

Improved collection of hematopoietic stem cells and progenitors from Fanconi anemia patients for gene therapy purposes

Julián Sevilla,^{1,2,16} Susana Navarro,^{2,3,4,16} Paula Rio,^{2,3,4,16} Rebeca Sánchez-Domínguez,^{2,3,4} Josune Zubicaray,^{1,2} Eva Gálvez,^{1,2} Eva Merino,^{1,2} Elena Sebastián,^{1,2} Carmen Azqueta,⁵ José A. Casado,^{2,3,4} José C. Segovia,^{2,3,4} Omaira Alberquilla,^{2,3,4} Massimo Bogliolo,^{2,6,7} Francisco J. Román-Rodríguez,^{2,3,4} Yari Giménez,^{2,3,4} Lise Larcher,¹⁰ Rocío Salgado,⁴ Roser M. Pujol,^{2,6,7} Raquel Hladun,⁸ Ana Castillo,⁹ Jean Soulier,¹⁰ Sergi Querol,⁵ Jesús Fernández,⁵ Jonathan Schwartz,¹¹ Nagore García de Andoín,¹² Ricardo López,¹³ Albert Catalá,^{2,14,15} Jordi Surrallés,^{2,6,7} Cristina Díaz-de-Heredia,^{2,8} and Juan A. Bueren^{2,3,4}

¹Servicio Hematología y Oncología Pediátrica, Fundación Investigación Biomédica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, 28029 Madrid, Spain; ³Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Avenida Complutense 40, 28040 Madrid, Spain; ⁴Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), 28040 Madrid, Spain; ⁵Banc de Sang i Teixits de Catalunya, 08005 Barcelona, Spain; ⁶Servicio de Genética e Institut de Reserca, IIB-Sant Pau, Hospital Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; ⁷Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain; ⁸Servicio de Oncología y Hematología Pediátrica, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; ⁹Análisis Clínicos Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain; ¹⁰Université de Paris, Institut de Recherche Saint-Louis, 75010 Paris, France; ¹¹Rocket Pharmaceuticals Inc., New York, NY 10118, USA; ¹²Hospital Universitario de Donostia, 20014 Donostia, Spain; ¹³Hospital de Cruces, 48903 Bilbao, Spain; ¹⁴Department of Hematology/Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, 08950 Barcelona, Spain; ¹⁵Institut de Recerca Pediàtrica Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Difficulties in the collection of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) from Fanconi anemia (FA) patients have limited the gene therapy in this disease. We have investigated (ClinicalTrials.gov, NCT02931071) the safety and efficacy of filgrastim and plerixafor for mobilization of HSPCs and collection by leukapheresis in FA patients. Nine of eleven enrolled patients mobilized beyond the threshold level of 5 CD34⁺ cells/ μ L required to initiate apheresis. A median of 21.8 CD34⁺ cells/ μ L was reached at the peak of mobilization. Significantly, the oldest patients (15 and 16 years old) were the only ones who did not reach that threshold. A median of 4.27 million CD34⁺ cells/kg was collected in 2 or 3 aphereses. These numbers were markedly decreased to 1.1 million CD34⁺ cells/kg after immunoselection, probably because of weak expression of the CD34 antigen. However, these numbers were sufficient to facilitate the engraftment of corrected HSPCs in non-conditioned patients. No procedure-associated serious adverse events were observed. Mobilization of CD34⁺ cells correlated with younger age, higher leukocyte counts and hemoglobin values, lower mean corpuscular volume, and higher proportion of CD34⁺ cells in bone marrow (BM). All these values offer crucial information for the enrollment of FA patients for gene therapy protocols.

INTRODUCTION

Current hematopoietic gene therapy protocols rely on the *ex vivo* genetic modification of autologous hematopoietic stem and progenitor

cells (HSPCs) with either gammaretroviral or lentiviral vectors and, more recently, with gene editing constructs. Corrected cells are then re-infused into affected patients, in most cases after conditioning with cytotoxic drugs (see reviews by Naldini¹ and Morgan et al.²). The collection of clinically relevant numbers of HSPCs thus constitutes an initial critical step in the development of efficient hematopoietic gene therapy protocols.

In most of the hematopoietic diseases in which gene therapy has been evaluated to date, phenotypic defects are evident only in terminally differentiated cells or in committed progenitors but not in hematopoietic stem cells (HSCs). This implies that collection of significant HSPC quantities does not generally constitute a limiting factor in the gene therapy of affected patients.^{3,4} In patients with bone marrow failure (BMF) syndromes, the situation can be markedly different. In the particular case of Fanconi anemia (FA), it has been shown that FA

Received 21 February 2021; accepted 4 June 2021;
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.06.001>.

¹⁶These authors contributed equally

Correspondence: Julián Sevilla, Servicio Hematología y Oncología Pediátrica, Fundación Investigación Biomédica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain.

E-mail: julian.sevilla@salud.madrid.org

Correspondence: Juan A. Bueren, Hematopoietic Innovative Therapies Division, Centro de investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Avenida Complutense 40, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: juan.bueren@ciemat.es



Table 1. Main characteristics of Fanconi anemia patients enrolled in the FANCOSTEM-I clinical trial

Code	Sex	Ethnicity	Age (years)	Weight (kg)	% PB T cells with Chr breaks (DEB)	Compl. group	BM CFC survival (10 nM MMC)	Mutation 1 (FANCA)	Mutation 2 (FANCA)
01001	male	European/white	15	65.0	84	FA-A	11.8	Del exons 19–22	c.3348+A>G (intronic region exon 33)
01002	male	Roma/gypsy	16	42.0	84	FA-A	ND	c.295C>T (exon 4)	c.295C>T (exon 4)
01003	male	Roma/gypsy	3	10.0	64	FA-A	0.0	c.295C>T (exon 4)	c.295C>T (exon 4)
01005	male	Roma/gypsy	5	16.0	80	FA-A	0.0	c.295C>T (exon 4)	c.295C>T (exon 4)
02002	male	Roma/gypsy	3	17.0	80	FA-A	0.0	c.295C>T (exon 4)	c.295C>T (exon 4)
02003	male	European/white	3	9.0	66	FA-A	0.0	c.1858_1859insC (exon 21)	c.893+2T>C (intron 10)
02004	male	European/white	6	14.0	66	FA-A	3.9	c.1115_1118delTTGG (exon 13)	c.1115_1118delTTGG (exon 13)
02005	male	Roma/gypsy	4	17.0	74	FA-A	0.0	c.295C>T	c.295C>T
02006	male	European/white	5	13.9	64	FA-A	0.0	c.3788_3790delTCT (exon 38)	c.2851C>G (exon 29)
02007	female	European/white	7	18.0	72	FA-A	0.0	c.4130C>G exon 41	c.1115_1118delTTGG (exon 13)
02008	male	Middle Eastern	4	12.7	100	FA-A	0.0	c.3788_3790delTCT	arr[hg19]16q24.3 (89,804,013-89,896,981)x1

genes are ubiquitously expressed not only in mature cells or in committed progenitor cells but also in primitive HSCs.^{5,6} Moreover, because FA proteins participate in different pathways involved in cell proliferation, differentiation, and survival (see reviews in Ceccaldi et al.⁷ and Bagby⁸), reduced numbers of HSPCs have been observed in bone marrow (BM) of FA patients.^{9,10} Related to these observations, previous FA clinical trials have found serious obstacles to the collection of significant CD34⁺ cell numbers from either BM or peripheral blood (PB) utilizing granulocyte colony stimulating factor (G-CSF),^{10–13} confirming the importance of adequate HSPC collection as a critical step in FA gene therapy.

The combination of potent mobilization agents, specifically filgrastim and plerixafor, has enabled enhanced potential of HSPC collection from patients with poor HSC reserve.¹⁴ Our previous studies have shown that FA CD34⁺ cells mobilized to PB with these agents, and then genetically corrected via lentiviral transduction, can progressively engraft in immunodeficient mice¹⁵ and also, remarkably, non-conditioned FA patients.¹⁶ These studies demonstrated the efficacy of these drugs in the mobilization of hematopoietic repopulating cells in patients with FA.

Although HSC mobilization with filgrastim and plerixafor is now frequently used for the collection of HSPCs in gene therapy protocols, the safety and efficacy of the collection of HSPCs mobilized with these drugs in patients with FA had never been previously investigated. Here we report the results of the first clinical trial in which a specific mobilization regimen with filgrastim and plerixafor was used to collect CD34⁺ cells from FA patients. The proposed HSC mobilization with these agents should facilitate progressive development of safe and efficient protocols of FA gene therapy.

RESULTS

Patient characteristics

Thirteen FA-A patients, aged 3–16 years, were enrolled. Two patients were ineligible because the diepoxybutane (DEB) test showed that the proportion of PB T cells with chromosomal aberrations (24% and 5%, respectively) was below the threshold of 50% frequently utilized to distinguish FA patients from those with somatic mosaicism.¹⁷ The remaining eleven patients were finally included in the trial and received the HSPC mobilization treatment. The main characteristics of these patients are shown in Table 1. All these patients showed a high proportion of PB T lymphocytes with chromosomal breaks upon *in vitro* exposure to DEB, consistent with a characteristic FA diagnosis (see Table 1). BM colony forming cells (CFCs) were hypersensitive to mitomycin C (MMC). Only in the case of patient 01001 was a survival of 11.8% to 10 nM MMC observed, although no other parameters were consistent with somatic mosaicism in this patient (data not shown).

Basal PB parameters at screening (visit 0) determined in each of the eleven patients enrolled in the clinical trial are shown in Figure S1a. Although the inclusion criteria indicated that patients should fulfill at least two of the following criteria, hemoglobin (Hb) \geq 8 g/dL, neutrophils \geq 0.75×10^9 cells/L, and platelets \geq 30×10^9 cells/L (see gray lines in Figure S1a), all patients, with the exception of patient 02008, fulfilled all three criteria.

Aliquots of BM aspirates conducted at visit 0 were used to analyze the content of CD34⁺ cells, CD34⁺/CD38⁻ cells, and CFCs. As shown in Figure S1b, patients 02002 and 02005 were those with the highest proportion of CD34⁺ cells (1.44% and 1.38%, respectively) and total concentration of CD34⁺ cells in BM (545 and 276 CD34⁺ cells/ μ L BM,

Table 2. Summary of the adverse events of the FANCOSTEM clinical trial

	N (patients)	%
Drug-related AEs		
Any drug-related adverse event	7	63.6
Abdominal pain	2	18.2
Vomiting	2	18.2
Fever	2	18.2
Nausea	1	9.1
Local pain at administration site	1	9.1
Anemia	1	9.1
Pruritus	1	9.1
Total AEs		
Any adverse event	9	81.8
Abdominal pain	3	27.3
Pain at central venous line access	3	27.3
Fever	2**	18.2
Vomiting	2	18.2
Anemia	2*	18.2
Tachycardia	2	18.2
Nausea	1	9.1
Pain at administration site	1	9.1
Bleeding at central venous line access	1	9.1
Throat pain	1	9.1
Pleural effusion	1	9.1
Hypotension	1	9.1
Pruritus	1	9.1
Headache	1	9.1

The table summarizes both the filgrastim- and/or plerixafor-related adverse events as well as the total adverse events. Adverse events are reported as the number and percentage of patients affected. Patients could experience more than one adverse event.

All adverse events were graded mild except: *one moderate and the other one severe; **one case graded moderate.

respectively). Compared to BM samples from healthy donors (HDs), the intensity of expression of the CD34 antigen in BM cells from patients included in the trial was significantly lower (see mean fluorescence intensity [MFI] values in [Figure S2](#)), suggesting their reduced content in primitive HSCs.^{18,19}

Safety studies

Patient 01002 was treated with filgrastim and the four doses of plerixafor that permitted the clinical trial. Nevertheless, no apheresis procedures could be performed in this patient since CD34⁺ cell counts never reached the threshold of 5 CD34⁺ cells/ μ L PB. Patient 01001 did not receive the 4th plerixafor dose because of the inefficacy of the previous three doses. Among the other nine patients, four patients received three doses of plerixafor and underwent three apheresis procedures, whereas the other five patients received two doses of plerixafor and two aphereses were carried out. Decisions to continue

mobilization, and the subsequent leukapheresis procedures, were based on a careful risk/benefit assessment for each patient.

Twenty-two adverse events (AEs) were observed throughout the study. However, no serious adverse events (SAEs) related to the procedure have been observed in any of the eleven patients who received the HSPC mobilization regimen. All patients but one required platelet transfusion (median of 1 platelet transfusion; range 0–2), either for catheter placement or during intervals between the leukapheresis procedures. Additionally, all patients who underwent leukapheresis received at least one packed red blood cell transfusion (median 3, range 1–4). A summary of the AEs is shown in [Table 2](#). Six patients (55.5%) reported drug-related AEs previously associated with filgrastim or plerixafor administration. The most frequent of these were abdominal pain, vomiting, and fever, each of which was reported in two patients. When all AEs were considered (not only those related to mobilization agents), abdominal pain and pain at the catheter site were the most frequent ones. All but one of the AEs were mild and have been frequently associated with these agents and with HSPC collection procedures in children.²⁰ Of interest, none of the collection procedures had to be prematurely interrupted because of patient AEs. The median number of blood volumes processed on the first, second, and third collection days were 4.25 (3.25–5.19), 4.88 (3.25–6.07), and 3.79 (3.33–4.86), respectively ([Table S1](#)). Although these blood volume numbers were quite large, no clinically relevant AEs related to metabolic changes or anticoagulation were observed.

Blood cell counts and Hb levels determined during the 1 year of follow-up, and also prior to the recruitment, are presented in [Figure S3](#). Because three patients were withdrawn from the FANCOSTEM-I trial immediately after CD34⁺ cell collection in order to receive treatment on the accompanying gene therapy clinical study, this figure represents the six patients who completed the mobilization, collection, and follow-up in the absence of infusion of gene-corrected HSPCs. As shown in this figure, no evident changes in any of the PB parameters were observed as a consequence of collection of mobilized HSCs. Moreover, no statistical differences in any of these parameters or in the number of BM CD34⁺ cells were observed at the end of the follow-up period compared to analyses performed at screening (data not shown). Cytogenetic studies as well as comparative genomic hybridization (array CGH) and next-generation sequencing analysis (NGS) of a myeloid malignancy-associated gene panel were performed at screening visit and at the end of the follow-up. A BCOR variant below the usual threshold of detection was detected at screening visit for patient 02008. None of the studies mentioned above showed significant abnormalities 12 months after mobilization in this series.

Analysis of the efficacy of filgrastim and plerixafor to mobilize HSPCs in FA patients

The HSC mobilization protocol shown in [Figure 1A](#) induced a progressive increase in PB leukocytes subsequent to the first administration of filgrastim ([Figure 1B](#)). More significantly, in nine out of the

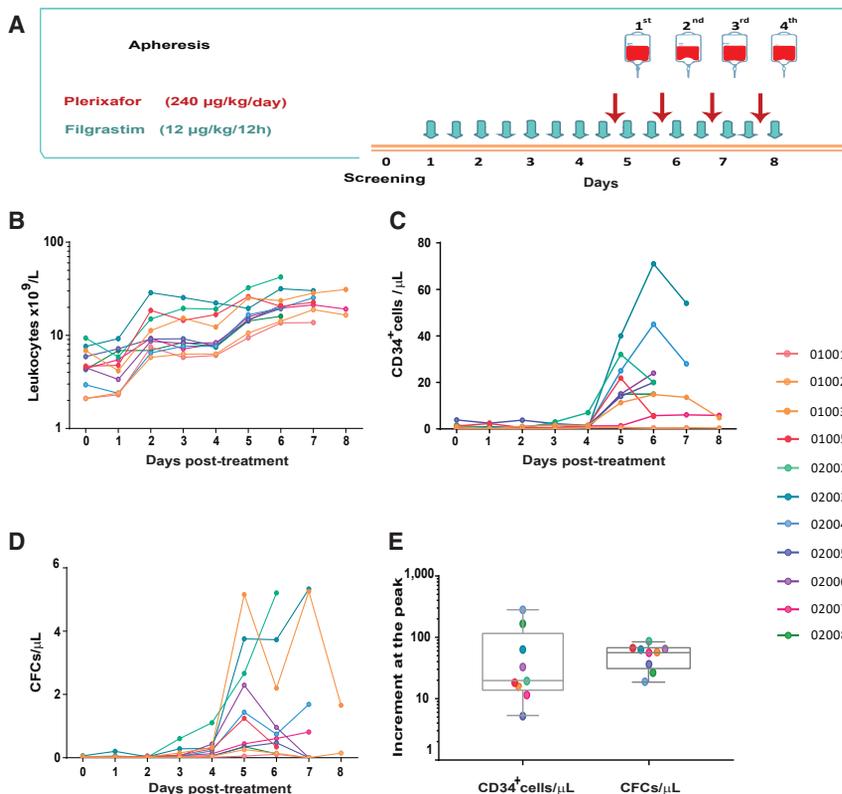


Figure 1. HSPC mobilization induced by filgrastim and plerixafor in patients with Fanconi anemia

(A) Schematic representation of the CD34⁺ cell mobilization protocol based on the subcutaneous injection of filgrastim (twice daily; 12 μg/kg/12 h for up to 8 days) and plerixafor (240 μg/kg body weight/day; up to 4 doses). After each administration of plerixafor, CD34⁺ cell numbers were determined, and aphereses were initiated when numbers were higher than 5 CD34⁺ cells/μL PB. (B–D) kinetics of PB leukocytes, CD34⁺ cells, and CFCs, respectively, at different time points after administration of the mobilizing drugs. (E) increment of CD34⁺ cells and CFCs at the peak of mobilization compared to basal numbers determined at visit 0. Data corresponding to each of the treated patients are represented by a different color according to the ID indicated in the figure.

when the proportions of HSPCs were considered, no statistical differences were found among the different apheresis procedures (Figure S4).

Immunoselection of PB HSPCs after mobilization with filgrastim and plerixafor

Numbers of CD34⁺ cells obtained in the immunoselected samples were on average 4 times lower than numbers corresponding to the apheresis collections (Figure 2B), a median value of 1.10×10^6 CD34⁺ cells/kg (range 0.34 to 5.06×10^6 CD34⁺ cells/kg) compared to the median value of 4.27×10^6 CD34⁺ cells/kg obtained prior to immunoselection. This low yield of CD34⁺ cells obtained in the immunoselection process was associated to the low expression of the CD34 antigen in FA CD34⁺ cells (Figure S2b). CD34⁺ cell purities and other characteristics of the different immunoselected products are shown in Figure S5. In terms of purity, the median percentage of CD34⁺ cells was 25.3%, with a wide range of 4.2% to 80.0% due to the different purification processes used in four immunoselection processes (see Supplemental materials and methods).

The recovery of CD34⁺ cells after each immunoselection process is represented in Figure 2C. As shown in the figure, the median recovery of CD34⁺ cells after immunoselection was 32.0% (range 3.8% to 104.5%). Because in some cases standard CliniMACS purifications resulted in very poor CD34⁺ cell recoveries in four immunoselection procedures (dashed bars in Figures 2B and 2C), the cell washing process that follows the attachment of CD34⁺ cells to the magnetic column was modified (see Supplemental materials and methods). As shown in Table S3, the recovery of CD34⁺ cells obtained in the modified immunoselections increased 2.9-fold over recovery corresponding to conventional immunoselections, although this occurred at the expense of a 6.6-fold decrease in the CD34⁺ cell purity.

