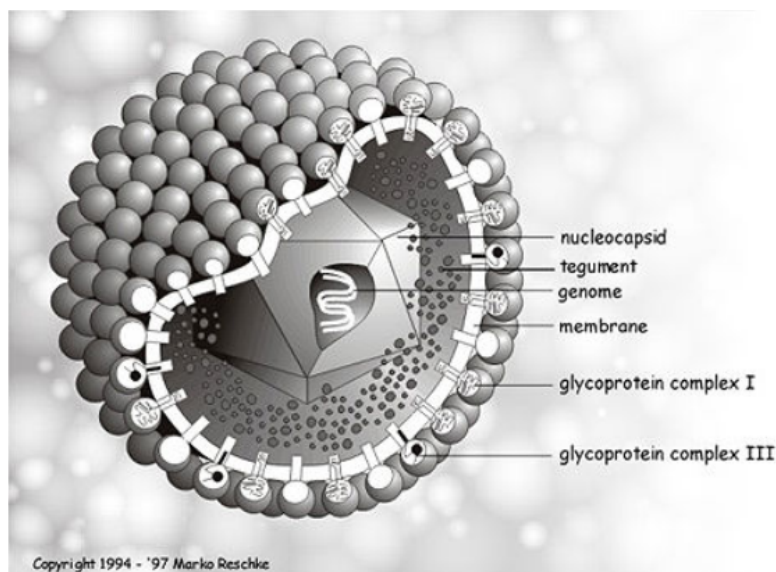
Métodos de estimulación

- Stimulations using CMV-infected fibroblasts or EBV-infected B cell lines (potential biological risk) (Virus inactivados o lisado de virus)
- Genetically modified APCs
- CMV antigen-pulsed DCs
- CMV peptide-pulsed dendritic cells (DCs)
- CMV antigen-pulsed PBMC (pp65)
- CMV peptide-pulsed PBMC (Peptivator®)



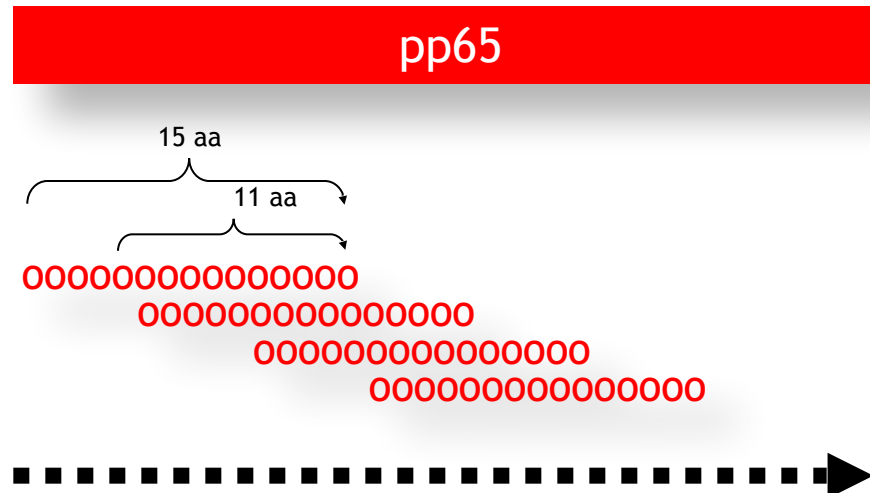
Proteína pp65 (65 kDa)

- Proteína del tegumento
- Target inmunodominante de las células CD4+ y CD8+ en su respuesta contra el CMV
- Las Cel T pp65-específicas producen citocinas como IFN- γ , IL-2, y TNF- α



PepTivator®

- Pool de péptidos que consisten básicamente en fragmentos de 15-mer con un solapamiento (“overlapping”) de 11 aminoácidos, logrando cubrir la secuencia completa del antígeno
- Útil para la estimulación *in vitro* de células CD4+ y CD8+ específicas de antígeno
- No es HLA restrictivo (I-II)
- GMP