To investigate whether low levels of CD34 expression (Figure S2) were associated with a lower primitive HSC content in FA CD34⁺

eleven treated patients the combined administration of filgrastim and plerixafor mobilized ≥ 5 CD34⁺ cells/μL PB (Figure 1C). The only two patients who did not mobilize threshold CD34⁺ cell numbers (01001 and 01002) were 15- and 16-year-old patients (respective weights 65 and 42 kg). This contrasts with all the other patients, with ages of 3–7 years (weight range: 9.2–17.6 kg), who mobilized to a median PB level of 21.8 CD34⁺ cells/μL at the peak of mobilization. As shown in Figure 1D, significant numbers of CFCs also were mobilized after administration of filgrastim and plerixafor. To evaluate more directly the efficacy of the proposed mobilization regimen in FA patients, the fold increase of CD34⁺ cells and CFCs at the peak of the mobilization (with respect to basal numbers determined at visit 0) was also represented. As shown in Figure 1E, median fold increases of CD34⁺ cells and CFCs were 19.4 and 57.3, respectively.

Collection of mobilized HSCs from FA patients treated with filgrastim and plerixafor

Numbers of CD34⁺ cells collected in each of the 22 apheresis procedures carried out in the nine patients who mobilized ≥ 5 CD34⁺ cells/μL PB are represented in Figure 2A. The total number of CD34⁺ cells collected in the different apheresis procedures reached a median value of 4.86×10^6 CD34⁺ cells/kg (1.39 – 7.81×10^6 CD34⁺ cells/kg) (Table S2). As happened in BM, mobilized PB (mPB) CD34⁺ cells showed a low intensity of expression of the CD34 antigen (Figure S2b). The cellularity corresponding to the first apheresis procedure was higher compared to the second and third ones. However,

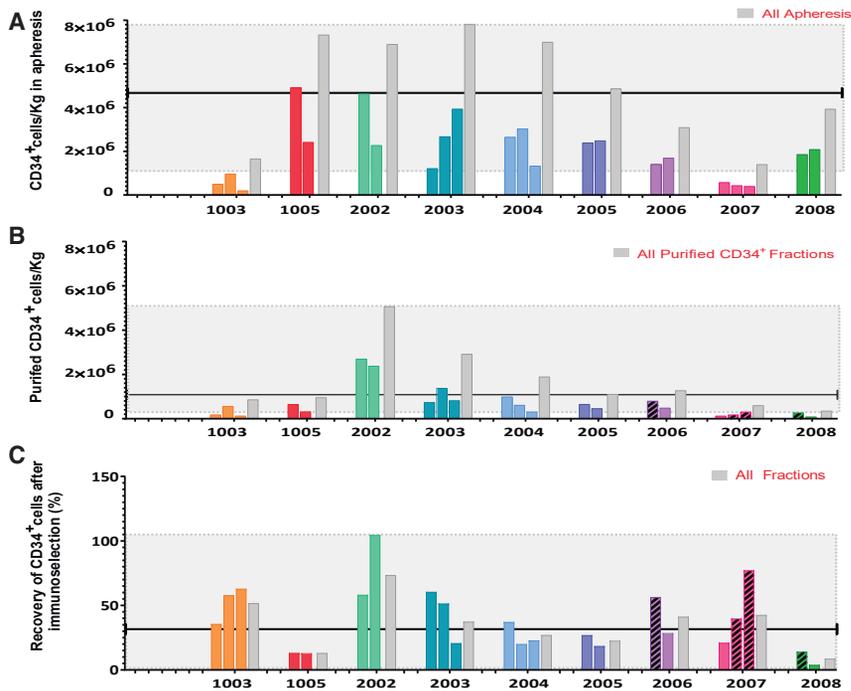


Figure 2. Analysis of the CD34⁺ cell content in apheresis and immunoselection products after HSPC mobilization with filgrastim and plerixafor

(A) Number of CD34⁺ cells/kg collected in each of the apheresis procedures from the nine patients who fulfilled apheresis criteria. Total number of collected CD34⁺ cells/kg corresponding to each patient are also shown (gray bars). (B) CD34⁺ cell numbers after immunoselection. (C) CD34⁺ cell recovery after immunoselection. Dashed bars in (B) and (C) represent data corresponding to immunoselection processes modified to improve the CD34⁺ cell yields. Black lines in each panel represent median values and shadow areas the interval range of the median. Patients' color codes are the same as in Figure 1.

screening, as well as a significant correlation with CD34⁺ cell counts on the 5th day of mobilization (Figure S8).

DISCUSSION

Previous studies have shown that HSPC numbers in the BM of FA patients are markedly lower compared to aged-matched HDs.^{9,10,21}

Consequently, serious difficulties have been encountered in CD34⁺ cell collection for gene therapy in this population.^{11–13,18} The combination of filgrastim and plerixafor is now frequently utilized in different gene therapy trials^{22,23} and has been shown to significantly improve HSPC mobilization in FA mouse models.²⁴ Nonetheless, the evaluation of this HSPC mobilization regimen in FA patients has never been performed to date. In this trial we show for the first time the efficacy of these drugs to facilitate the collection of mPB HSPCs from FA patients and reveal the absence of SAEs related to this treatment.

In terms of efficacy, nine out of the eleven enrolled patients (81.8%) mobilized to the threshold level of 5 CD34⁺ cells/ μ L PB required to initiate apheresis and reached a median value of 21.8 CD34⁺ cells/ μ L at the peak of mobilization. Since flow cytometry parameters used to analyze FA CD34⁺ cells can vary among laboratories, we also determined the fold increase of CD34⁺ cells at the peak of mobilization with respect to basal levels. Whereas previous studies showed that in FA patients G-CSF increased this ratio by 3.6-fold,¹² our data show that the administration of filgrastim and plerixafor markedly increases CD34⁺ cells to levels almost 20-fold higher than the baseline, representing a clear advance compared to CD34⁺ cell mobilization with G-CSF monotherapy.

As deduced from the analysis of the 22 apheresis procedures conducted in this trial, a median value of 4.86×10^6 CD34⁺ cells/kg was collected in 2 or 3 apheresis procedures. Four of the nine patients in whom CD34⁺ cells were collected fulfilled the objective of the trial to collect at least 4 million CD34⁺ cells/kg of projected weight at 5 years. Nevertheless, the median number of CD34⁺ cells after immunoselection significantly decreased to 1.1×10^6 CD34⁺ cells/kg.

cells, purified mPB CD34⁺ cells from six FA patients and ten HDs (treated either with filgrastim alone or with filgrastim and plerixafor) were investigated (see Supplemental materials and methods). In all instances the same gates were used for the analysis of FA and HD samples (see a representative analysis in Figure S6). Compared to mPB CD34⁺ cells from HDs, mPB CD34⁺ cells from FA patients contained significantly lower numbers of primitive HSCs and multipotent (MPP) precursors (4.2–5.6 fold, respectively; Figure 3A). Additionally, a significant decrease was observed in the content of committed myeloid (CMP) and myeloid-erythroid (MEP) progenitors, while a significant increase was observed in the granulocyte-monocyte progenitors (GMP) (Figure 3B). No significant differences were observed in the more differentiated multi-lymphoid progenitor (MLP) and B lymphocytes-natural killer (B-NK) progenitors (Figure 3C).

Exploratory studies

In these studies, we investigated variables associated with the efficacy of HSPC mobilization, defined by CD34⁺ cell numbers either at day 5 of mobilization (Figure 4) or at the peak of mobilization (Figure S7). In these analyses we observed that efficient CD34⁺ cell mobilization was associated with younger age, higher leukocyte counts and hemoglobin values, as well as low mean corpuscular volumes (MCVs), and also with a higher proportion of CD34⁺ cells in BM at screening. Also of significance is the fact that every patient with at least 30 CD34⁺ cells/ μ L BM at screening mobilized to levels > 10 CD34⁺ cells/ μ L PB. MCV was the only variable that remained statistically significant in a multivariate analysis: $\beta -0.9$ (–1.6 to –0.16) ($p = 0.02$). Additionally, we observed that the numbers of collected mPB CD34⁺ cells showed a trend of correlation with the number of BM CD34⁺ cells at

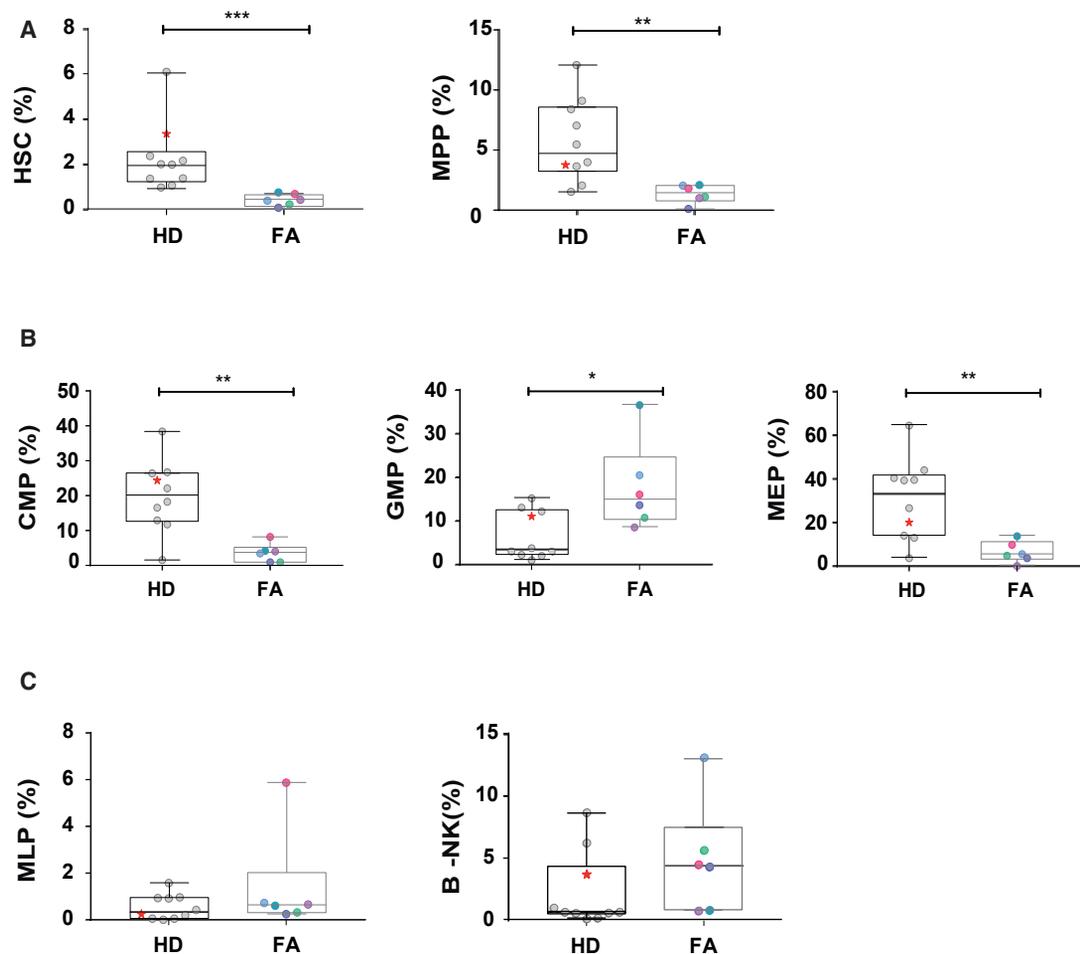


Figure 3. Analysis of different HSPC populations in mobilized PB CD34⁺ cells corresponding to FA patients and healthy donors

The figure shows the content of HSCs (A) and more differentiated progenitor cells (B and C) in mPB CD34⁺ cells from nine HDs and six FA patients. FA patients were pre-treated with filgrastim and plerixafor (color codes as in Figure 1). HDs were treated only with filgrastim or with plerixafor and filgrastim (marked with a star). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Although the median CD34⁺ cell recovery of 32.0% could be considered acceptable for FA patients, it was of particular concern that in three cases the recovery was lower than 15% (Figure 2). In a previous clinical trial, Kelly et al. showed that the median CD34⁺ cell recovery in FA BM harvests was 48% (range 19%–133%).¹³ However, more recently, Adair et al. have reported a very low CD34⁺ cell recovery of 3%. These authors then generated a lineage depletion procedure that resulted in CD34⁺ cell recoveries of 70.7% and 94.6% in mPB and BM from HDs, with an overall reduction of 10-fold in the total number of nucleated cells.¹⁸ Because this procedure would imply the use of very high amounts of viral vectors for gene therapy purposes, in four immunoselections we decided only to modify the washing step during the CliniMACS immunoselection process. This simple modification allowed us to increase by 2.9-fold the recovery of CD34⁺ cells at the expense of reducing the purity of the CD34⁺ population by 6.6-fold. Although this procedure also implies the use of larger amounts of lentiviral vectors for gene therapy protocols,

the low weight of these pediatric patients and the limited number of CD34⁺ cells generally collected from FA patients imply that costs associated with this modified procedure will not be very significant. Additionally, the modified immunoselection process results in the co-infusion of higher numbers of accessory cells, which might enhance the engraftment of transduced HSCs, as already shown in experimental models.^{25,26}

Despite the obvious limitations associated with this trial due to the moderate number of enrolled patients and the fact that all of them belonged to the FA-A complementation group and that only one of them was female, we observed a number of relevant parameters with predictive value to identify FA patients with significant numbers of CD34⁺ cells to be used in gene therapy. In this respect, as shown in Figure 4, both patient age and several hematologic and hematopoietic parameters appear potentially predictive of the mobilization of CD34⁺ cells to PB.

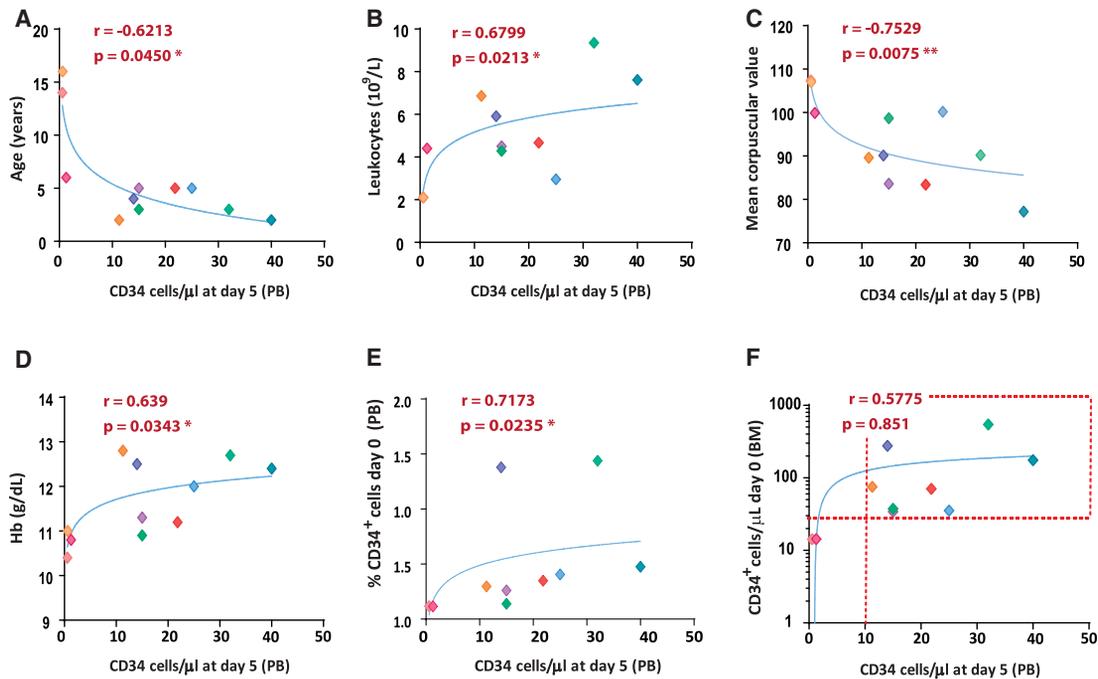


Figure 4. Relationship between basal PB and BM parameters determined at visit 0 and values of mPB CD34⁺ cells 5 days after initiation of the mobilization protocol.

(A–F) the relationship between numbers of mPB CD34⁺ cells at day 5 of mobilization and age of the patients and also basal hematological (leukocyte counts, mean corpuscular values, hemoglobin levels) and BM (percentage and total CD34⁺ cells/ μ L) parameters determined on visit 0. The dotted line in last panel shows the efficient HSPC mobilization (≥ 10 CD34⁺ cells/ μ L PB) of every patient containing at least 30 CD34⁺ cells/ μ L BM at visit 0. Patients' color IDs are the same as in Figure 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Although CD34⁺ cell numbers represent a universal parameter to characterize hematopoietic content in HSC transplants and gene therapy programs, CD34⁺ cells constitute a heterogeneous population, whose content in primitive HSCs might be significantly reduced in stem cell diseases such as FA. As was shown in cells from one FA patient,¹⁸ and confirmed in the eleven patients of this trial, expression levels of the CD34 antigen in FA CD34⁺ cells were generally much lower compared to samples from HDs, suggesting a reduced HSC content in FA CD34⁺ cells.^{18,19}

Consistent with this notion, previous experimental studies in transplanted NSG mice revealed that the repopulating potential of gene-corrected FA CD34⁺ cells was significantly lower compared to HD CD34⁺ cells.¹⁵ Based on precise HSC flow cytometry studies, we now demonstrate that numbers of primitive HSCs were 5-fold lower in FA compared to HD mPB CD34⁺ cells. Although the numbers of HSCs that could be collected from FA patients were 10–50 times lower compared to those collected for the gene therapy of other diseases,^{22,23,27} we have already demonstrated the ability of relatively low numbers of gene-corrected FA HSCs to engraft FA patients, even in the absence of any conditioning regimen.¹⁶ These results thus reinforce the remarkable repopulation potential and proliferation advantage of gene-corrected FA HSCs.

Taken together, the results obtained in this clinical trial show that HSPC mobilization with filgrastim and plerixafor constitutes a safe and efficient procedure that facilitates the collection of clinically relevant numbers of HSCs from pediatric FA patients. Additionally, our exploratory studies in a limited number of FA patients may help to identify FA patients capable of mobilizing significant HSPC quantities for being used in gene therapy protocols.

MATERIALS AND METHODS

FANCOSTEM-I (EudraCT: 2011-006197-88; [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02931071), NCT02931071; ECT 2011-006197-88) was a multicenter phase II clinical trial sponsored by Vall d'Hebrón Research Institut Foundation aiming at evaluating the safety and efficacy of filgrastim and plerixafor mobilization and subsequent collection of CD34⁺ cells in patients with FA for their subsequent use in gene therapy (the clinical protocol is included in [Approved protocol](#)). Briefly, the study consisted of a 5 day mobilization period that could be extended up to 8 days depending on the mobilization results and CD34⁺ cell collections. Up to four leukapheresis procedures were permitted to reach a target cell dose of 4×10^6 CD34⁺ cells/kg of weight estimated in a 5 year period (longest estimation time considered for the cryopreservation of mPB CD34⁺ cells in this trial). Patients treated in FANCOSTEM-I underwent a 1 year period of clinical and hematological follow-up (see details in [Supplemental materials and](#)

methods). The clinical trial and subsequent amendments were approved by independent ethics committees at Hospital Universitari Vall d'Hebrón (Barcelona) and Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid). All legal guardians of the patients provided written informed consent for the clinical trial, sample storage, and exploratory studies prior to enrollment.

Patients

Patients eligible for the study were patients under 18 years of age diagnosed with FA by chromosomal instability testing with DEB¹⁷ or MMC. All patients had confirmed mutational analysis.²⁸ Patients were required to fulfill at least two of the following criteria: Hb \geq 8 g/dL, neutrophils $\geq 0.75 \times 10^9$ cells/L, and platelets $\geq 30 \times 10^9$ cells/L. Additional details regarding inclusion and exclusion criteria are shown in the [Supplemental materials and methods](#).