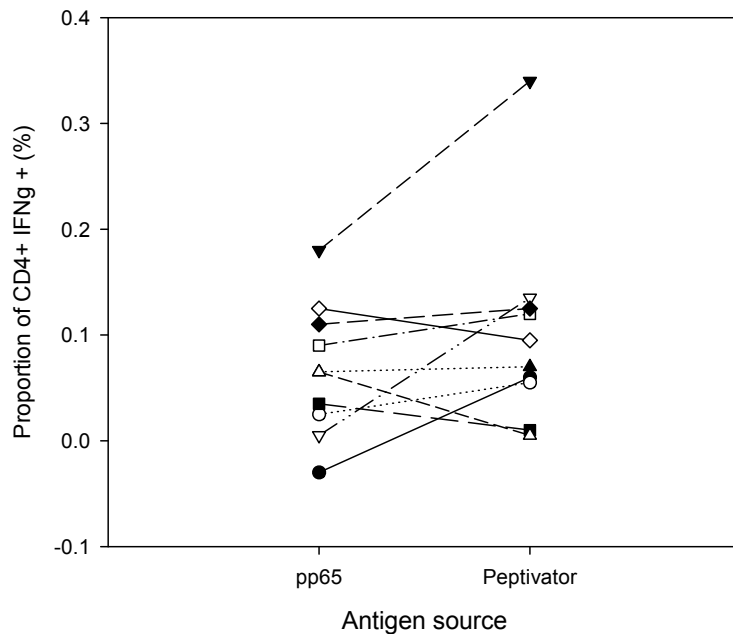


Activación de LT específicos contra CMV

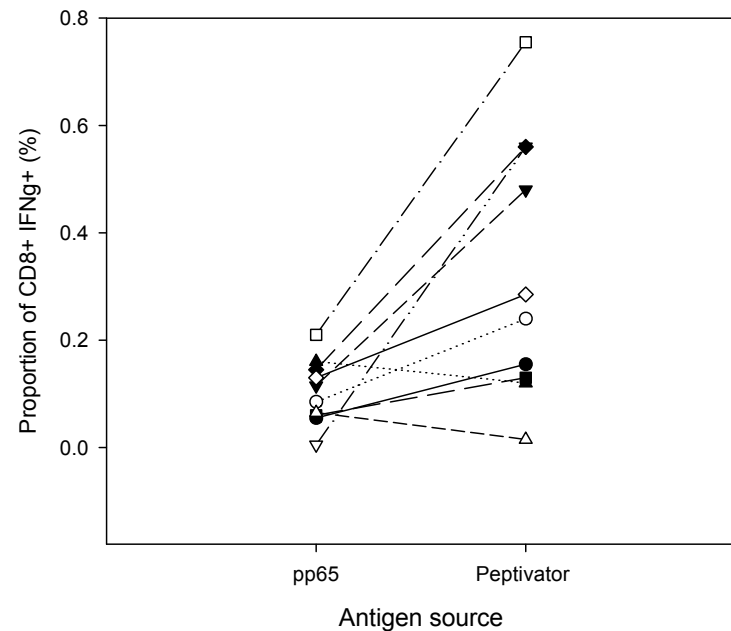
pp65 vs PepTivator®

Los sujetos sanos seropositivos para CMV presentan en SP células CD4+ y CD8+ específicas

Frequency of specific CMV CD4+ cells
in healthy subjects (n=10)



Frequency of specific CMV CD8+ cells
in healthy subjects (n=10)



Metodología

- Obtención de CMNs
- Estimulación de LT específicos contra CMV consiguiendo secreción de IFN- γ
- Captura de células productoras de IFN- γ
- Marcaje magnético de estas células
- Expansión / selección de linfocitos productores de IFN- γ
- Concentración y acondicionamiento del producto
- Controles de calidad