Treatment

Hospitalized patients were subcutaneously injected with filgrastim (Neupogen, twice daily; 12 μ g/kg/12 h for up to 8 days). Plerixafor (Mozobil) was also administered subcutaneously at a dose of 240 μ g/kg body weight/day (single dose) from the 4th and up to the 8th day after starting administration of filgrastim. At 3–5 h after each plerixafor administration, a PB sample was obtained for CD34⁺ cell analysis, and leukapheresis products and PB cells were analyzed locally for expression of CD34 antigen according to International Society of Hematology and Graft Engineering (ISHAGE) guidelines.²⁹ Details of CD34⁺ cell mobilization are described in the [Supplementary materials and methods](#) and are shown in [Figure 1A](#). To evaluate the efficacy of filgrastim and plerixafor to mobilize HSPCs, numbers of PB CD34⁺ cells were determined daily from the first day of filgrastim treatment until the last apheresis procedure. CD34⁺/CD38⁻ cells and CFCs were also analyzed and recorded during this time period.

Leukapheresis

Patients who achieved >5 CD34⁺ cells/ μ L underwent leukapheresis. Apheresis procedures were carried out via central venous catheter, which was placed after mild sedation or anesthesia. Collections were performed with a continuous flow blood cell separator (COBE Spectra TM, v.6.1, by Caridian BCT Europe, Garching, Germany; or more recently Spectra Optia⁺ MNC v.3.0, Terumo BCT, Lakewood, CO, USA). Acid citrate dextrose with a ratio of 12–14:1 was used as anticoagulant. Red blood cell priming of the blood cell separator was used for all patients under 15 kg or with mild anemia. Transfusion support was performed according to the clinical guidelines of Hospital Universitari Vall d'Hebrón and Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, and exposure to different donors was minimized as much as possible. Three to six patient blood volumes could be processed for every single collection ([Table S1](#)). Baseline pulse and blood pressure were measured and monitored during the leukapheresis process at regular intervals. A calcium gluconate infusion was used to prevent hypocalcemia if necessary. AEs related to the collection were recorded by the nursing staff of the apheresis units. At both institutions, this was a well-trained and experienced team for pediatric apheresis.

Immunoselection

Cells were collected daily and immediately processed for CD34⁺ cell immunoselection by the automated CliniMACS device (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's instructions. Minor modifications were included to improve CD34⁺ cell recovery of the final product. More details can be found in [Supplemental materials and methods](#). The purity of CD34⁺ cells in the different steps of the collection/purification process was assessed by flow cytometry, as described in [Supplemental materials and methods](#) (Flow cytometry studies).

Safety

AEs were evaluated based on the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) terms and graded according to the interference in the patient's quality of life (see [Supplemental materials and methods](#) for more details). AEs are presented in two groups. Events considered by the investigators as related to the mobilization agents (filgrastim and plerixafor) are classified as drug related. The other group is comprised of all AEs reported by patients and guardians for the complete trial period (catheter placement, HSPC collection, or follow-up period). AEs included in the former group were also part of the latter. During the mobilization treatment all patients and/or guardians were asked to report AEs, with special attention to headache, myalgia, low-grade fever, abdominal discomfort, bone pain, and vomiting.

Exploratory studies

Exploratory studies were performed for a post hoc analysis in order to evaluate pre-treatment variables that might be associated with either AEs or mobilization efficacy. Details of clonogenic assays, chromosomal breakage tests in PB T cells, and cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were previously described¹⁶ and are detailed in [Supplemental materials and methods](#).

Statistics

Patient and leukapheresis characteristics were expressed as the median and interquartile range (ICR) in boxes and range. D'Agostino and Pearson, Shapiro-Wilk, and Kolmogórov-Smirnov normality tests were applied for testing normality of the distribution in each cell population. According to non-Gaussian distributions unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used to analyze statistical differences between the samples of multistem populations and the MFI of the different CD34⁺ populations. Wilcoxon signed-rank test was used to compare differences in mean values for paired variables (cells/mL; CD34⁺[%], CD34⁺/CD38⁻ [%], and CFCs/ 10^5 cells) among the different apheresis and purified fractions. Continuous variables were represented according to semi-logarithmic regression. In order to find variables related to number of CD34⁺ cells/ μ L, Pearson correlation analyses was used for leukocytes, MCV, Hb, and CD34⁺ cells/kg, and Spearman correlation was used for age and proportion of CD34⁺ cells in BM aspiration at screening. Variables that were correlated in the univariate analysis were evaluated by stepwise linear regression analysis. All p values were two-sided, and p < 0.05 was considered significant.

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software for Windows.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.06.001>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank A. de la Cal for coordinating the delivery of BM and PB samples from patients with FA. The authors are also indebted to the patients with FA, their families, and clinicians from the Fundación Anemia de Fanconi. The authors also thank Lucie Hernández for processing samples for cytogenetic studies. This work was supported by grants from the European Commission's Seventh Framework Program (HEALTH-F5-2012-305421 to the EUOFANCOLEN Consortium, J.A.B., J. Sevilla, C.D.-d.-H., J. Soulier, and J. Surralles), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (EC11/060 and EC11/550 to C.D.-d.-H., J. Sevilla, J.A.B., and J. Surralles), Ministerio de Economía, Comercio y Competitividad and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (SAF2015-68073-R, RTI2018-097125-B-I00 to P.R. and RTI2018-098419-B-I00 to J. Surralles), Fondo de Investigaciones Sanitarias at the Instituto de Salud Carlos III (RD12/0019/0023 to J.C.S.), and Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid (Avan-Cell Project; B2017/BMD3692). CIBERER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional. J. Surralles is supported by ICREA Academia and FARF.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. Sevilla, S.N., P.R., J.A.B., and C.D.-d.-H. designed research. J. Sevilla, S.N., P.R., R.S.-D., J.Z., E.G., E.M., E.S., C.A., J.A.C., J.C.S., O.A., M.B., F.J.R.-R., Y.G., L.L., R.S., R.M.P., R.H., A. Castillo, J. Soulier, S.Q., J.F., N.G.d.A., R.L., A. Catalá, J. Surralles, C.D.-d.-H., and J.A.B. performed research. J. Sevilla, S.N., P.R., C.D.-d.-H., and J.A.B. analyzed data. J. Sevilla,* S.N.,* P.R.,* and J.A.B. wrote the paper, with J. Sevilla, S.N., and P.R. making equal contributions. All authors revised the paper, included comments, and accept the final version.

DECLARATION OF INTERESTS

J. Sevilla is a consultant and advisor and has received honorarium (Amgen, Novartis, Miltenyi, Sobi, Rocket Pharmaceuticals Inc.) and has licensed medicinal products from Rocket Pharmaceuticals Inc. S.N. and P.R. have licensed medicinal products and receive research funding and equity from Rocket Pharmaceuticals Inc. J.C.S.: Rocket Pharmaceuticals Inc.: consultant/incomes from licensed medicinal products/research funding/equity. J. Schwartz is Medical Director of Rocket Pharmaceuticals Inc. J. Surralles: service agreements (Rocket Pharmaceuticals Inc.). J.A.B.: Rocket Pharmaceuticals Inc.: consultant/incomes from licensed medicinal products/research funding/equity; Roche: honorarium; Pfizer: honorarium.

REFERENCES

- Naldini, L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* 12, 301–315.
- Morgan, R.A., Gray, D., Lomova, A., and Kohn, D.B. (2017). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell* 21, 574–590.
- Tucci, F., Frittoli, M., Barzaghi, F., Calbi, V., Migliavacca, M., Ferrua, F., Fumagalli, F., Loriglioli, L., Castagnaro, L., Facchini, M., et al. (2019). Bone marrow harvesting from paediatric patients undergoing haematopoietic stem cell gene therapy. *Bone Marrow Transplant.* 54, 1995–2003.
- Tisdale, J.F., Pierciey, F.J., Jr., Bonner, M., Thompson, A.A., Krishnamurti, L., Mapara, M.Y., Kwiatkowski, J.L., Shestopalov, I., Ribeil, J.A., Huang, W., et al. (2020). Safety and feasibility of hematopoietic progenitor stem cell collection by mobilization with plerixafor followed by apheresis vs bone marrow harvest in patients with sickle cell disease in the multi-center HGB-206 trial. *Am. J. Hematol.* 95, E239–E242.
- Wong, J.C., Alon, N., Norga, K., Kruyt, F.A., Youssoufian, H., and Buchwald, M. (2000). Cloning and analysis of the mouse Fanconi anemia group A cDNA and an overlapping penta zinc finger cDNA. *Genomics* 67, 273–283.
- Aubé, M., Lafrance, M., Brodeur, I., Delisle, M.C., and Carreau, M. (2003). Fanconi anemia genes are highly expressed in primitive CD34+ hematopoietic cells. *BMC Blood Disord.* 3, 1.
- Ceccaldi, R., Sarangi, P., and D'Andrea, A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 337–349.
- Bagby, G. (2018). Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi Anemia. *F1000Res.* 7, 105.
- Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.S., Pondarre, C., et al. (2012). Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 11, 36–49.
- Larghero, J., Marolleau, J.P., Soulier, J., Filion, A., Rocha, V., Benbunan, M., and Gluckman, E. (2002). Hematopoietic progenitor cell harvest and functionality in Fanconi anemia patients. *Blood* 100, 3051.
- Liu, J.M., Kim, S., Read, E.J., Futaki, M., Dokal, I., Carter, C.S., Leitman, S.F., Pensiero, M., Young, N.S., and Walsh, C.E. (1999). Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum. Gene Ther.* 10, 2337–2346.
- Croop, J.M., Cooper, R., Fernandez, C., Graves, V., Kreissman, S., Hanenberg, H., Smith, F.O., and Williams, D.A. (2001). Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia. *Blood* 98, 2917–2921.
- Kelly, P.F., Radtke, S., von Kalle, C., Balci, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J.A., et al. (2007). Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol. Ther.* 15, 211–219.
- To, L.B., Levesque, J.P., and Herbert, K.E. (2011). How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood* 118, 4530–4540.
- Rio, P., Navarro, S., Guenechea, G., Sánchez-Domínguez, R., Lamana, M.L., Yañez, R., Casado, J.A., Mehta, P.A., Pujol, M.R., Surrallés, J., et al. (2017). Engraftment and in vivo proliferation advantage of gene-corrected mobilized CD34+ cells from Fanconi anemia patients. *Blood* 130, 1535–1542.
- Rio, P., Navarro, S., Wang, W., Sánchez-Domínguez, R., Pujol, R.M., Segovia, J.C., Bogliolo, M., Merino, E., Wu, N., Salgado, R., et al. (2019). Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nat. Med.* 25, 1396–1401.
- Castella, M., Pujol, R., Callén, E., Ramírez, M.J., Casado, J.A., Talavera, M., Ferro, T., Muñoz, A., Sevilla, J., Madero, L., et al. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J. Med. Genet.* 48, 242–250.
- Adair, J.E., Chandrasekaran, D., Sghia-Hughes, G., Haworth, K.G., Woolfrey, A.E., Burroughs, L.M., Choi, G.Y., Becker, P.S., and Kiem, H.P. (2018). Novel lineage depletion preserves autologous blood stem cells for gene therapy of Fanconi anemia complementation group A. *Haematologica* 103, 1806–1814.
- Baech, J., and Johnsen, H.E. (2000). Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification. *Stem Cells* 18, 76–86.

20. Morland, B., Kepak, T., Dallorso, S., Sevilla, J., Murphy, D., Luksch, R., Yaniv, I., Bader, P., Röfler, J., Bisogno, G., et al. (2020). Plerixafor combined with standard regimens for hematopoietic stem cell mobilization in pediatric patients with solid tumors eligible for autologous transplants: two-arm phase I/II study (MOZAIC). *Bone Marrow Transplant.* 55, 1744–1753.
21. Jacome, A., Navarro, S., Río, P., Yañez, R.M., González-Murillo, A., Lozano, M.L., Lamana, M.L., Sevilla, J., Olive, T., Diaz-Heredia, C., et al. (2009). Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol. Ther.* 17, 1083–1092.
22. Markt, S., Scaramuzza, S., Cicalese, M.P., Giglio, F., Galimberti, S., Lidonici, M.R., Calbi, V., Assanelli, A., Bernardo, M.E., Rossi, C., et al. (2019). Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent β -thalassemia. *Nat. Med.* 25, 234–241.
23. Thompson, A.A., Walters, M.C., Kwiatkowski, J., Rasko, J.E.J., Ribeil, J.A., Hongeng, S., Magrin, E., Schiller, G.J., Payen, E., Semeraro, M., et al. (2018). Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 378, 1479–1493.
24. Pulliam, A.C., Hobson, M.J., Ciccone, S.L., Li, Y., Chen, S., Srour, E.F., Yang, F.C., Broxmeyer, H.E., and Clapp, D.W. (2008). AMD3100 synergizes with G-CSF to mobilize repopulating stem cells in Fanconi anemia knockout mice. *Exp. Hematol.* 36, 1084–1090.
25. van der Loo, J.C., Hanenberg, H., Cooper, R.J., Luo, F.Y., Lazaridis, E.N., and Williams, D.A. (1998). Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells. *Blood* 92, 2556–2570.
26. Fernández-García, M., Luisa Lamana, M., Hernando-Rodríguez, M., Sánchez-Domínguez, R., Bueren, J., and Yañez, R. (2018). Improved Hematopoietic Gene Therapy in a Mouse Model of Fanconi Anemia Mediated by Mesenchymal Stromal Cells. *Hum. Gene Ther.* 29, 327–336.
27. Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823.
28. Bogliolo, M., Pujol, R., Aza-Carmona, M., Muñoz-Subirana, N., Rodríguez-Santiago, B., Casado, J.A., Río, P., Bauser, C., Reina-Castillón, J., Lopez-Sanchez, M., et al. (2020). Optimised molecular genetic diagnostics of Fanconi anaemia by whole exome sequencing and functional studies. *J. Med. Genet.* 57, 258–268.
29. Keeney, M., Chin-Yee, I., Weir, K., Popma, J., Nayar, R., and Sutherland, D.R.; International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (1998). Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry* 34, 61–70.

Supplemental information

Improved collection of hematopoietic stem cells and progenitors from Fanconi anemia patients for gene therapy purposes

Julián Sevilla, Susana Navarro, Paula Rio, Rebeca Sánchez-Domínguez, Josune Zubicaray, Eva Gálvez, Eva Merino, Elena Sebastián, Carmen Azqueta, José A. Casado, José C. Segovia, Omaira Alberquilla, Massimo Bogliolo, Francisco J. Román-Rodríguez, Yari Giménez, Lise Larcher, Rocío Salgado, Roser M. Pujol, Raquel Hladun, Ana Castillo, Jean Soulier, Sergi Querol, Jesús Fernández, Jonathan Schwartz, Nagore García de Andoín, Ricardo López, Albert Catalá, Jordi Surralles, Cristina Díaz-de-Heredia, and Juan A. Bueren

Supplementary Information:

Supplementary Materials and Methods Patients

The clinical trial entitled “Phase II clinical trial to assess the safety and efficacy of mobilization and collection of CD34⁺ cells after treatment with plerixafor and filgrastim in patients with Fanconi anemia for subsequent reinfusion of cells transduced with a lentiviral vector carrying the FANCA gene (EudraCT: 2011-006197-88 (ClinicalTrials.gov, NCT02931071; European Clinical Trials Database, 2011-006197-88), complying with all relevant ethic regulations and approved by the Ethic Committees at Hospital Vall d’Hebron in Barcelona and Hospital del Niño Jesús in Madrid in accordance with the Declaration of Helsinki and the Spanish Agency of Medicines and Medicinal Devices. In all instances, patients or their parents provided written informed consents. The trial was sponsored by Hospital Val d’Hebrón Foundation in Barcelona, and patients were enrolled both in Hospital Val d’Hebrón (Barcelona) and in Hospital del Niño Jesús (Madrid).

The inclusion criteria aimed at the collection of HSPCs from FA patients prior to the onset of BMF and leukemic transformation, and were similar to the ones defined in a previous clinical trial in patients with FA¹. Basically patients had to be older than 1 year, with a confirmed diagnosis of FA by a chromosomal instability test with diepoxybutane or mitomycin C and without signs of myelodysplasia or leukemia. To select patients with non-severe BMF, at least one of the following parameters had to be conformed to: hemoglobin ≥ 8 g/dL; neutrophils $\geq 0.75 \times 10^9$ cells/L and platelets $\geq 30 \times 10^9$ cells/L. Main exclusion criteria included evidence of myelodysplastic syndrome or leukemia, or predictive cytogenetic abnormalities in BM aspirates. None of the patients had been transfused for 3 months before being treated with HSPC mobilizing drugs, and none of them had ever received androgen treatment.

Healthy donors

Healthy donors’ mobilized peripheral blood cells were obtained from the remains of the samples and from the tubing set of the Clinimacs at the end of

the immunoselection in donors mobilized with filgrastim or with plerixafor and filgrastim after signing an informed consent.

Mobilization and purification of CD34⁺ cells

To mobilize HSPCs, patients were injected subcutaneously with filgrastim (neupogen; two daily doses of 12µg/kg every 12 hours) for up to a maximum of

8 days. Up to four daily doses of plerixafor (mozobil; 240 µg/kg) were also given subcutaneously, starting four days after the first administration of filgrastim. At 3–5 hours after each administration of plerixafor the number of CD34⁺ cells in PB was determined. When PB CD34⁺ cells numbers were higher than 5 CD34⁺ cells/µL, PB cells were collected by apheresis. When CD34⁺ cell numbers did not reach this threshold, additional treatments with the mobilizing drugs were given, with a limit of 8 mobilization days (**Figure 1a**).

Collected cells were immediately processed for CD34⁺ cell immunoselection. This procedure was performed as described by the Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy (Europe) and the European Society for Blood and Marrow Transplantation in an accredited unit. Cells were processed with the automated CliniMACS device (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's standard protocol with minor changes. The collected product was washed using the washing buffer described by the manufacturer (namely, CliniMACS phosphate buffered saline (PBS)/EDTA buffer), supplemented with human albumin (20% solution from Grifols) at a final concentration of 5%. Manual processing was performed using refrigerated centrifuges according to procedures described in the CliniMACS manual. Cells were incubated in all cases with one vial of CliniMACS CD34 Reagent (composed of iron-dextran superparamagnetic particles conjugated

to a monoclonal anti-CD34 antibody) for 30 min with slow agitation. Before incubation with the monoclonal antibody, and to avoid non-specific binding, 3 ml of human immunoglobulin G (Flebogamma; Grifols) was added to the cell suspension bag. After incubation, cells were washed again and finally diluted to a standard volume of 150 ml. The bag with the washed and labeled cells was hung on the device for automated selection of CD34⁺ cells using software version 2.4 and selection program 1.2. With the purpose of improving the recovery of CD34⁺ cells expressing weak levels of the CD34 antigen, in one of the two apheresis procedures obtained from patient FA-02006, the selection program was modified by program 3.1 designed for T cell depletion. According to this modification, the tubing set was also changed to the one designed for T cell depletion (DTS; 261-01) to collect the target cells (CD34⁺ cells) into the negative fraction bag. With the same purpose, two of the apheresis products from patient FA-02007 and one from patient FA-02008 were also modified, here by limiting the washing steps. For patients FA-02002 and FA-02004, purified CD34⁺ cells were cryopreserved following standard operating procedures for hematopoietic progenitor cell cryopreservation with 10% dimethyl sulfoxide and autologous or allogeneic plasma.

Flow cytometry studies:

Flow cytometry analyses were performed in the LSR Fortessa cell analyser (BD/Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Off-line analyses were made with the FlowJo Software v7.6.5. (Tree star, Ashland, USA). More than 1×10^4 viable cells were acquired in the LSR Fortessa cell analyser using 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI as a viability marker resuspended in flow cytometry buffer consisting of phosphate-buffered saline (PBS) with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% sodium azide). PB and BM samples were previously lysed in ammonium chloride lysis solution (0.155 mM

NH₄Cl, 0.01 mM KHCO₃, 10⁻⁴ mM EDTA).

Immunophenotypic analyses of HSPCs were conducted by flow cytometry using anti-CD45 APC, CD34 PE and CD38 FITC antibodies (all from Becton Dickinson). The different multi-stem intermediate hematopoietic progenitors were analyzed according to the combination of different antibodies: HSC (hematopoietic stem cell: Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻); MPP (multipotent progenitors: CD34⁺CD38⁻Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻); MLP (multi-lymphoid progenitors: CD34⁺CD38⁻Thy-1^{low}CD45RA⁻Flt3⁺CD7^{-/+}CD10⁻); CMP (common myeloid progenitors: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁺CD7⁻CD10⁻); MEP (megakaryocytic and erythroid progenitors: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁻Flt3⁻CD7⁻CD10⁻) and GMP (granulocytic-monocytic progenitors: CD34⁺CD38⁺Thy-1⁻CD45RA⁺Flt3⁺CD7⁻CD10⁻). Fluorochrome-matched isotypes were used as controls. Cells positive for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche) were excluded from the analysis. Analysis was performed using FlowJo software.

Clonogenic assays

To assess the number of CFCs, transduced CD34⁺ cells or BM samples from treated patients were cultured for 14 d at 37 °C under 5% CO₂ and 5% O₂ in methylcellulose medium (#H4434; MethoCult) supplemented with 10 µg ml⁻¹ anti- TNFα and 1 mM *N*-acetylcysteine. The proportion of MMC-resistant CFCs was calculated based on colony numbers scored in the absence and presence of 10 nM MMC (Sigma–Aldrich).

Chromosomal instability test in PB T cells

Analysis of the percentage of aberrant cells after DNA damage with DEB was carried out as previously described². Briefly, PB cells were cultured for 24 h in RPMI supplemented with 15% fetal bovine

serum, 1% antibiotics, 1% l- glutamine and 1% phytohemagglutinin (all reagents from Gibco). After 24 h, a portion of the cells was treated with DEB at a final concentration of 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma–Aldrich). Then, 46 h after DEB treatment, colcemid (0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was added. Metaphase spreads were obtained 2 h later and stained with Giemsa. Analysis of 25–50 metaphases of DEB exposed or non-exposed cultures were conducted in a Zeiss Imager M1 microscope coupled to a computer assisted metaphase finder (MetaSystems). The criteria for the determination and quantification of chromosome breakage were previously described².

Cytogenetic and FISH analyses

BM samples were cultured and harvested for cytogenetic analysis according to established methods. Chromosome slides were G-banded. Chromosomal

aberrations are described according to the guidelines of an International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). At least 10 (usually 20) BM cells were analyzed. FISH analyses were conducted using the following FISH probes: XL CDKN2C/CKS1B (1p32/1q21) (MetaSystems), Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit (Abbott Molecular) and Vysis D7S486/ CEP7 FISH Probe.

Array CGH analyses

Genomic BM DNA was analyzed using Agilent 400K Array CGH technology following the manufacturer's recommendations (Agilent Technologies). Arrays were scanned using SureScan High-Resolution Technology (Agilent Technologies), and the images were processed using Agilent Feature Extraction software, applying linear and lowest normalization methods and local background subtraction using the Agilent Genomic Workbench Version 7.0 software. The final profiles were validated as previously

described³.

Safety

Adverse events were grade according to the following scheme:

- Mild: Patient complain but this AE does not interfere with his/her normal life
- Moderate: Patient cannot continue with his/her normal life without intervention
- Severe: The AE interferes with patient quality of life severely, and he/she needs symptomatic treatment.
- Life threatening. The AE puts the life at risk.

Follow-up period

During the follow up period patients performed visits to the centers for clinical evaluation, adverse events monitoring and PBC counts. Last visit was performed at 12 months after progenitor cell collection. At this time, a BM aspiration was performed for standard cytogenetic and FISH analysis, cytomorphology and clonogenic assays. We also performed array-CGH analyses and targeted next-generation sequencing with PB samples, and a chromosomal instability test in PB T cells.

References

1. Kelly, P.F., Radtke, S., Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J.A., Leemhuis, T., et al. (2007). Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther* 15, 211-219.
2. Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Ramirez, M.J., Casado, J.A., Talavera, M., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Madero, L.,

Cela, E., et al. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet* 48, 242-250. 10.1136/jmg.2010.084210.

3. Rio, P., Navarro, S., Wang, W., Sanchez-Dominguez, R., Pujol, R.M., Segovia, J.C., Bogliolo, M., Merino, E., Wu, N., Salgado, R., Lamana, M.L., et al. (2019). Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nat Med* 25, 1396-1401. 10.1038/s41591-019-0550-z.

Table S1: Analysis of the Total Blood Volumes processed and Number of Blood Volumes processed in each of the leukapheresis procedures

Ref Patient	Apheresis #1			Apheresis #2			Apheresis #3			TOTAL	
	Patient blood volume (L)	Total blood volume processed (L)	Number of blood volumes processed	Patient blood volume (L)	Total Blood volume processed (L)	Number of blood volumes processed	Patient blood volume (L)	Total Blood volume processed (L)	Number of blood volumes processed	Total blood volume processed (L)	Number of blood volumes processed
01003	0.70	3.12	4.46	0.70	4.25	6.07	0.70	2.33	3.33	9.70	13.86
01005	1.15	3.73	3.25	1.15	3.73	3.25				7.46	6.51
02002	1.31	6.73	5.13	1.31	5.97	4.55				12.70	9.68
02003	0.72	2.90	4.03	0.72	3.52	4.88	0.72	2.88	4.00	9.30	12.92
02004	1.12	5.81	5.19	1.12	5.44	4.86	1.12	5.45	4.86	16.69	14.90
02005	1.36	6.92	5.09	1.36	6.81	5.00				13.73	10.09
02006	1.12	4.71	4.20	1.12	5.48	4.89				10.19	9.10
02007	1.38	4.53	3.29	1.38	4.73	3.44	1.41	5.03	3.58	14.29	10.30
02008	1.01	4.28	4.25	1.02	5.12	5.00				9.40	9.25
Median	1.12	4.53	4.25	1.12	5.12	4.88	0.92	3.96	3.79	10.19	10.09
Min	0.70	2.90	3.25	0.70	3.52	3.25	0.70	2.33	3.33	7.46	6.51
Max	1.38	6.92	5.19	1.38	6.81	6.07	1.41	5.45	4.86	16.69	14.90

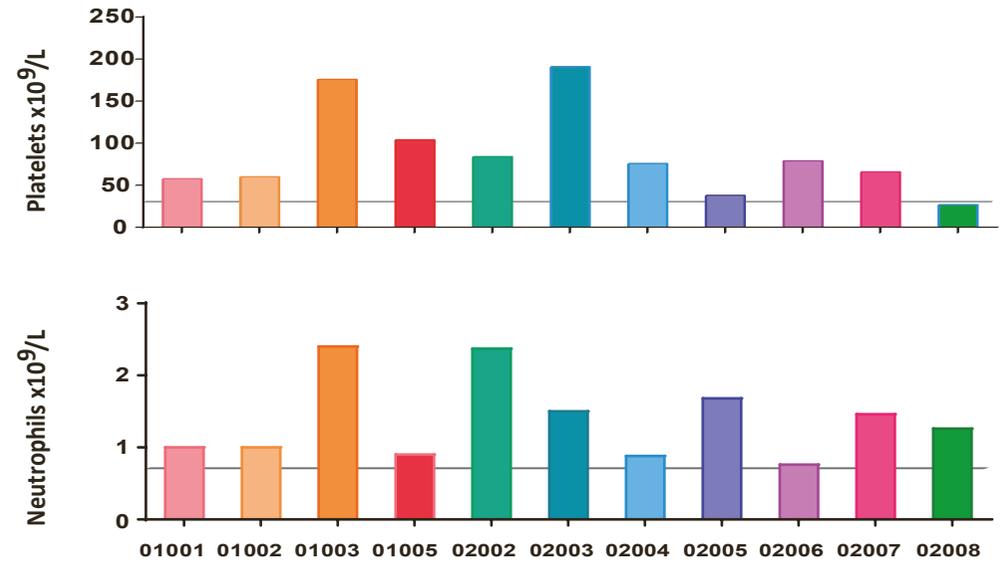
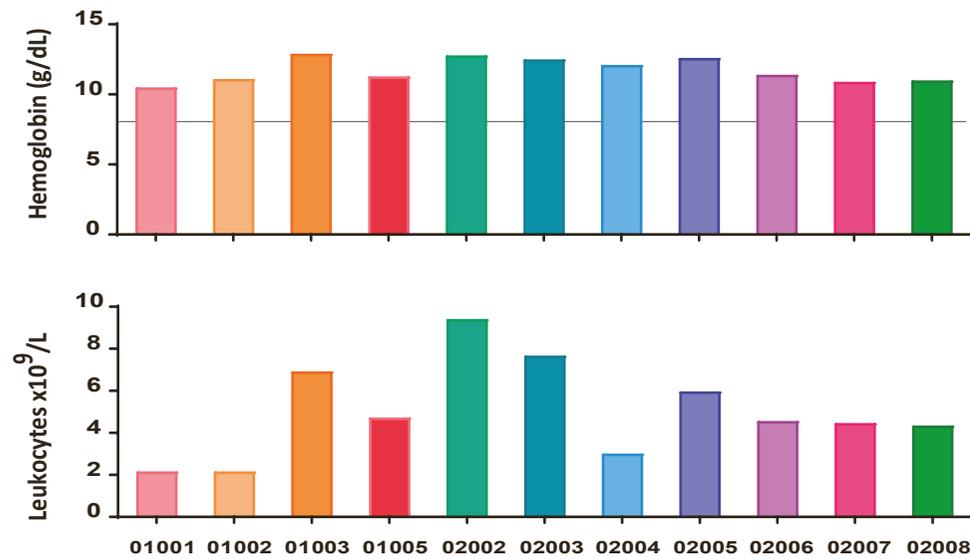
Table S2: Analysis of the number CD34+ cells/kg in the different leukapheresis and immunoselection processes

Patient	Weight	CD34+cells/Kg in Apheresis Collections				Purified CD34+cells/Kg			
		1	2	3	Total	1	2	3	Total
01003	10.0	495,000	960,000	195,000	1,650,000	175,800	555,468	122,480	853,748
01005	16.0	4,912,500	2,412,500		7,325,000	642,281	310,000		952,281
02002	17.0	4,625,882	2,268,235		6,894,117	2,690,000	2,370,000		5,060,000
02003	9.0	1,207,778	2,666,666	3,931,111	7,805,555	730,000	1,370,000	813,000	2,913,000
02004	14.0	2,647,500	3,021,571	1,324,285	6,993,357	981,818	604,350	302,097	1,888,265
02005	17.0	2,382,697	2,477,647		4,860,344	640,871	455,840		1,096,711
02006	13.9	1,400,935	1682374		3,083,309	790,000	478,619		1,268,619
02007	18.0	572,222	427,777	388,888	1,388,888	120,000	170,000	300,000	590,000
02008	12.7	1,850,394	2,078,740		3,929,133	260,220	80,000		340,220
median	14.00				4,860,344				1,096,711
Min	9.00				1,388,889				340,220
Max	18.00				7,805,555				5,060,000

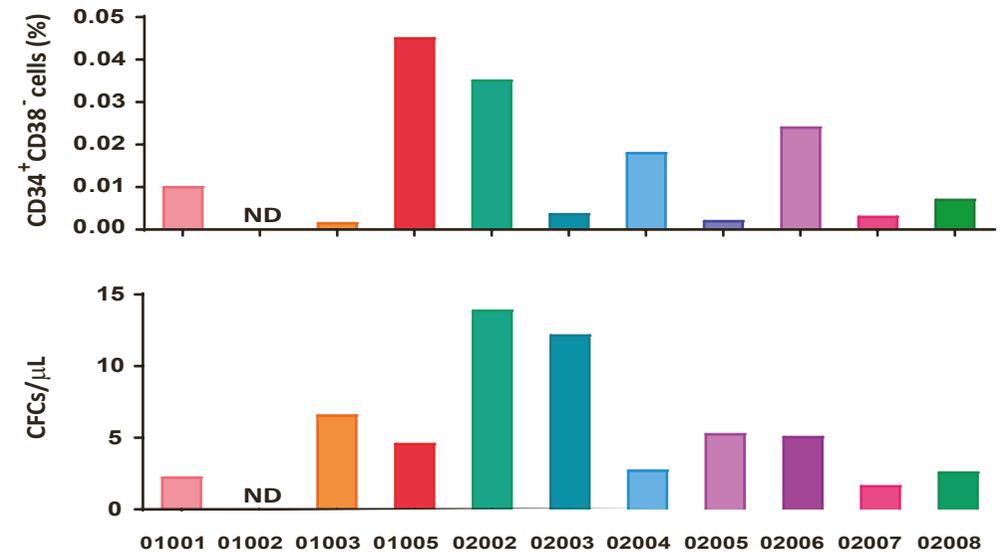
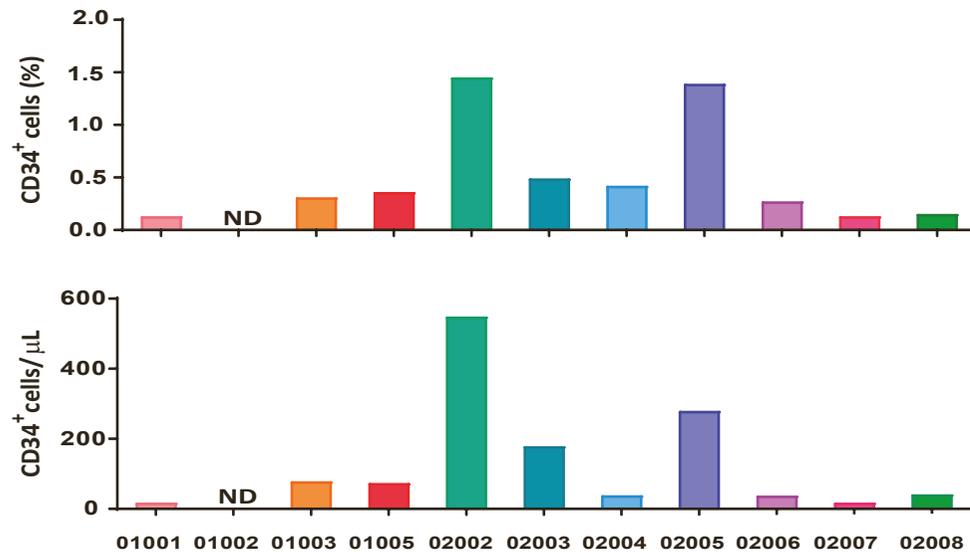
Table S3: CD34⁺ cell recovery and purity in modified versus standard immunoselections in apheresis collections

Patient	Total CD34 ⁺ in Apheresis Collections	Purif Method	Total CD34 ⁺ cells Positive-fraction	Recovery CD34 ⁺ cells		Purity CD34 ⁺ cells	
				Recovery (%)	Fold increase (Modified vs standard immunoselection)	% CD34 ⁺ cells	Fold decrease (Modified vs standard immunoselection)
02006	19,473,000	Modified	11,124,400	57.1	2.0	5.8	6.2
	23,385,000	Standard	6,652,800	28.4		36.0	
02007	10,300,000	Standard	2,009,000	19.5		10.0	
	7,700,000	Modified	2,887,008	37.5	1.9	1.2	8.6
	7,000,000	Modified	5,310,240	75.9	3.9	1.9	5.4
02008	23,500,000	Modified	3,304,800	14.1	3.6	1.2	6.0
	26,400,000	Standard	1,036,800	3.9		7.2	
Mean values: Modified vs standard immunoselections					2.9		6.6

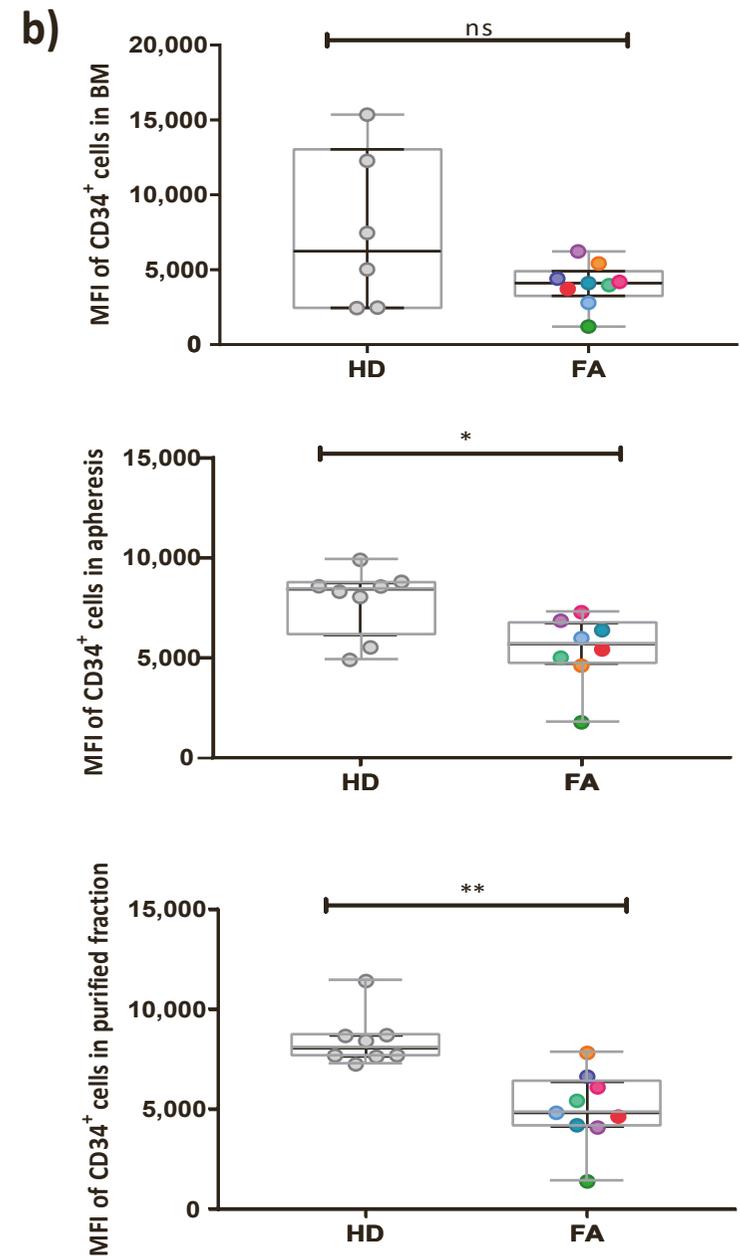
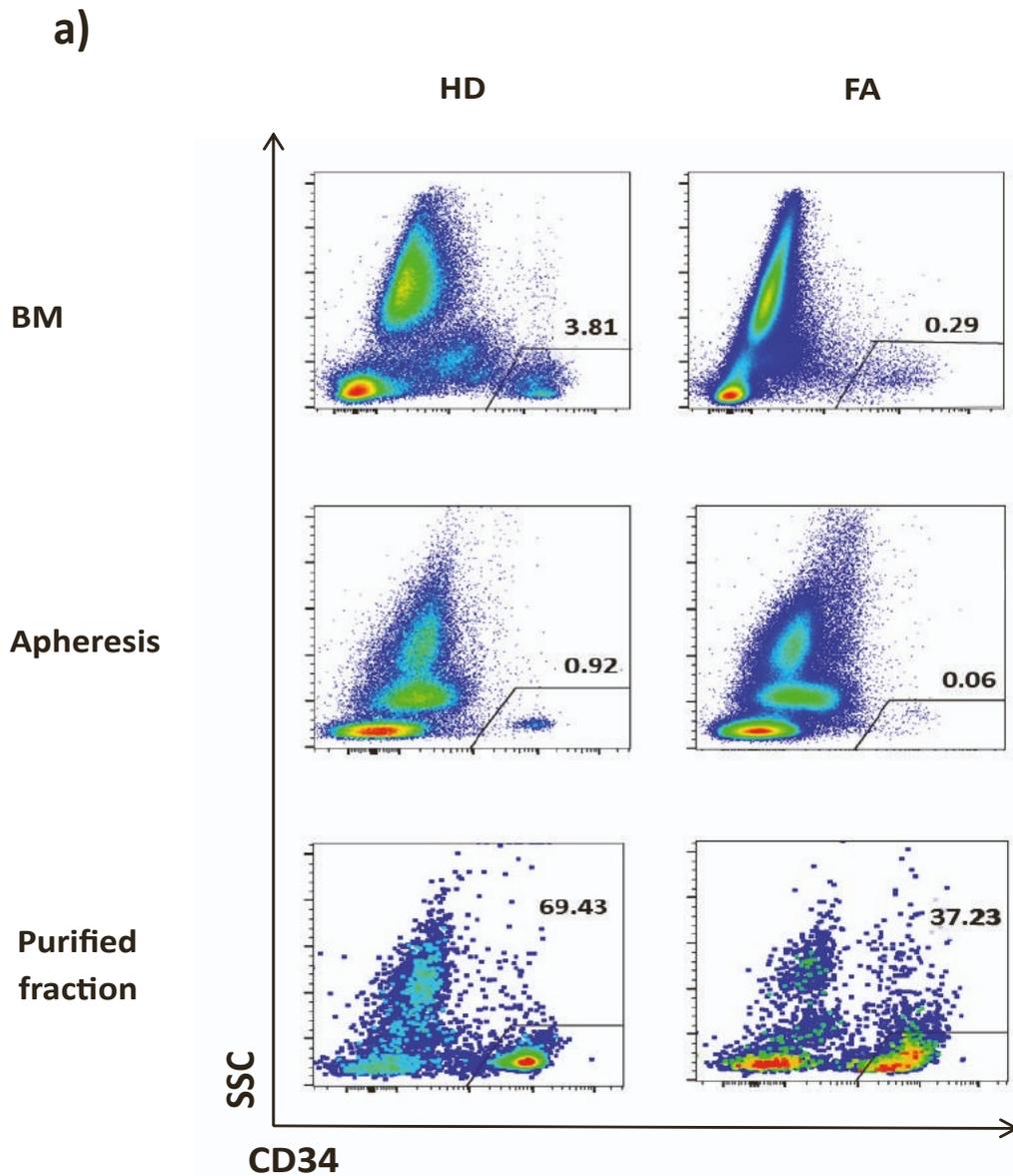
a) Peripheral Blood