Estrategias de expansión / selección

Expansión: *In vitro / In vivo*

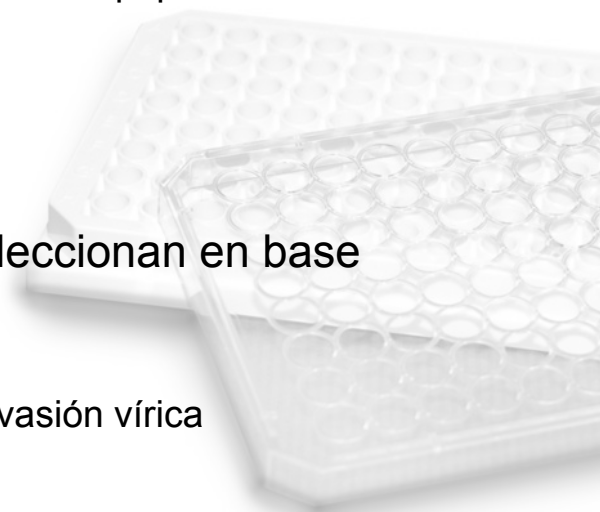
Selección:

Selección multímera: Las células T reactivas a un péptido inmunogénico son seleccionadas mediante un **péptido multímero** cargado magnéticamente

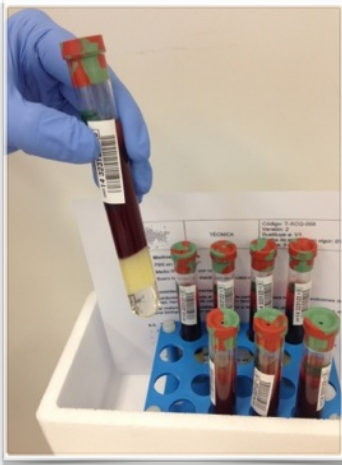
- Requiere un donante con un alto porcentaje de cel T reactivas al péptido viral
- Requiere un elevado volumen de sangre o una aféresis
- Restringida a ciertos tipos de HLA
- Riesgo de evasión vírica
- Evita el uso de APC

Captación de IFN- γ : Las células estimuladas se seleccionan en base a la **expresión de IFN- γ**

- No restricción HLA
- Contiene CD4+ y CD8+, disminuyendo la probabilidad de evasión vírica
- Requiere un elevado volumen de sangre o una aféresis



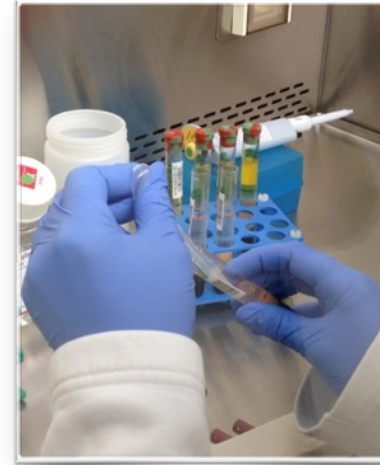
CliniMACS cytokine capture system: Test de estimulación y obtención de LT-CMV



Tubos CPT



Centrifugación



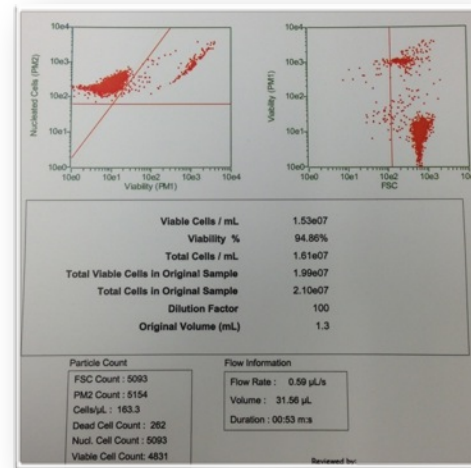
Obtención de las células



Lavado



**Contador
Guava**



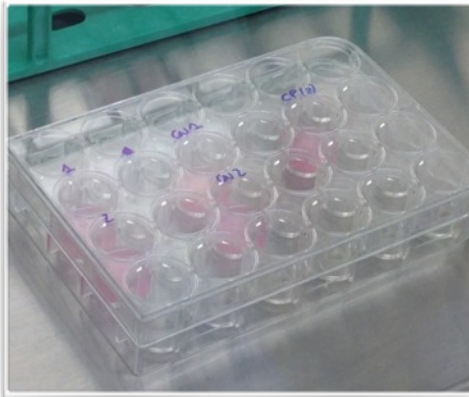
**Recuento de
CMN basal**

CliniMACS cytokine capture system:

Test de estimulación y obtención de LT-CMV (II)



PepTivator



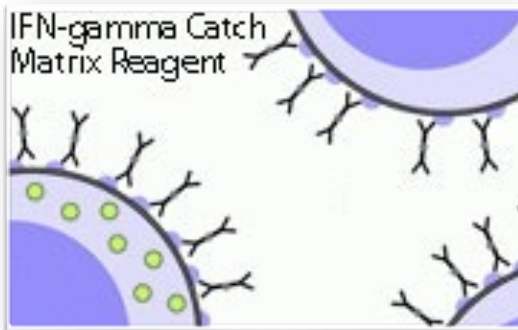
Muestras, CP y CN



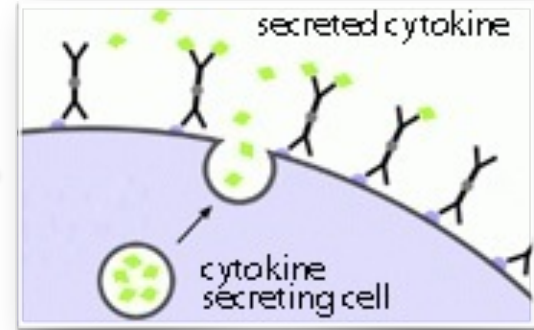
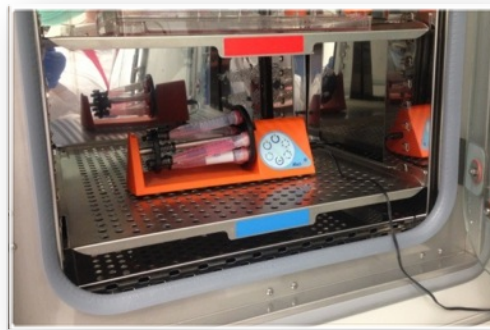
Incubación a 37° C (4h)



Célula T activada



Catch reagent

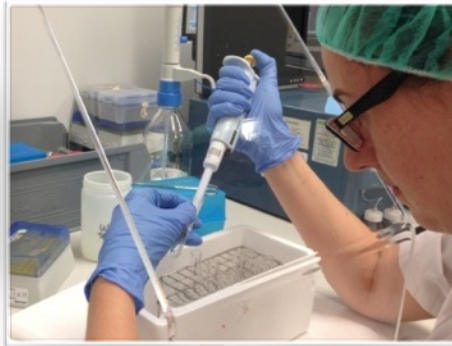
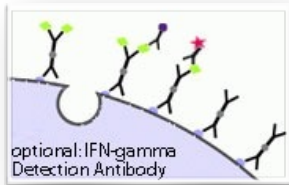


CliniMACS cytokine capture system:

Test de estimulación y obtención de LT-CMV (II)

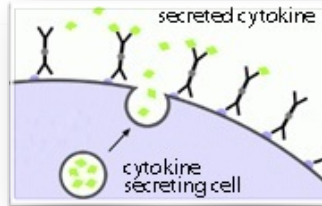
Test de estimulación

Marcado con fluorocromo



Citometría

**Positivo si
%CD4+INFg+ +
%CD8+INFg+
> 0,1%**

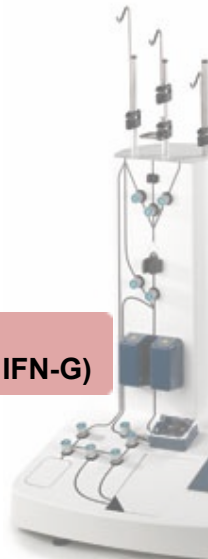


Obtención del producto final

Marcado con anti-INF-gamma microbeads (Magnetic enrichment)