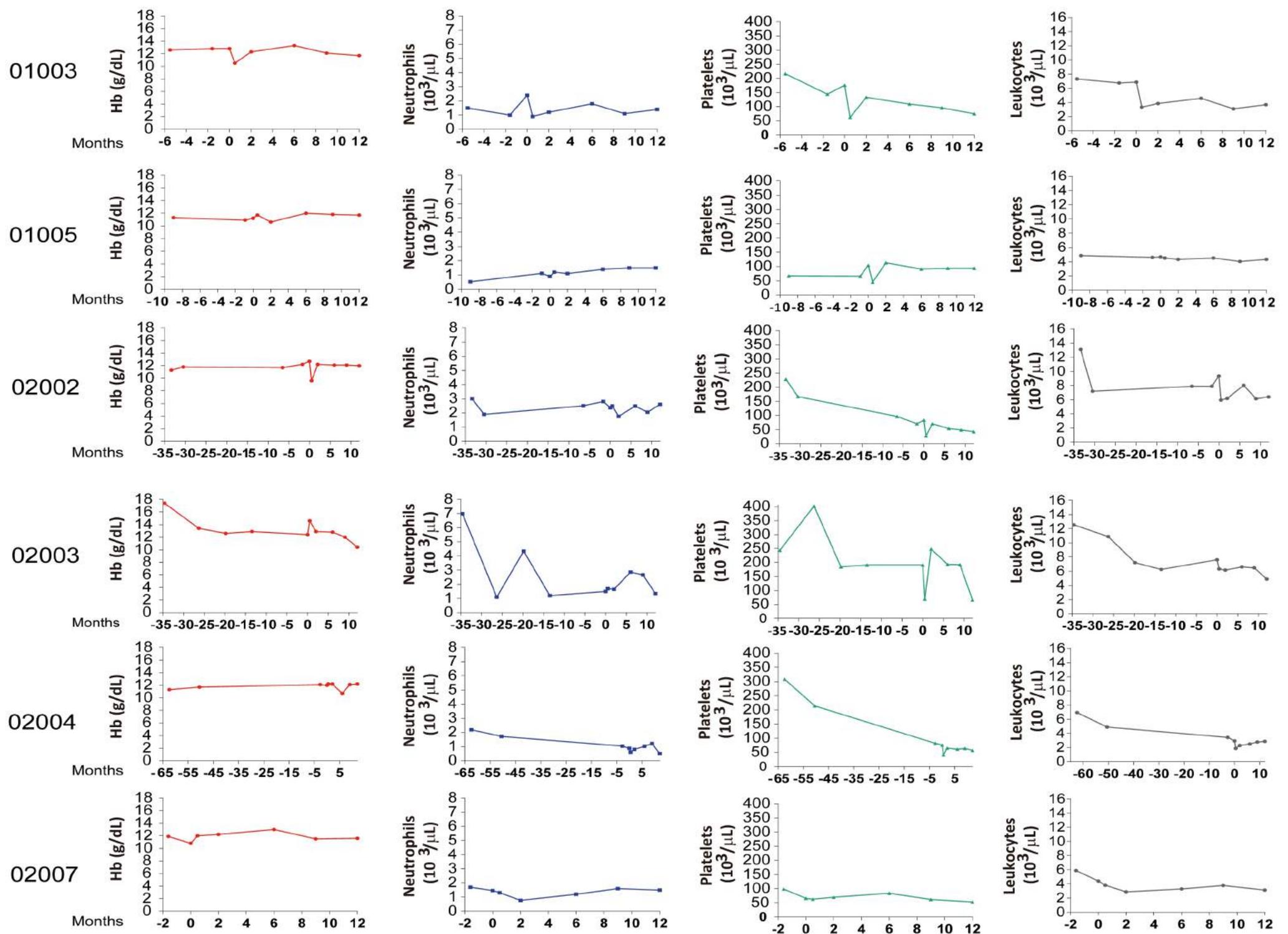
b) Bone Marrow



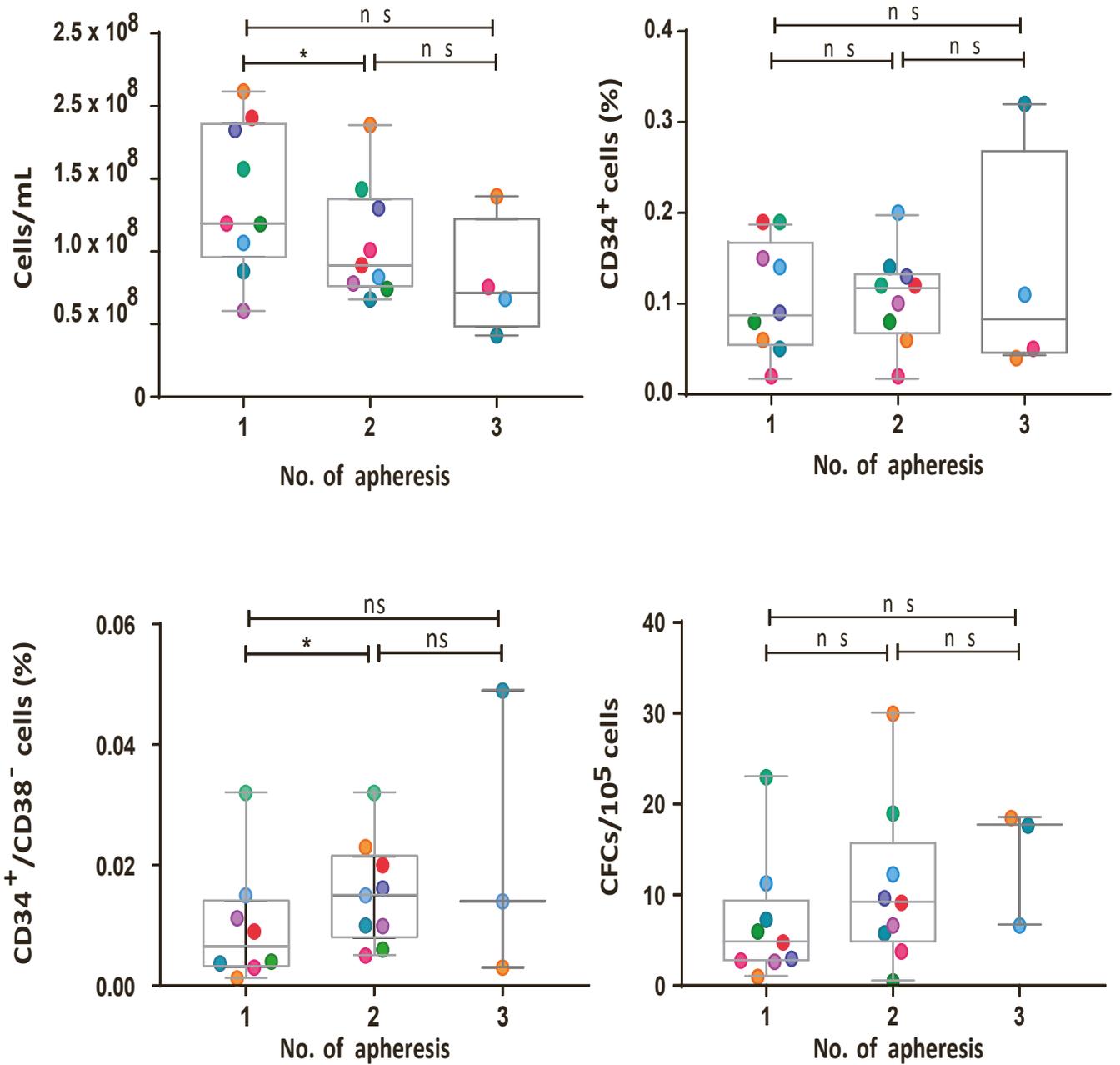
Supplementary Figure 1: Analysis of PB and BM samples from enrolled patients prior to initiate HSPC mobilization. The figure shows peripheral blood (a) and bone marrow (b) parameters corresponding to the 11 enrolled FA patients prior to initiate HSPC mobilization (visit 0). Dashed lines indicate threshold values defined in the clinical trial. Patients should have at least two parameters above these thresholds to be enrolled in the clinical trial



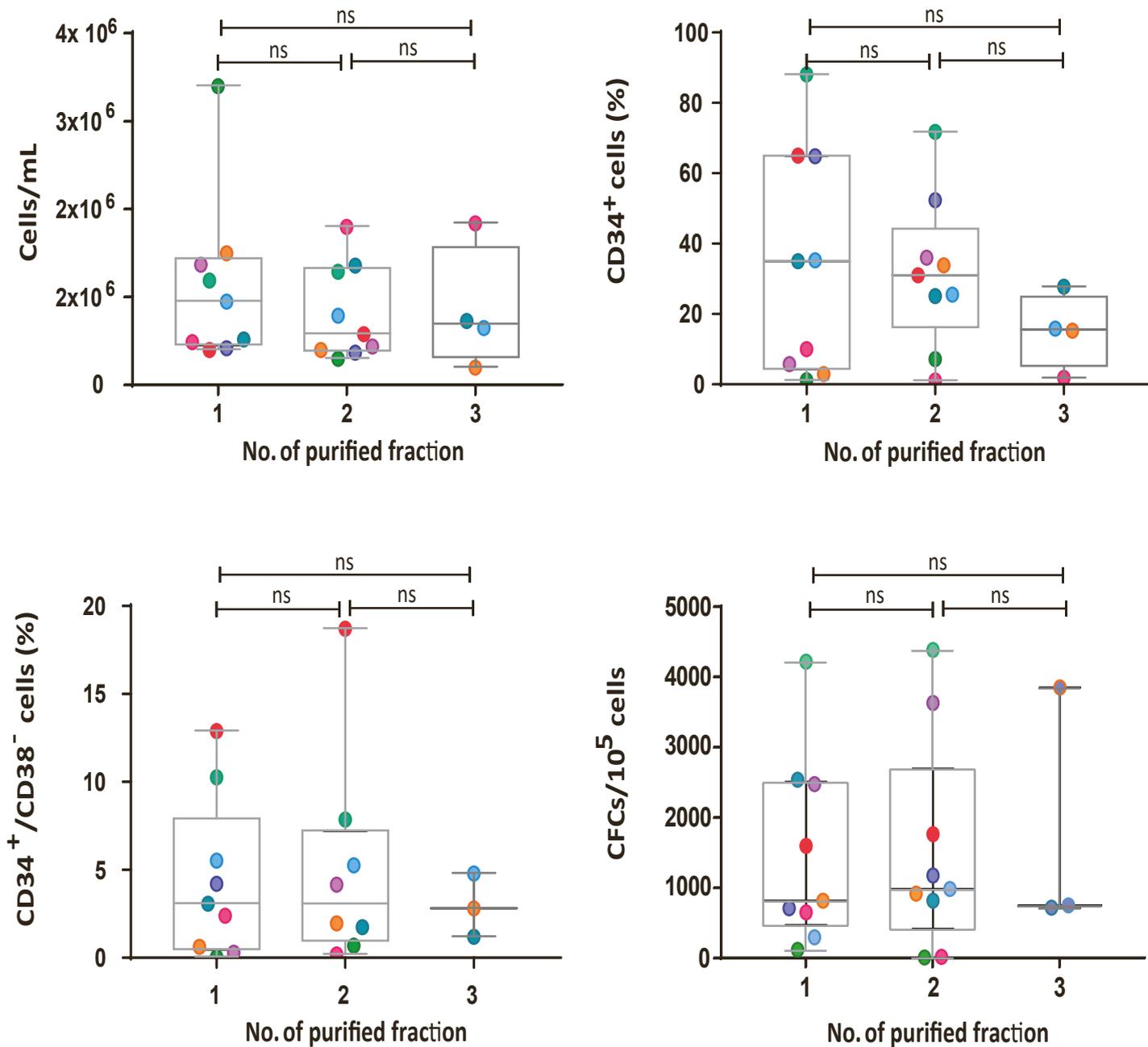
Supplementary Figure 2: Representative analyses of the CD34 expression in bone marrow and apheresis products prior to and after immunoselection. a) Representative histograms showing differences of CD34 expression in FA BM, as well as in apheresis and immunoselected CD34⁺ samples. b) Graphs showing the median with the interquartile range (ICR) in boxes and max and min range and the statistical significance in the MFI CD34⁺ expression between HD and FA samples (BM, apheresis products and immunoselected CD34⁺ populations). Patients' color ID is the same as in Figure 1 while HD samples are represented in grey. Apheresis samples and purified CD34⁺ cells were obtained on day 5 of mobilization.



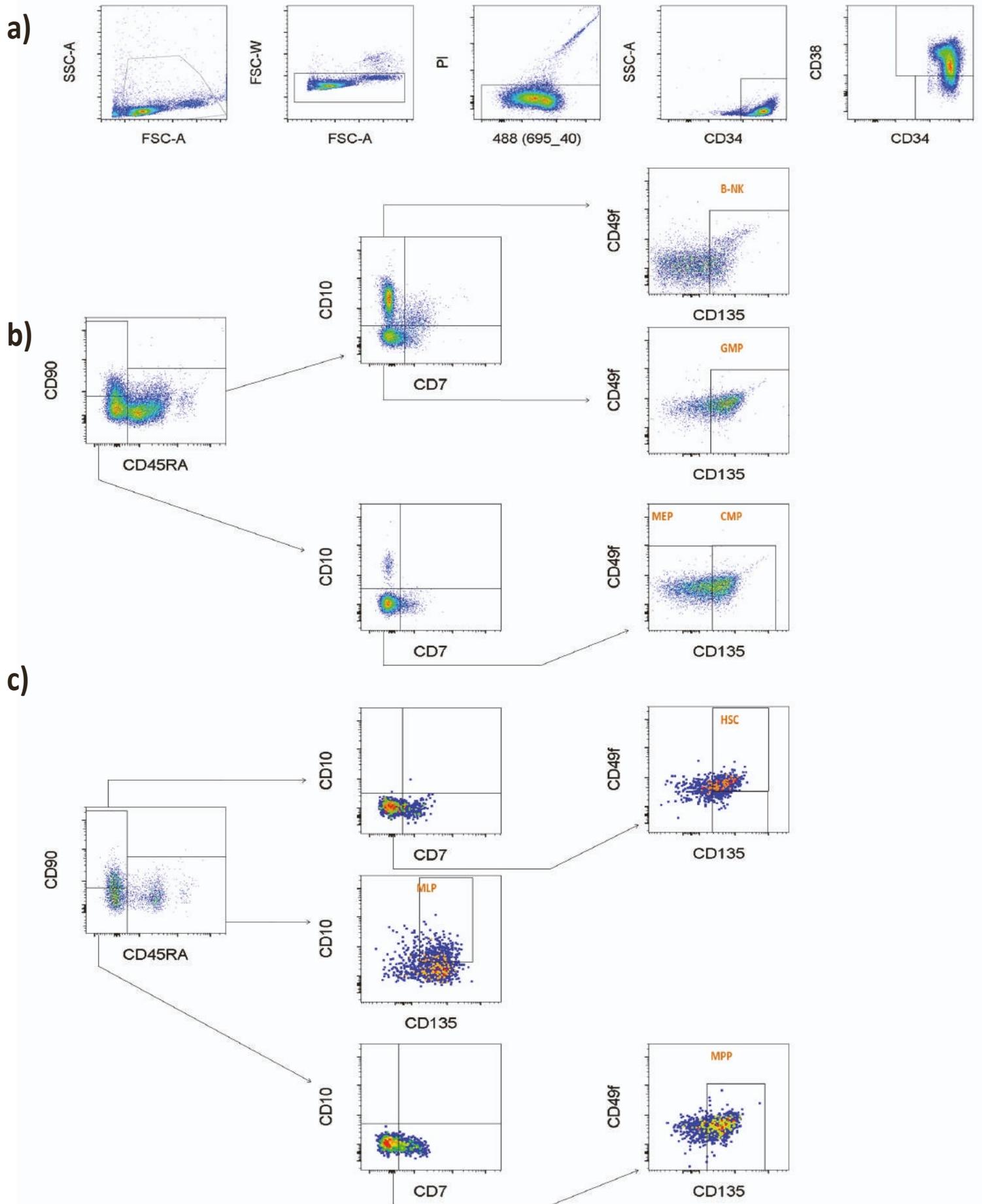
Analysis of different hematological parameters of FA patients prior to and after mobilization and collection of mPB HSPCs. Graphs showing levels of hemoglobin (Hb), neutrophils, platelets and leucocytes are represented. Patient ID is indicated. PB cell numbers during the mobilization process are not represented. These values are represented in detail in Figure 11³



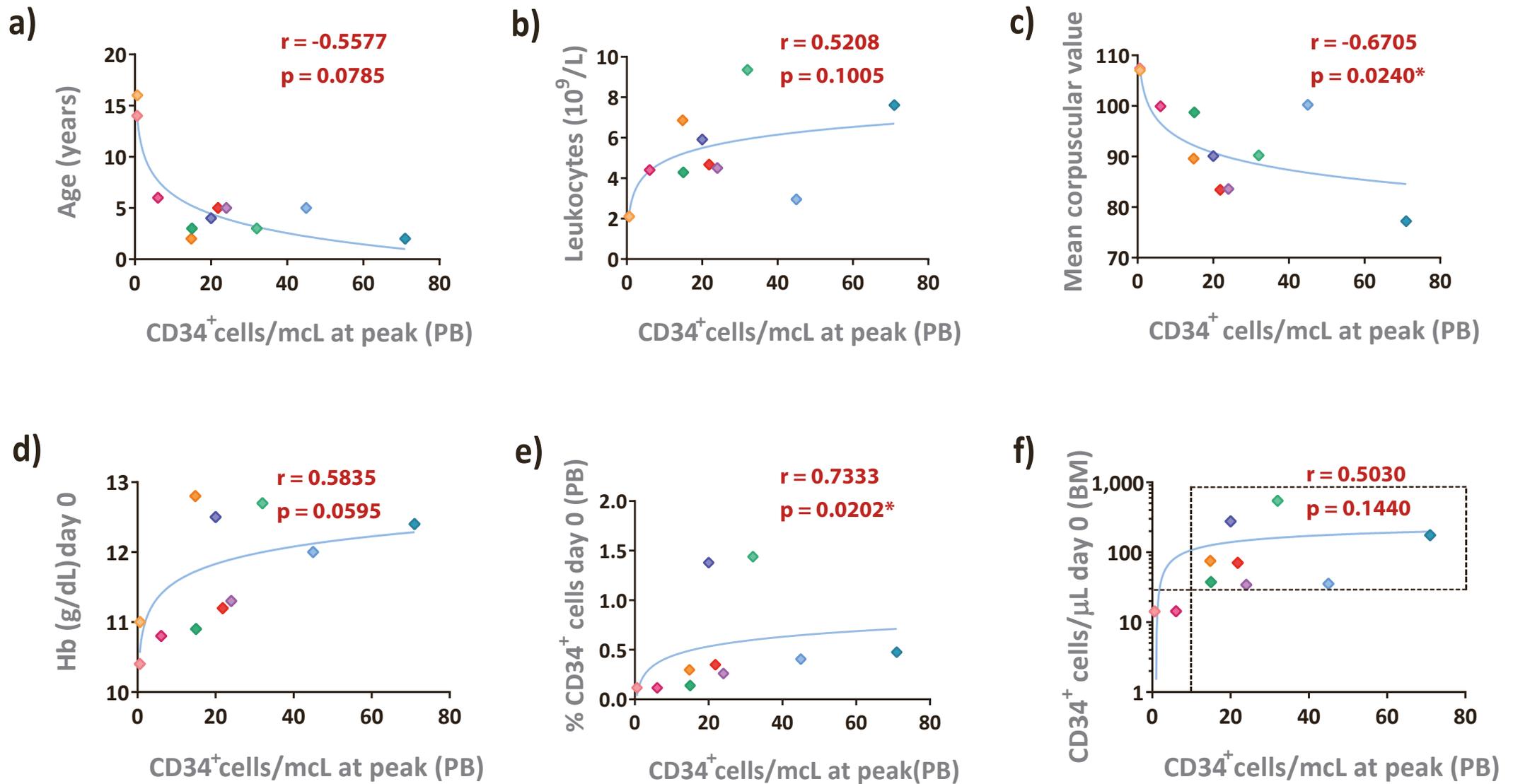
Supplementary Figure 4: Analysis of leukocyte numbers and proportion of CD34⁺, CD34⁺/CD38⁻ cells and CFCs in each of the apheresis collections from FA patients treated with filgrastim and plerixafor, corresponding to Figure 2a.



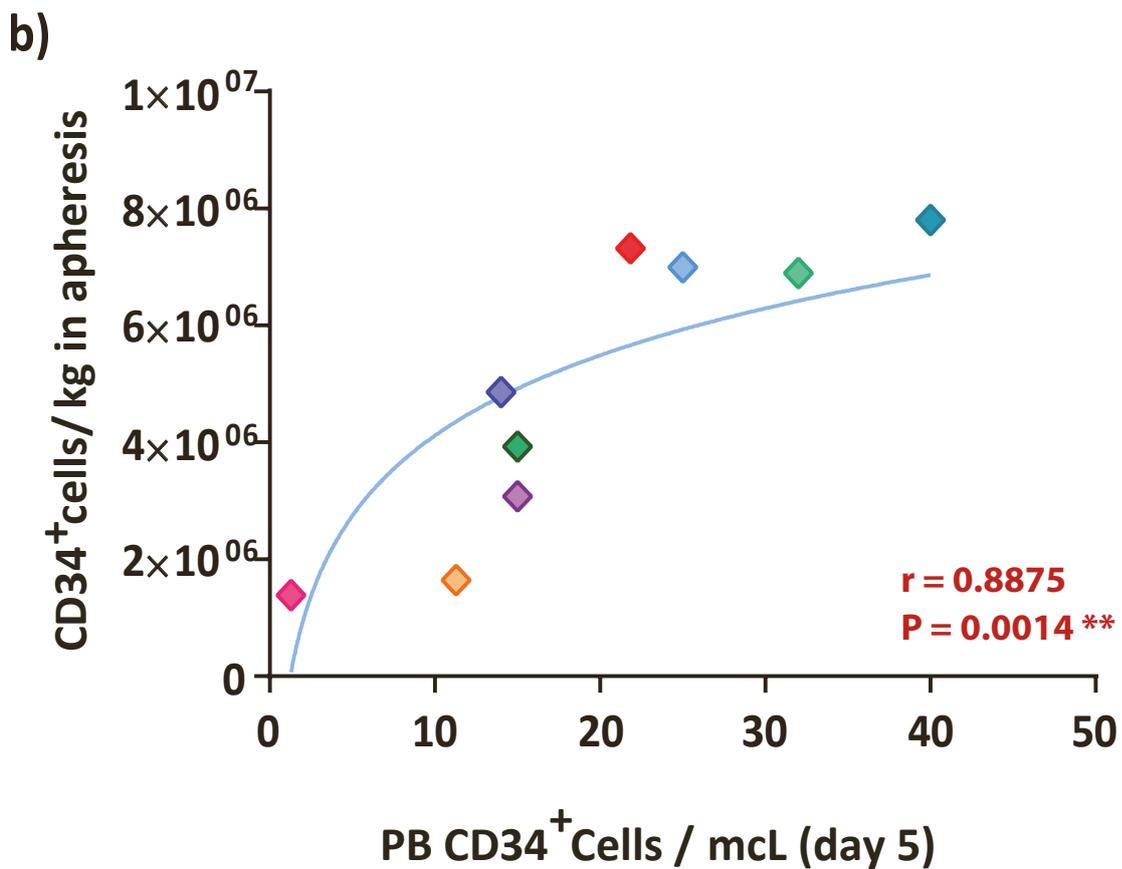
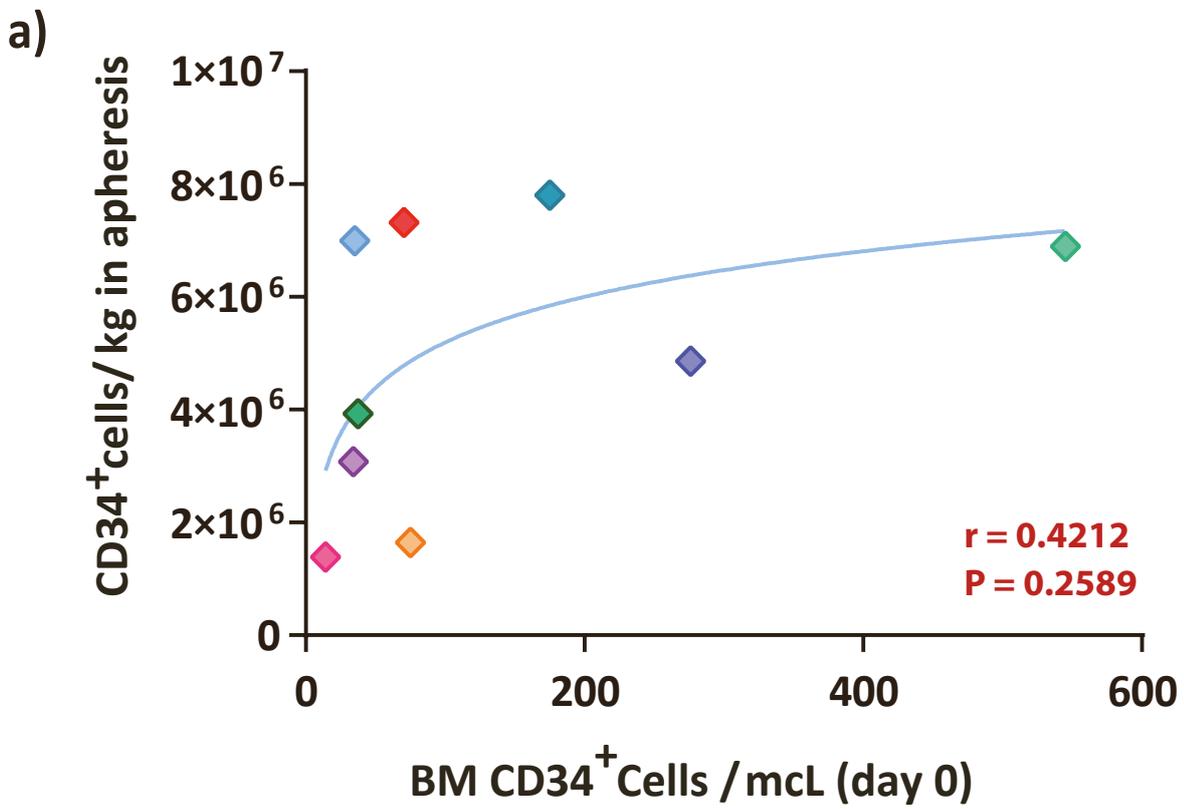
Supplementary Figure 5: Analysis of leukocyte numbers and proportion of CD34⁺, CD34⁺/CD38⁻ cells and CFCs in each of the immunoselected collections from FA patients treated with filgrastim and plerixafor, corresponding to Figure 2b. Patients' color ID is the same as in Figure 1.



Supplementary Figure 6: Representative histograms showing the gating strategy used for the identification of different HSPC subsets in FA patients compared to HDs. Patients' color ID is the same as in Figure 1



Supplementary Figure 7: Relationship between basal parameters determined at visit 0 and values of mPB CD34⁺ cells at the peak of mobilization after initiating the protocol. Panels a) to f) represent the relationship between numbers of mPB CD34⁺ cells at the peak of mobilization with respect to age of the patients, and also with respect to basal hematological (leukocyte counts, mean corpuscular values, hemoglobin levels) and BM parameters (percentage and total CD34⁺ cells/ μ L) determined on visit 0. Panel g) represents the correlation study between numbers of BM CD34⁺ cells/ μ L with respect to mobilized CD34⁺ cell numbers at the peak of mobilization. The dotted line in last panel shows the efficient HSPC mobilization (≥ 10 CD34⁺ cells/ μ L PB) in every patient with at least 30 CD34⁺ cells/ μ L BM at visit 0. Patients' color ID is the same as in Figure 1.



Supplementary Figure 8: Panel a) Correlation analysis between the number of CD34⁺ cells/ μ L BM at the screening visit and the total number of mPB CD34⁺ cells per kg collected in the apheresis. Panel b) represent the same correlation study when numbers of CD34⁺ cells determined at day 5 of mobilization were considered. Patients' color ID is the same as in Figure 1.

References

1. Kelly, P.F., Radtke, S., Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J.A., Leemhuis, T., et al. (2007). Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther* 15, 211-219.
2. Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Ramirez, M.J., Casado, J.A., Talavera, M., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Madero, L., Cela, E., et al. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet* 48, 242-250. 10.1136/jmg.2010.084210.
3. Rio, P., Navarro, S., Wang, W., Sanchez-Dominguez, R., Pujol, R.M., Segovia, J.C., Bogliolo, M., Merino, E., Wu, N., Salgado, R., Lamana, M.L., et al. (2019). Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nat Med* 25, 1396-1401. 10.1038/s41591-019-0550-z.

PROTOCOLO:

Título: Ensayo clínico Fase II para evaluar la seguridad y eficacia de la movilización y colecta de células CD34⁺ tras tratamiento con plerixafor y filgrastim en pacientes con anemia de Fanconi para su posterior transducción con un vector lentiviral portador del gen *FANCA* y reinfusión en el paciente

INDICE:

	PAG
0 Lista de abreviaturas:	6
1 Información General	7
1.1 Título, número de identificación del protocolo y fecha.	7
1.2 Nombre y dirección del promotor y monitor (si es diferente del promotor).	7
1.3 Nombre y cargo de la persona autorizada por el promotor para firmar el protocolo y las modificaciones al protocolo.	7
1.4 Nombre, cargo, dirección y números de teléfono de los expertos médicos (u odontólogos cuando proceda) del promotor del ensayo.	7
1.5 Nombre y cargo de todos los investigadores responsables de la realización del ensayo y la dirección y números de teléfono de los centros del ensayo.	7
1.5.1 Investigador clínico principal en la institución que esponsoriza el ensayo multicéntrico.	7
1.5.2 Investigador clínico principal en la institución que colaboradora del ensayo multicéntrico.	8
1.5.3 Coordinador general de la investigación.	8
1.5.4 Investigadores asociados.	8
1.5.4.1 Especialistas clínicos asociados.	8
1.5.4.2 Investigadores preclínicos asociados.	9
1.6 Nombre, cargo, dirección y número de teléfono del médico cualificado (u odontólogo cuando proceda) que es responsable de todas las decisiones médicas (u odontológicas) en cada centro del ensayo (si es diferente del investigador).	9
1.7 Nombre y direcciones de los laboratorios clínicos y los departamentos médicos o técnicos o instituciones implicadas en el ensayo.	9
2 Justificación	10
2.1 Nombre y descripción del medicamento en investigación.	10
2.1.1 Nombre del medicamento: Mozobil	10
2.1.1.1 Grupo farmacoterapéutico	10
2.1.1.2 Composición cualitativa y cuantitativa	10
2.1.1.3 Forma farmacéutica	10
2.1.1.4 Indicaciones terapéuticas	10
2.1.1.5 Mecanismo de acción	10
2.1.2 Nombre del medicamento: Neupogen	10
2.1.2.1 Grupo farmacoterapéutico	10
2.1.2.2 Composición cualitativa y cuantitativa	10
2.1.2.3 Forma farmacéutica	10
2.1.2.4 Indicaciones terapéuticas	11
2.1.2.5 Mecanismo de acción	11
2.2 Resumen de los hallazgos clínicos y no clínico que puedan ser relevantes para el ensayo actual.	11
2.2.1 Características clínicas de la Anemia de Fanconi (AF)	11
2.2.2 Terapias actuales para la Anemia de Fanconi	12
2.2.3 Justificación de la terapia génica con un vector lentiviral portador	16

del gen FANCA, medicamento huérfano, como una nueva opción terapéutica para pacientes con AF sin un donante hermano HLA idéntico	
2.2.4 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34+ en pacientes FA	16
2.2.4.1.: Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with Fanconi anemia group C gene (FANCC). Liu et al. Human Gene Ther. 10: 2337-2346; 1999	17
2.2.4.2 Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia de Croop et al Blood 98: 2917-2921, 2001	18
2.2.4.3 Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. Kelli et al. Molecular Therapy 15: 211-219; 2007	19
2.2.5 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34+ en pacientes no AF, pero con problemas para la colecta de células CD34+.	20
2.2.5.1 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34+ en pacientes pediátricos con problemas para la colecta de células CD34+ con altas dosis de filgrastim.	20
2.2.5.2 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34+ en pacientes con problemas para la colecta de células CD34+ con plerixafor.	21
2.2.5.3 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34+ en pacientes pediátricos con problemas para la colecta de células CD34+ con plerixafor y altas dosis de G-CSF filgrastrim.	24
2.3 Resumen de los riesgos y beneficios conocidos y potenciales, si los hubiera, para los seres humanos.	24
2.3.1 Efectos hematológicos	24
2.3.2 Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción	25
2.3.3 Fertilidad, embarazo y lactancia	25
2.3.4 Otras reacciones adversas	25
2.4 Descripción y justificación de la vía de administración, dosis, pauta de dosificación y periodo de tratamiento.	26
2.5 Declaración de que el ensayo será realizado de acuerdo con el protocolo, la BPC y los requisitos legales pertinentes.	27
2.6 Descripción de la población a estudiar.	27
2.7 Referencias de la literatura y datos que sean relevantes para el ensayo y que proporcionen una justificación del mismo.	27
3 Objetivo y Finalidad del Ensayo	30
4 Diseño del Ensayo	31
4.1 Descripción específica de las variables principales y secundarias, si las hubiera, que se evaluarán en el ensayo.	31
4.2 Una descripción del tipo/diseño del ensayo que se realizará (por ejemplo, doble ciego, controlado con placebo, diseño paralelo) y un diagrama esquemático del diseño del ensayo, procedimientos y periodos.	31
4.2.1 Principales etapas del protocolo.	31
4.3 Descripción de las medidas tomadas para minimizar o evitar sesgos, tales como aleatorización o enmascaramiento.	32
4.4 Descripción de los tratamientos del ensayo y de la dosis y pauta de tratamiento del medicamento(s) en investigación. Además, deberá incluir una descripción de la forma farmacéutica, envasado y etiquetado del medicamento(s) en investigación.	32
4.4.1 Dosis y Pauta de Tratamiento.	32
4.4.2 Forma farmacéutica, envasado y etiquetado del medicamento	33

4.4.2.1 Nombre del medicamento	33
4.4.2.2 Nombre del medicamento	34
4.5 Duración esperada de la participación de los sujetos y una descripción de la secuencia y duración de todos los periodos del ensayo, incluyendo el seguimiento, cuando proceda.	36
4.5.1. Calendario de evaluaciones.	36
4.6 Descripción de los “criterios de finalización” y de los “criterios de interrupción”, de parte o durante todo el estudio o de los sujetos.	37
4.7 Procedimientos para contabilizar (reconciliar) el medicamento en investigación, incluyendo el placebo y el comparador, si lo hubiera.	37
4.8 Mantenimiento de los códigos de aleatorización del tratamiento del ensayo y los procedimientos para la apertura de los mismos.	37
4.9 Identificación de todos los datos que deban ser recogidos directamente en el CRD y que deban ser considerados como dato fuente (es decir, no existe ningún registro escrito o electrónico de los datos).	38
4.10 Definición de lo que se considerará <i>final del ensayo</i> , proporcionando una justificación cuando esta fecha no sea la de la última visita del último sujeto reclutado.	38
5 Selección y Retirada de Sujetos	39
5.1 Criterios de inclusión de los sujetos	39
5.2 Criterios de exclusión de los sujetos.	39
5.3 Criterios de retirada de los sujetos (es decir, finalizar el tratamiento del ensayo) y los procedimientos que especifican.	40
6 Tratamiento de los Sujetos	42
6.1 Los tratamientos que se administrarán, incluyendo el nombre de todos los medicamentos, la dosis, esquema de dosificación, la vía o modo de administración, y los periodos de tratamiento incluyendo los periodos de seguimiento para los sujetos de cada grupo o brazo de tratamiento del ensayo.	42
6.2 Medicamentos o tratamientos permitidos (incluyendo la medicación de rescate) y no permitidos antes y/o durante el ensayo.	42
7 Valoración de la Eficacia	44
7.1 Especificación de los parámetros de eficacia	44
7.2 Métodos y el calendario para la evaluación, registro y análisis de los parámetros de eficacia.	44
7.2.1. Período INCLUSIÓN	44
7.2.2. Período de MOVILIZACIÓN	44
7.2.3. Colecta y selección de células CD34 ⁺	44
7.2.4. Seguimiento	45
8 Valoración de Seguridad	46
8.1 La especificación de los parámetros de seguridad.	46
8.2 Los métodos y el calendario para la evaluación, registro y análisis de los parámetros de Seguridad.	47
8.2.1. Métodos y calendario para evaluar la seguridad de la movilización con plerifaxor y filgrastim .	47
8.3 Los procedimientos para obtener los informes de los acontecimientos adversos y enfermedades intercurrentes y para el registro y comunicación de los mismos y de las reacciones adversas a los medicamentos que se investigan.	47
8.3.1. Reacciones adversas no graves y reacciones adversas medicamentosas no graves.	47
8.3.2. Acontecimientos adversos graves y reacciones adversas medicamentosas graves.	48