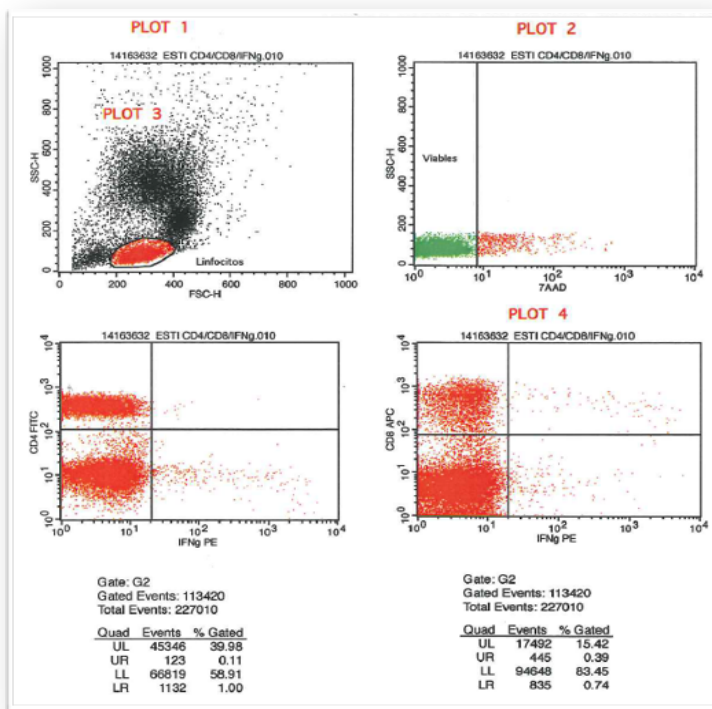


**Captura
(selección inmunomagnética de células secretoras de IFN-G)**

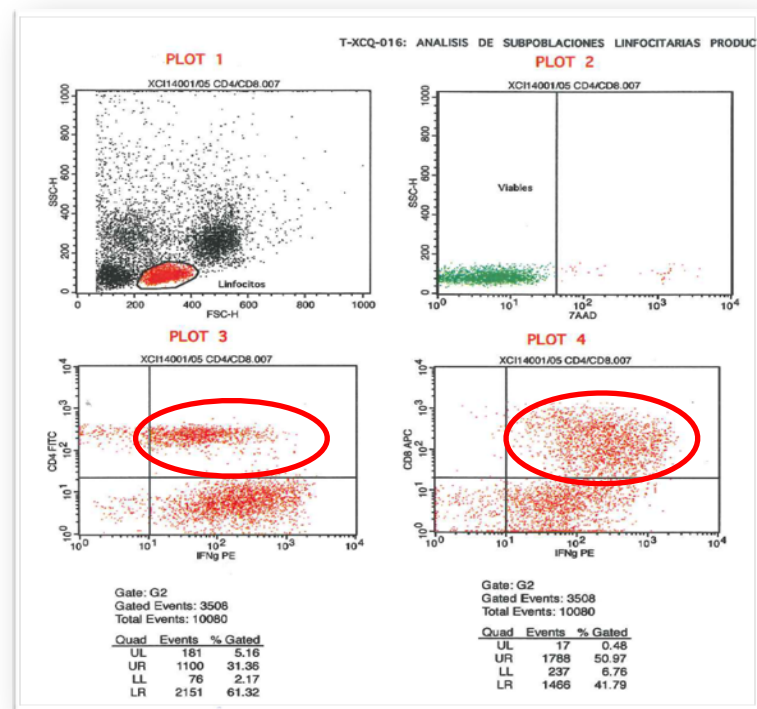


Test de estimulación

TEST DE ESTIMULACIÓN



PRODUCTO FINAL (Estimulado y seleccionado)