8.3.3 Valoración de la causalidad y severidad de los AA.	48
8.4 El tipo y la duración del seguimiento de los sujetos después de los acontecimientos adversos.	49
9 Estadística	50
9.1 Descripción de los métodos estadísticos que se usarán, incluyendo el calendario de todos los análisis intermedios planificados.	50
9.2 Número previsto de sujetos que se incluirán. En los ensayos multicéntricos, se deberá especificar el número previsto de sujetos que se incluirán en cada centro donde se realizará el ensayo. Justificación del cálculo del tamaño de la muestra, incluyendo la explicación (o cálculo) del poder del ensayo y la argumentación clínica de dicho tamaño.	50
9.3 Nivel de significación que será utilizado.	50
9.4 Criterios para la finalización del ensayo.	50
9.5 Procedimiento utilizado para contabilizar los datos perdidos, no utilizados y erróneos.	50
9.6 Procedimiento de comunicación de todas las desviaciones del plan estadístico original (toda desviación del plan estadístico original deberá ser descrito y justificado en el protocolo y/o en el informe final, si fuera necesario).	50
9.7 Selección de los sujetos que se van a incluir en cada análisis (por ejemplo, todos los sujetos aleatorizados, todos los sujetos tratados, todos los sujetos elegibles, los sujetos evaluables).	51
10 Acceso Directo a los Datos/Documentos Fuente	52
11 Control y Garantía de Calidad	53
12 Ética	54
12.1 Descripción de las consideraciones éticas relacionadas con el ensayo	54
12.2 Consideraciones generales	54
12.3 Información que será proporcionada a los sujetos y tipo de consentimiento informado que será solicitado en el ensayo	54
13 Manejo de los Datos y Archivo de los Registros	56
13.1 Acceso a los datos de los voluntarios	56
13.2 Protección de los datos obtenidos del estudio	56
14 Financiación y Seguros	57
15 Política de Publicación	58
16 Consideraciones prácticas	59
16.1 Responsabilidades del investigador	59
16.2 Normas para la cumplimentación de los CRD	59
16.3 Protección de los datos obtenidos del estudio	59
Apéndice A	61
A.1 Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos	61
Apéndice B	66

0 LISTA DE ABREVIATURAS

AA Acontecimiento adverso
AAG Acontecimiento adverso grave
AF: Anemia de Fanconi
AF-A: Anemia de Fanconi del Grupo de Complementación A
AMM Asociación Médica Mundial
ANCOVA Análisis de la covarianza
CEI Comité Ético Independiente
CEIC Comité Ético de Investigación Clínica
CMH: Célula madre hematopoyética
CRD Cuaderno de Recogida de Datos
DR Diferencia de riesgos
ECG Electrocardiograma
GCP Good Clinical Practice
ICH International Conference on Harmonisation
ITT Población de Análisis por Intención de Tratar
LOCF Last Observation Carried Forward
MedDRA Medical Dictionary for Regulatory Activities
MO: Médula ósea
PNT Procedimiento normalizado de trabajo
PPC Población de Análisis por Protocolo Correcto
PS Población de seguridad
SP: sangre periférica

1. INFORMACIÓN GENERAL:

1.1. Título, número de identificación y fecha (número de modificación y fecha):

Título: Ensayo clínico Fase II para evaluar la seguridad y eficacia de la movilización y colecta de células CD34⁺ tras tratamiento con plerixafor y filgrastim en pacientes con anemia de Fanconi para su posterior transducción con un vector lentiviral portador del gen FANCA y reinfusión en el paciente.

Numero de identificación: FANCOSTEM-1

Fecha: 22-12-2011

Nº EudraCT: 2011-006197-88

1.2. Nombre y dirección del Promotor y Monitor (si es diferente del promotor)

PROMOTOR:

Nombre: Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron – Institut de Recerca (“VHIR”)

Dirección: Hospital Universitari Vall d'Hebrón,
Paseo Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035

Número de teléfono 1: 932 74 67 28

Número de teléfono 2:

MONITOR: SERMES CRO.

Dirección: C/ Rufino González 14, Esc. 1ª-2ºD, 28037 Madrid (Spain)

Número de teléfono 1: 913756930

Número de teléfono 2:

1.3 Nombre y cargo de la persona autorizada por el promotor para firmar el protocolo y las modificaciones al protocolo.

No procede

1.4 Nombre, cargo, dirección y números de teléfono de los expertos médicos (u odontólogos cuando proceda) del promotor del ensayo.

No Procede

1.5 Nombre y cargo de todos los investigadores responsables de la realización del ensayo y la dirección y números de teléfono de los centros del ensayo.

1.5.1 Investigador clínico principal en la institución que esponsoriza el ensayo multicéntrico:

Nombre: Dra. Cristina Díaz de Heredia

Cargo: Jefe de Sección. Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas. Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Dirección: Paseo Vall d'Hebron 119-129; Barcelona 08035

Número de teléfono 1: 934893093

Número de teléfono 2: 934893883

Investigadores clínicos colaboradores en Hospital Vall d'Hebron:

Dr. José Sánchez de Toledo. Jefe de Servicio. Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas

Dra. Izaskun Elorza. Facultativo especialista. Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas

Dra. Teresa Olivé. Facultativo especialista. Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas

Dra. Raquel Hladun. Becario. Facultativo especialista. Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas

Investigadores colaboradores en el Banc de Sang i Teixits.

Dra. Dolors Castellà. Jefe de Servicio Transfusiones. Banc de Sang i teixits

Dra. Micoia Pujol. Jefe de Sección Aféresis. Banc de Sang i Teixits

Dr. Gregorio Martin Henao. Jefe de Sección Procesamiento y Criopreservación. Banc de Sang i Teixits

Teléfono: 935573500

1.5.2 Investigador clínico principal en la institución que colaboradora del ensayo multicéntrico:

Nombre: Dr. Julián Sevilla

Cargo: Servicio de Oncohematología Pediátrica. Hospital del Niño Jesús.

Dirección: Menéndez Pelayo 65. Madrid 28009.

Número de teléfono 1: 915035938

Número de teléfono 2: 915035900

Investigadores clínicos colaboradores en Hospital del Niño Jesús:

Dr. Luis Madero. Jefe de Servicio. Servicio de Oncología y Hematología Pediátrica, Hospital Niño Jesús

Dr. María Guillén Gómez: Facultativo especialista. Servicio de Oncología y Hematología Pediátrica, Hospital Niño Jesús

1.5.3 Coordinador general de la investigación:

Nombre: Dr. Juan A. Bueren:

Cargo: Jefe de la División de Hematopoyesis y terapia Génica. CIEMAT/CIBERER.

Dirección: Avenida Complutense 22. 28040 Madrid

Número de teléfono 1: 91 346 6518

Número de teléfono 2: 91 346 2535

1.5.4 Investigadores asociados:

1.5.4.1 Especialistas clínicos asociados:

- Drs. Elena Cela y Cristina Beléndez. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.
- Dra Ángela Figuera: Hospital de La Princesa, Madrid.
- Dra. Isabel Badell: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.
- Dr Jesús Estella: Hospital Sant Joan de Deu. Barcelona.
- Drs Guillermo Sanz y Ángeles Dasí: Hospital Universitario la Fe, Valencia.

- Drs. Antonia Rodríguez-Villa y Pedro Gómez: Hospital Reina Sofía, Córdoba.
- Dra. María Tapia: Hospital General de La Palma: Santa Cruz de La Palma.
- Dr. Antonio Molinés: Hospital Materno Infantil, Las Palmas.
- Drs. Carlos Richard y Carlos Pipaón: Hospital Marqués de Valdecilla, Santander.

1.5.4.2. Investigadores preclínicos asociados:

CIEMAT/CIBERER:

- Coordinación: Dr. Juan A. Bueren
- Caracterizaciones funcionales y citométricas de las poblaciones hematopoyéticas movilizadas y recolectadas en las aféresis de los pacientes AF: Dra Paula Río, Dra Susana Navarro, Dr. Guillermo Guenechea, Dr José Carlos Segovia, D^a Mariluz Lozano, D. Israel Ormán
- Subtipado de los pacientes: Dr José Antonio Casado, D^a Laura Pérez
- Asesoramiento y controles en sala blanca: Dra. Maria Luisa Lamana

Universidad Autónoma de Barcelona/CIBERER

- Análisis genéticos y mutacionales: Dr Jordi Surrallés, D^a Roser Pujol, Dr Massimo Bogliolo.

Distribución de actividades:

- Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas del Hospital Universitario Vall d'Hebron junto con Banc de Sang i Teixits y Servicio de Oncohematología y Trasplante del Hospital Universitario Niño Jesús: Movilización y colecta de células madre hematopoyéticas.
- Cada uno de los Hospitales participantes en el estudio: Seguimiento y evaluación clínica de los pacientes.
- CIEMAT/CIBERER: Determinaciones del contenido de progenitores hematopoyéticos en las aféresis de los pacientes.
- Universidad Autónoma de Barcelona/CIBERER: Evaluaciones de citogenética y biología molecular:

1.6 Nombre, cargo, dirección y número de teléfono del médico cualificado (u odontólogo cuando proceda) que es responsable de todas las decisiones médicas (u odontológicas) en cada centro del ensayo (si es diferente del investigador).

No procede

1.7 Nombre y direcciones de los laboratorios clínicos y los departamentos médicos o técnicos o instituciones implicadas en el ensayo.

Laboratorios Clínicos y de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron
Laboratorios Clínicos y de Microbiología del Hospital Niño Jesús

2. JUSTIFICACIÓN

2.1. Nombre y descripción del medicamento en investigación:

2.1.1. Nombre del medicamento: Mozobil

Mozobil: 20 mg/ml solución inyectable.

2.1.1.1. Grupo farmacoterapéutico:

Otros inmunoestimulantes; código ATC: L03AX16

2.1.1.2. Composición cualitativa y cuantitativa:

1 ml de solución contiene 20 mg de plerixafor.

Cada vial contiene 24 mg de plerixafor en 1,2 ml de solución.

Excipientes: Cada ml contiene aproximadamente 5 mg (0,2 mmoles) de sodio.

2.1.1.3. Forma farmacéutica:

Solución inyectable. Solución transparente, de incolora a amarillo pálido, con un pH de 6,0-7,5 y una osmolalidad de 260-320 mOsm/kg.

2.1.1.4. Indicaciones terapéuticas:

Mozobil está indicado, en combinación con G-CSF, para potenciar la movilización de células madre hematopoyéticas a sangre periférica para su recogida y posterior trasplante autólogo en pacientes con linfoma y mieloma múltiple cuyas células se movilicen con dificultad

2.1.1.5. Mecanismo de acción

Plerixafor es un derivado biciclamo, antagonista selectivo reversible del receptor de quimiocina CXCR4 y bloquea la unión de su ligando afín, el factor derivado de células estromales 1 α (SDF-1 α), también conocido como CXCL12. Se cree que la leucocitosis inducida por plerixafor y las elevaciones de los niveles de células progenitoras hematopoyéticas en circulación son el resultado de una alteración de la unión de CXCR4 con su ligando afín, lo que da lugar a la aparición tanto de células maduras como pluripotentes en la circulación sistémica. Las células CD34⁺ movilizadas por plerixafor son funcionales y capaces de recuperarse, con capacidad de repoblación a largo plazo.

2.1.2. Nombre del medicamento: Neupogen

Neupogen: 30 MU (0,3 mg/ml) solución inyectable.

Filgrastim

2.1.2.1. Grupo farmacoterapéutico:

Citocinas: código ATC: L03AA02

2.1.2.2. Composición cualitativa y cuantitativa:

Cada vial contiene 30 millones de unidades (300 microgramos) de filgrastim en 1 ml (0,3 mg/ml)

Filgrastim (factor metionil-recombinante estimulador de las colonias de granulocitos humanos) se obtiene por tecnología DNA recombinante en *E. coli* (K12)

Excipiente con efecto conocido:

Cada ml de solución contiene de 0,0010 a 0,0022 mmol o de 0,023 a 0,051 mg de sodio y 50 mg de sorbitol (E4209)

2.1.2.3. Forma farmacéutica:

Solución inyectable. Concentrado para solución para perfusión. Solución transparente incolora

2.1.2.4. Indicaciones terapéuticas:

Neupogen está indicado para reducir la duración de la neutropenia y la incidencia de neutropenia febril en pacientes tratados con quimioterapia citotóxica convencional con enfermedades malignas (con la excepción de leucemia mieloide crónica y síndromes mielodisplásicos) y en la reducción de la duración de la neutropenia en los pacientes sometidos a tratamiento mieloablativo seguido de trasplante de médula ósea y que se considere presenten un mayor riesgo de experimentar neutropenia grave prolongada.

La eficacia y seguridad de Neupogen es similar en adultos y en niños que están recibiendo quimioterapia citotóxica.

Neupogen está indicado para la movilización de las células progenitoras de sangre periférica (PBPC).

En pacientes, tanto niños como adultos, con neutropenia congénita grave, cíclica o idiopática con un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) $\leq 0,5 \times 10^9/l$, y con una historia de infecciones severas o recurrentes, la administración prolongada de Neupogen está indicada para aumentar el recuento de neutrófilos y reducir la incidencia y duración de los acontecimientos relacionados con las infecciones.

Neupogen está indicado en el tratamiento de la neutropenia persistente (RAN igual o inferior a $1,0 \times 10^9/l$) en pacientes con infección avanzada por VIH para reducir el riesgo de desarrollar infecciones bacterianas cuando otras opciones para tratar la neutropenia no sean adecuadas.

2.1.2.5. Mecanismo de acción

Filgrastim actúa regulando la producción y liberación de neutrófilos funcionales de la médula ósea. Contiene r-metHuG-CSF que aumenta notablemente el recuento de neutrófilos en sangre periférica a las 24 h y escasamente el de monocitos.

2.2. Resumen de los hallazgos clínicos y no clínico que puedan ser relevantes para el ensayo actual:

2.2.1. Características clínicas de la Anemia de Fanconi (AF):

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva (excepto en los pacientes FA-B), en donde la supervivencia media de los pacientes se sitúa en torno a los 24 años [1, 2]. Al nacer, el recuento sanguíneo de estos pacientes es en general normal. La macrocitosis es a menudo la primera anormalidad hematológica detectada en estos pacientes. Esto generalmente evoluciona por trombocitopenia, anemia y pancitopenia. El fallo de médula ósea (FMO) de estos pacientes por lo general se observa a cabo de 5 - 10 años, siendo la edad media del inicio de la enfermedad hematológica los 7 años. Alrededor del 80% de los pacientes con AF desarrollará evidencias de fallo de médula ósea (FMO) en la primera década de la vida. Sobre la base de los actuales estudios epidemiológicos, si los episodios malignos no aparecen antes de la aplasia, prácticamente todos los pacientes con AF desarrollarán FMO a los 40 años de [1, 2], siendo este problema la principal causa de mortalidad de estos pacientes.

Debido a las complejas manifestaciones clínicas de la AF, los métodos utilizados para el tratamiento de estos pacientes se centran principalmente en la mejora de los síndromes siguientes:

- Fallo de médula ósea (FMO).
- Leucemia mieloide
- Tumores sólidos

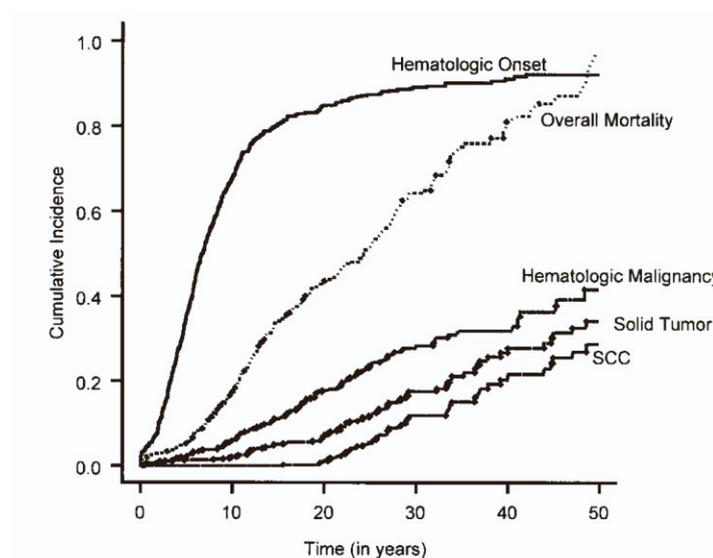


Figura 1: Incidencia acumulada de los principales problemas clínicos en pacientes con anemia de Fanconi [1, 2].

Cada uno de estos síndromes pueden tener lugar simultáneamente en un paciente FA como un síndrome único. Sin embargo, dos, o incluso los tres síndromes pueden ocurrir en un paciente FA, por lo que éste puede requerir múltiples intervenciones terapéuticas.

2.2.2. Terapias actuales para la Anemia de Fanconi:

Una revisión de los informes públicos europeos de evaluación (EPAR), así como de las páginas web siguientes: www.emea.europa.eu; www.eudrapharm.eu; www.hma.eu/mri.html; www.portalfarma.com y www.agemed.es, mostró que no existen medicamentos específicamente indicados para AF. Sin embargo, existen diferentes productos autorizados para el tratamiento de las manifestaciones parciales de la enfermedad. Por ejemplo, la eritropoyetina está indicada para la anemia, un fenómeno que se produce con frecuencia como resultado del FMO de pacientes con AF. Del mismo modo, otros factores de crecimiento han sido aprobados para el tratamiento de la neutropenia, también frecuente en pacientes con AF. Sin embargo, estos tratamientos farmacológicos están lejos de ser un tratamiento definitivo para pacientes con AF. Las limitaciones de cada una de las terapias actuales de pacientes con AF se recogen en la documentación del medicamento huérfano correspondiente al vector lentiviral portador del gen FANCA, cuyo promotor es el CIBER de Enfermedades raras [3].

- Andrógenos:

Los andrógenos, como los compuestos por fluoximesterona, Oximetolona o Estanozolol, no tienen indicaciones para AF, tal como se ha observado en las siguientes páginas web: www.emea.europa.eu; www.eudrapharm.eu; [www.hma.eu / mri.html](http://www.hma.eu/mri.html); www.portalfarma.com y www.agemed.es.

Tal como ha revisado recientemente Dufour y colaboradores [4], los pacientes de AF pueden tener una cierta respuesta a los andrógenos si este tratamiento se inicia en una fase no muy avanzada. Alrededor del 75% de los pacientes responden a los andrógenos. La combinación con prednisolona 2 mg/kg/día reduce el riesgo de toxicidad hepática. En general, los andrógenos pueden considerarse como un tratamiento alternativo, en caso de ausencia de un donante de médula adecuado, cuando exista cierta hematopoyesis residual, pero no como un tratamiento definitivo a largo plazo.

Tischkowitz también indicó que, aunque en las primeras etapas de la enfermedad los pacientes de FA pueden responder a los andrógenos, si bien la inmensa mayoría de los pacientes con AF son refractarios a estos tratamientos en largo plazo [5].

- Factores de crecimiento:

No existen indicaciones específicas de factores de crecimiento hematopoyético para la AF, tal como se ha observado en las siguientes páginas web: www.emea.europa.eu; www.eudrapharm.eu; [www.hma.eu / mri.html](http://www.hma.eu/mri.html); www.portalfarma.com y www.agemed.es. Sin embargo, se han identificado dos grupos farmacológicos de medicamentos con indicaciones para los síntomas específicos de la AF (anemia y neutropenia):

- Eritropoyetina: Diferentes eritropoyetinas están aprobadas para el tratamiento de la anemia.