Certificado de liberación

Provisional

Ensayo	Especificaciones	Resultado	Dictamen
Recuento	$\leq 5 \times 10^4$ Linfocitos T/Kg de paciente	4.9×10^4 Linfocitos T/Kg de paciente	Conforme
Viabilidad	≥ 70 %	98.7%	Conforme
Fenotipo	≥ 20 % Linfocitos T específicos (Productores de IFNg)	82.3%	Conforme
Endotoxina	≤ 0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	Conforme
Tinción de Gram	Negativo	Negativo	Conforme
Micoplasma	Negativo	Pendiente	Pendiente
Esterilidad	Estéril	Pendiente	Pendiente
Control de partículas del entorno productivo	Según Anexo 1 de la Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos	No se dispone de la totalidad	Pendiente
Control microbiológico ambiental	Según Anexo 1 de la Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos	No se dispone de la totalidad	Pendiente

Definitivo

Ensayo	Especificaciones	Resultado	Dictamen
Recuento	$\leq 5 \times 10^4$ Linfocitos T/Kg de paciente	4.9×10^4 Linfocitos T/Kg de paciente	Conforme
Viabilidad	≥ 70 %	98.7%	Conforme
Fenotipo	≥ 20 % Linfocitos T específicos (Productores de IFNg)	82.3%	Conforme
Endotoxina	≤ 0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	Conforme
Micoplasma	Negativo	Negativo	Conforme
Esterilidad	Estéril	Estéril	Conforme
Control de partículas del entorno productivo	Según Anexo 1 de la Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos	Conforme	Conforme
Control microbiológico ambiental	Según Anexo 1 de la Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos	Conforme	Conforme

Seguimiento del paciente en estudio CMV

Infusión LT-CMV	Control
Hasta el día +30	Cada 7d.
Día +30 a día +60	Cada 14d.
+60 hasta 6m.	Cada 28d.

Test cualitativo: Quantiferon®

Test cuantitativo: Subpoblaciones específicas anti-CMV

CliniMACS Cytokine Capture System: Pros y Contras

PROS	CONTRAS
Rápido	Requiere activación in vitro
No HLA-restrictivo	Dificultad de la técnica
Células T CD4 y CD8	Coste elevado
Posibilidad de Multiantígeno	Requerimientos regulatorios (GMP)



Estrategias futuras para prevenir o tratar infecciones post TPH

- Generación de Linfocitos T con **dianas múltiples**, incluyendo CMV, EBV y ADV. Posibilidad de incluir VZV y Aspergillus
 - Generados a partir del donante
 - De donantes "third party" / posibilidad creación de bancos HLA compatibles
- Estimulación y expansión in vitro de **Linfocitos T naïve**
- **Vacunación** del donante de progenitores hematopoyéticos
- Infusión **diferida** de LT CD4 del donante
- Infusión de LT del donante **deplecionados** de células aloreactivas

Hanley PJ et al. Cytotherapy. 2011
Jedema I et al. Haematologica 2011
Hanley PJ et al Blood 2009;114:1958-1967.

Ensayo Clínico DLI

Infusión profiláctica de linfocitos de donante en trasplante de sangre de cordón

Producto en investigación: Fracción 20% de la unidad de SCU trasplantada

Indicación: Leucemias agudas de alto riesgo

Promotor y Banco de Cordón: Banc de Sang i Teixits

IP: Dr. Sergi Querol

Centros: 4 centros, 6 Servicios (4 adultos; 2 pediátricos)

- Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona)
- Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)
- ICO, Hospital Duran i Reynals (Hospitalet de Llobregat, Barcelona)
- ICO, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona)

Estado: iniciado

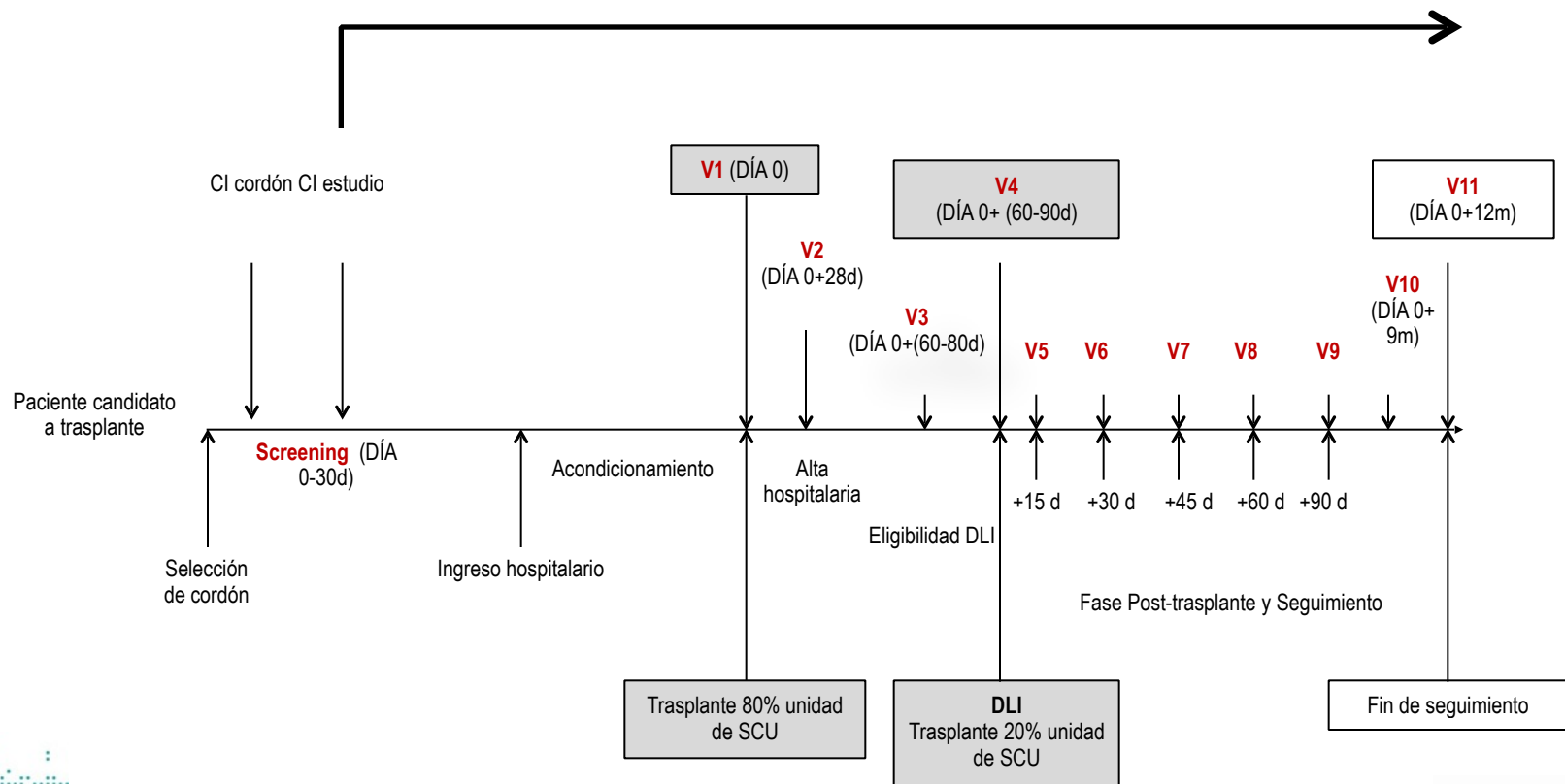
Diseño Experimental

Diseño: Estudio piloto, multicéntrico, abierto y de un solo brazo de tratamiento

Pacientes: 20 pacientes afectados de leucemia aguda de alto riesgo

Objetivos: evaluar la seguridad y eficacia según reconstitución inmune

Tratamiento: SCU U80 + DLI profiláctica (SCU U20) entre día 60 y 90 postrasplante.



Objetivos

Objetivo principal

Evaluar la seguridad de esta aproximación terapéutica mediante:

- Evaluación clínica de los efectos inmediatos de la infusión
- Análisis de la enfermedad injerto contra huésped post-DLI

Objetivos secundarios

Velocidad y diversidad de la reconstitución inmune hasta los 12m. post-trasplante

Incidencia y tipo de infecciones

Incidencia de recaídas

Curvas de supervivencia



Variables de Valoración

Variables principales de valoración

Evaluación de la seguridad mediante:

- Exploración física, constantes vitales y AA
- Incidencia y grados de EICH en los pacientes del estudio a partir de la DLI y hasta los 12 meses post-trasplante

Variables secundarias de valoración

Evaluación de la eficacia mediante:

- Reconstitución T y subpoblaciones CD4 y CD8
- Reconstitución de las células NK
- Reconstitución células células B
- Respuesta antigénica específica de las células T a aloantígenos, antígenos tumorales y antígenos infecciosos
- Incidencia y tipo de infecciones
- Incidencia de recaídas
- Mortalidad precoz y tardía

Supervivencia global y libre de enfermedad

Crterios de Inclusi3n

En el momento del trasplante:

- Pacientes < 60a. con propuesta de trasplante de sangre de cord3n seg3n protocolo asistencial
- Diagn3stico de leucemia aguda de alto riesgo con indicaci3n de trasplante alog3nico
- Bolsa de sangre de cord3n congelada en fracciones, una con el 80% del producto y la otra con el 20%
- Presencia de al menos 1.2E9 c3lulas nucleadas totales y >1E5 CD34/kg y >6E6 CD34+ en la fracci3n del 80%
- Compatibilidad 4/6 o mejor tomando HLA-A, HLA-B por resoluci3n antig3nica y DRB1 por resoluci3n al3lica
- El paciente (o representante legal, si precisa) ha firmado el consentimiento Informado

En el momento de la DLI:

- Injerto documentado de la sangre de cord3n
- El paciente no ha presentado EICH durante los primeros 60 d3as post-trasplante o, en caso de presentarlo, reciba menos de 10mg de prednisona en el momento de la DLI o < de 0,2 mg/kg/dia de prednisona para pacientes pedi3tricos (<16 a3os).
- El paciente presente menos de 200 c3lulas CD4+ por microlitro de sangre perif3rica a los 60d. (± 7 d.) post-trasplante
- El paciente (o representante legal, si precisa) ha firmado el consentimiento Informado

Criterios de Exclusión

En el momento del trasplante:

- Participación simultánea en otro ensayo clínico o tratamiento con otro producto en fase de Investigación en los 30d. previos a la inclusión en el estudio
- Mujeres embarazadas, que pretenden estarlo en los siguientes 12 meses a la firma del consentimiento informado o que no tomen medidas anticonceptivas adecuadas según criterio del investigador
- Mujeres en periodo de lactancia
- Otras patologías o circunstancias que puedan comprometer la participación del paciente en el estudio según criterio del investigador

En el momento de la DLI:

- EICH grado III-IV tras el alotrasplante de SCU
- Tratamiento con prednisona (>10mg totales por día en adultos o > de 0,2 mg/kg/día de prednisona para pacientes pediátricos)

Seguimiento estudio

Pacientes esctrinados	3
Pacientes incluídos	2
Pacientes tratados DLI	0



**Muchas gracias
por su atención**

MÁSTER UNIVERSITARIO EN MEDICINA TRANSFUSIONAL Y TERAPIAS CELULARES AVANZADAS



Master's degree in Transfusion Medicine
and Advanced Cell Therapies



CÀTEDRA DE MEDICINA TRANSFUSIONAL
i TERÀPIA CEL·LULAR i TISSULAR



Fundació Doctor Robert
UAB



BANC DE SANG
I TEIXITS



Universitat Autònoma
de Barcelona

- Máster de 2 años
- 100% online
- Acreditado por la Universitat Autònoma de Barcelona y reconocido en todo el mundo.
- Línea en inglés y línea en español

**ABIERTO PERÍODO DE INSCRIPCIÓN HASTA
12 DE OCTUBRE DE 2014**

Más información: www.emtact.eu