- Los factores estimulantes de colonias de granulocitos (Filgrastim, biogastrin, pegfilgrastim) están aprobados para el tratamiento de la neutropenia.

Aunque los factores de crecimiento hematopoyético como las eritropoyetinas y los factores estimulantes de colonias de granulocitos, se han probado en un número limitado de pacientes con AF, las respuestas fueron parciales y transitorios [4]. En la actualidad, no representan una opción concreta en el largo plazo. En el corto plazo y en pacientes neutropénicos, G-CSF puede utilizarse en el caso de infecciones agudas con la intención de aumentar el número de neutrófilos)

- Trasplante de células hematopoyéticas (TCH):

En la actualidad, el trasplante hematopoyético alogénico es el único tratamiento que restaura definitivamente la hematopoyesis normal en pacientes con AF [6]. Tal como recientemente han revisado los Drs MacMillan y Wagner los primeros trasplantes en pacientes con AF fueron poco exitosos [7]. Durante las dos últimas décadas, las mejoras en el TCH han reducido la toxicidad relacionada con el trasplante, incluyendo la enfermedad injerto contra huésped (EICH), resultando en una mejor supervivencia. Los dos cambios fundamentales que influyeron en la mayoría de estas mejoras fueron

la inclusión de fludarabina con el régimen preparatorio, y la depleción de células T para reducir la EICH.

* TCH de donante hermano HLA idéntico:

Como han demostrado recientemente MacMillan y Wagner (véase **Tabla I**), el TCH de donante hermano HLA idéntico está generalmente asociado con un buen resultado si se realiza antes del desarrollo de un síndrome mielodisplásico o leucemia; en particular en la primera década de la vida. Con base en estos resultados, si un paciente tiene un donante sano HLA idéntico, el trasplante alogénico es considerado como la primera opción terapéutica cuando el paciente comienza a desarrollar síntomas de FMO o anomalías citogenéticas persistentes en la MO. Este tipo de pacientes, no se considera, por tanto, candidato a los primeros ensayos de terapia génica.

Sin embargo, debido a la gravedad de la EICH en pacientes con AF, el futuro de los ensayos de terapia genética también podría considerar el tratamiento de estos pacientes, con el fin de limitar los efectos secundarios asociados a un trasplante alogénico, como la infertilidad, cataratas, endocrinopatías, o riesgo de cáncer escamoso, lo cual es particularmente frecuente en adultos con AF.

Tabla I. Resultados clínicos de TCH en pacientes con AF a partir de donante hermanos HLA idéntico [7].

Reference	Conditioning regimen	No. of cases	Engrafted	Outcome (range)
Ebell (2002)	FLU 75–180 mg/m ² + ATG + OKT3	7	5	5/7 alive
Tan <i>et al</i> (2006)	FLU 125 mg/m ² + CY 20 mg/kg + ATG	11	10	100% alive at 2 years
Torjeman <i>et al</i> (2006)	CY 40 mg/kg + BU 6 mg/kg ± ALG	17	14	72% alive (median 16 months)
Ayas <i>et al</i> (2008)	CY 60 mg/kg + ATG	34	34	33 (median 33·7 months)
Ertem <i>et al</i> (2009)	BU 6 mg/kg + CY 40 mg/kg (<i>n</i> = 2) FLU 150 mg/kg + CY 20 mg/kg + ATG (<i>n</i> = 2)	8	8	7 (median 2·5 years)
Bonfim, personal communication*	CY 60 mg/kg	67	66	87% alive

ATG, antithymocyte globulin; BU, busulfan; OKT3, Muromonab-CD3; ALG, anti-lymphoglobulin; busulfan; CY, cyclophosphamide; FLU, fludarabine.

*C. M. Bonfim, personal communication updating Bonfim *et al* (2007); includes nine patients who received HLA-related (non-sibling) donor transplants.

* TCH de donantes alternativos:

Para los pacientes sin donante emparentado HLA idéntico - los que serán candidatos a terapia génica - la única alternativa terapéutica se basa en trasplantes hematopoyéticos de donantes alternativos.

Los TCH de donantes alternativos presentan peores resultados globales en comparación con los trasplantes de hermanos HLA idénticos, debido a las altas tasas de fracaso del injerto, reacción injerto contra huésped, e infecciones oportunistas (ver **Tabla II** y de [7]).

Los resultados de TCH de donantes no relacionados en pacientes AF han sido publicados por Wagner *et al*, en nombre del Registro Internacional de Trasplante de

Médula Ósea [8]. En su análisis multivariante, el uso de fludarabina (FLU) se asoció con una mayor probabilidad de injerto de neutrófilos. A 100 días post-trasplante, la tasa de mortalidad fue significativamente menor en los receptores de un régimen que contenía FLU (24% vs 65% respectivamente). A los 3 años, la supervivencia global fue de 52% vs 13%, respectivamente. Los factores asociados con una mayor supervivencia fueron: pacientes menores edad (<10 años), seronegatividad a CMV del receptor, historia de menos de 20 transfusiones de productos sanguíneos y uso de FLU en el régimen preoperatorio. Los datos publicados en las series más grandes de TCH en pacientes con AF trasplantados con donantes alternativos se resumen en la **Tabla II** (Guardiola et al, 2000; Gluckman et al, 2007; Wagner et al, 2007; Chaudhury et al, 2008; MacMillan et al, 2009).

En nombre de Eurocord-NETCORD y EBMT Gluckman y colaboradores [9] reportaron los resultados del trasplante de sangre de cordón umbilical de donante no emparentado en pacientes con AF (n = 93). La supervivencia global fue del 40% ± 5% con tasas de supervivencia más altas en pacientes seronegativos a CMV y en los receptores tratados con FLU y con unidades que contenían más de 4.9×10^7 células nucleadas por kg de peso corporal. La supervivencia en función de la compatibilidad de HLA fue de 74% ± 13% (6/6, n = 12), 48% ± 9% (5/6, n = 35) y 25 ± 7% (3-4/6, n = 45), lo que sugiere la conveniencia de evitar incompatibilidades HLA.

Más recientemente, los esfuerzos se han centrado en reducir o eliminar la irradiación en el régimen de acondicionamiento, incluso para pacientes que requieren TCH de donantes alternativos. En un protocolo de la Universidad de Minnesota, todos los pacientes recibieron ciclofosfamida (CY; 40 mg/kg), FLU (140 mg/m²), ATG (150 mg/kg) irradiación e irradiación corporal total (ICT) administrada en una única fracción. Los resultados obtenidos demostraron que la irradiación de 300 cGy era suficiente para conseguir el injerto.

Tabla II: Resultados clínicos del trasplante a partir de donantes alternativos en pacientes AF [7].

Reference	Conditioning regimen	GVHD prophylaxis	No. of cases	Recipient age (range)	Sustained engraftment	Acute GVHD	Survival
Guardiola <i>et al</i> (2000)	Varied	Varied	69	10-8 years (4-0-37-4 years)	83%*	34%	33% alive at 3 years
Wagner <i>et al</i> (2007)	Varied	Varied	98	12 years (0-8-33 years)	89% (FLU) 69% (no FLU)	21% (TCD) 70% (no TCD)	52% (FLU) at 3 years 13% (no FLU) at 3 years
Gluckman <i>et al</i> (2007)	Varied	Varied	93	8-6 (1-45 years)	60% ± 5%	32% ± 5%	74% ± 13% (HLA 6/6, n = 12) 48% ± 9% (HLA 5/6, n = 35) 25% ± 7% (HLA 3-4/6, n = 45)
Chaudhury <i>et al</i> (2008)	CY 40 mg/kg TBI 450 cGy rATG 10 mg/kg	TCD	21	21/21			14/21 alive
MacMillan <i>et al</i> (2009)	CY 40 mg/kg TBI 300/150 cGy with thymic shielding FLU 140 mg/m ² ATG 150 mg/kg	TCD + CSA	24	8-8 years (4-0-21-2 years)	22/22 (TBI 300 cGy) 0/2 (TBI 150 cGy)	3/22 0/2	19/22 alive 2/2 alive

CY, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; rATG, rabbit anti-thymocyte globulin; FLU, fludarabine; TCD, T cell depletion; TCD, CSA, cyclosporine A.

*Probability of secondary graft failure was 19%.

2.2.3. Justificación de la terapia génica con un vector lentiviral portador del gen FANCA, medicamento huérfano, como una nueva opción terapéutica para pacientes con AF sin un donante hermano HLA idéntico:

En comparación con el trasplante hematopoyético alogénico, la terapia génica de pacientes AF supone el trasplante de células hematopoyéticas autólogas corregidas genéticamente. Por lo tanto, en los pacientes tratados por terapia génica se prevendrá la aparición de EICH, que tanto compromete la supervivencia del paciente AF trasplantado. Además, mientras que para un trasplante alogénico se requiere una muy fuerte inmunosupresión del paciente para facilitar el injerto de las células alogénicas, el injerto de células autólogas corregidas posiblemente sólo requiere una modesta inmunosupresión, incluso ésta podría evitarse. Esta hipótesis deriva de la observación de las propiedades de repoblación de células AF que han revertido la mutación, ya sea por procesos naturales (pacientes mosaico) o por la terapia génica ex vivo. Estudios previos han demostrado que, en promedio, el 15% de los pacientes de AF son pacientes mosaico [10]. En estos pacientes la reversión genética de un gen FANCA mutado se produce en una célula progenitora, como consecuencia de lo cual se facilita la generación de células revertidas en sangre periférica. En algunos de estos pacientes se han alcanzado recuentos de sangre periférica normalizados como resultado de esta reversión genética, lo que demuestra la ventaja proliferativa de los precursores corregidos genéticamente por medio de procesos naturales [11, 12]. Asimismo, en nuestro laboratorio hemos demostrado que este proceso también se lleva a cabo en células madre hematopoyéticas (CMH) de ratones AF después de su corrección génica con vectores lentivirales [13]. Estas observaciones sugieren que las CMH transducidas con el medicamento huérfano propuesto también deberán desarrollar una ventaja proliferativa sobre las células endógenas del paciente, y se espera que restaure los contajes hematológicos de los pacientes tratados por terapia génica.

Para la realización de una terapia génica exitosa en AF es condición imprescindible la colecta de un número "suficiente" de CMH. Aunque en la actualidad se desconoce cual será el número de CMH corregidas para conseguir reestablecer la hematopoyesis en un paciente con AF no acondicionado, consideramos como valor recomendable la cifra de 4×10^6 CD34⁺/Kg de peso del paciente proyectado a 5 años.

2.2.4. Experiencia previa de colecta de progenitores CD34⁺ en pacientes FA:

Se han reportado 3 estudios en los que se describe la movilización de células hematopoyéticas de pacientes con anemia de Fanconi, subtipos C y A, [14-16]. En el primer estudio se realizaron 3-4 ciclos de extracción de células, seguidos de transducción e infusión de las células en 3 pacientes ($0.01-1.3 \times 10^6$ CD34⁺/Kg de peso del paciente). En el segundo, la extracción y el tratamiento de 2 pacientes fue único, con dosis de $4,5$ y $3,5 \times 10^5$ células CD34⁺. En el tercero se trataron dos pacientes sin alcanzarse una movilización suficiente que permitiese la colecta de CMH.

2.2.4.1. Ref [14]: Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with Fanconi anemia group C gene (FANCC). Liu et al. Human Gene Ther. 10: 2337-2346; 1999

PACIENTES: Se trata de un ensayo de terapia génica en 3 pacientes pediátricos y 1 adulto FA-C (11-29 años). En el trabajo se reportan los valores hematoológicos de los pacientes 1 y 4.

	Leucocitos/mm ³	ANC/ mm ³	Hg g/dL	plaquetas
Pac 1	2.800	532	8,2	25.000
Pac 4	2.000	1.000	11,8	114.000

En cada paciente se realizan 3-4 ciclos de terapia génica cada uno de los cuales suponía una colecta espaciada de 3-4 meses, seguido de purificación de las CD34⁺, transducción e infusión en el paciente.

Las colectas de sangre periférica movilizada se realizan tratando a los pacientes con G-CSF durante 5 días (10 mcg /Kg), seguido de 1-3 leucoaféresis. En cada procedimiento se procesaron entre 5-15 litros de sangre.

Para las colectas de M.O. se aspiró aproximadamente 1 L y se filtró previamente a su procesamiento.

La purificación de las células CD34⁺ se realizó con el sistema CellPro.

RESULTADOS: Tal como se muestra en la tabla III, la movilización y la colecta de células CD34⁺ fue muy variable entre pacientes.

Patient	Cycle No.	Circulating PB CD34 ⁺ cells after G-CSF (per µl)	Infused CD34 ⁺ cells	
			Total (×10 ⁶)	Dose (10 ⁶ /kg)
1	1	0–1.1	0.6	0.011
	2	0.7–3.4	0.8	0.02
	3	0	1.0	0.02
	4	0	0.12	0.003
2	1	43	28.1	0.46
	2	0.9–4.1	0.18	0.003
	3	33.6–116	56	0.85
	4	12–16	4.8	0.07
3	1	26–30	13.5	1.1
	2	92	20.4	1.9
	3	19–34	16	1.3

TABLA III: Valores de CD34⁺ movilizados e infundidos en 3 de los 4 pacientes que formaron parte de este ensayo clínico.

Ante las dificultades para movilizar las células CD34⁺, en el paciente 3 se realizó una colecta adicional de células CD34⁺ de la médula ósea.

Asimismo, en el paciente 4 la colecta se realizó únicamente de la M.O. El inóculo extraído fue de $7,5 \times 10^9$ células nucleadas y tan sólo se pudieron infundir un total de $1,13 \times 10^6$ células CD34⁺.

EFFECTOS ADVERSOS: La colecta de las células fue en general bien tolerada, aunque la ocurrencia de sangrado asociado a la colocación de los catéteres de aféresis fue notable, aunque no inesperada debido a la trombocitopenia preexistente. Incluso después de múltiples infusiones, no se observaron reacciones alérgicas, anafilácticas, o reacciones al suero fetal o al sobrenadante retroviral.

2.2.4.2. Ref [15]: Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia de Croop et al Blood 98: 2917-2921, 2001.

PACIENTES: Los 8 pacientes considerados en el estudio tenían evidencias de fallo de médula ósea. No obstante, ninguno de ellos tenía dos o más líneas celulares con disminuciones marcadas sobre valores de hemoglobina 8g/dL; Neutrófilos: 0.5×10^9 células/L y plaquetas 20.000×10^9 células/L

En este trabajo los pacientes fueron movilizados con 10 mcg /kg de G-CSF (Neupogen) por vía subcutánea una vez al día.

Inicialmente se pretendió llegar a 12 células CD34⁺/μL de sangre periférica para iniciar la aféresis. Sin embargo, tal objetivo fue poco realista, y el criterio para iniciar la aféresis se fijó en el 6 células CD34⁺/μL. Los pacientes que tras 15 días de tratamiento con G-CSF no lograron alcanzar 6 células CD34⁺/μL no se sometieron a aféresis.

El objetivo fue el de recoger un número razonable de células CD34⁺, que se estimó en 10^6 células CD34⁺/kg de peso proyectado a 5 años desde el momento de la colecta, considerando una pérdida del 50% asociada al proceso de purificación.

RESULTADOS: Todos los pacientes respondieron a G-CSF; sin embargo, sólo 6 de 8 pacientes alcanzaron el objetivo de 6 CD34⁺/μL para iniciar la aféresis.

El promedio de movilización con G-CSF fue de 10 ± 4 días (rango, 6-21 días) antes de la aféresis. En promedio se obtuvo un total de $11,9 \pm 4 \times 10^{10}$ células nucleadas y $11,3 \pm 3.7 \times 10^7$ células CD34⁺. Este último valor correspondía a una media de $2,6 \pm 0,9 \times 10^6$ células CD34⁺/kg de peso del paciente en el momento de la recogida y $1,9 \pm 0,4 \times 10^6$ células CD34⁺/kg de peso teórico proyectado a 5 años.

Para la colecta de este número de células fue necesario la realización de varios días de aféresis; en promedio 4 ± 3 días (rango: 2-8 días), procesándose una media de 23 ± 16 volúmenes de sangre.

Tras la colecta se reinfundieron plaquetas autólogas, en los casos en los que los valores de plaquetas del paciente fueran inferiores a 50.000 plaquetas/μL

EFFECTOS ADVERSOS: Cuatro de los 8 pacientes se quejaron de dolor suave de huesos y 4 se quejaron de síndrome griposo durante la movilización con G-CSF. Cinco pacientes requirieron un catéter central venoso para el procedimiento de aféresis. Tres de los pacientes requirió transfusiones de plaquetas después de aféresis (2, 3 y 5

unidades de donante), y en 3 casos se utilizaron productos de hematíes para la preparación de la máquina de aféresis.

2.2.4.3. Ref [16]: Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. Kelli et al. Molecular Therapy 15: 211-219; 2007

OBJETIVOS DEL ESTUDIO: En este trabajo se desarrollan dos ensayos clínicos en tándem para determinar la viabilidad de un proceso de recolección y purificación de un número suficiente de células CD34⁺ para su uso clínico futuro y, paralelamente, un ensayo clínico para evaluar la seguridad y la eficacia de la transferencia del gen terapéutico en pacientes AF del grupo de complementación A (FA -A).

PACIENTES: En este protocolo se incluyeron los siguientes pacientes:

- Pacientes del grupo de complementación AF-A
- Edad > 1 año
- Sin citopenias severas en sangre periférica definidas por Hb > 8,0 g/dL; neutrófilos > 750/mm³, o plaquetas > 30.000/mm³
- Sin anomalías citogenéticas o evidencias de síndrome mielodisplásico o leucemia en aspirados de médula ósea analizadas en un plazo de 3 meses anteriores a la colecta.

En los aspirados de médula ósea se determinó la viabilidad de alcanzar el objetivo de obtener > 2x10⁶ células CD34⁺/kg (peso previsto a 5 años) en colectas de 20 ml/kg de médula ósea, o alternativamente en aféresis de sangre periférica tras movilización con dosis altas de G-CSF.

Los pacientes y/o sus familias fueron informadas de los riesgos y beneficios relativos de cada procedimiento, permitiéndoles elegir entre los dos métodos de colecta de los progenitores hematopoyéticos.

La movilización se realizó con 16 mg/kg de G-CSF por vía subcutánea al día, durante 4 días. Los pacientes se movilizaron hasta un máximo de 4 días para alcanzar el objetivo propuesto (> 5 células CD34⁺/µL de sangre periférica). Los pacientes con menos de 5 células CD34⁺/µL en el día 5º de G-CSF fueron tratados con una dosis mayor de G-CSF (16 mcg /kg por vía subcutánea dos veces al día) hasta un máximo de 8 días.

Los pacientes que no pudieron movilizar > 5 células CD34⁺/µL de sangre periférica o en los que tras 4 días de aféresis no tenían el valor propuesto de células CD34⁺, fueron sometidos a una colecta de médula ósea entre 7-14 días después del tratamiento con G-CSF.

A partir de los inóculos frescos, se purificaron las células CD34⁺ mediante el sistema de inmunoselección de Miltenyi, CliniMacs. En un caso se purificó un producto previamente criopreservado que no rindió buenos resultados.

RESULTADOS: De un total de 54 pacientes con AF, 38 pacientes fueron sometidos a un aspirado y biopsia de médula ósea como parte de su evaluación clínica. 21 pacientes de entre 1,5 a 26 años mostraron citopenias leves en sangre periférica de acuerdo a los criterios definidos con anterioridad.

Siete pacientes se sometieron a la recogida y purificación de células CD34⁺. La colecta en médula ósea no permitió recoger el número propuesto de 2x10⁶ células CD34⁺/kg (peso proyectado a 5 años) en 3 de los 7 casos. En estos casos se recomendó la movilización con G-CSF para la aféresis de sangre periférica.

Dos pacientes recibieron 16 mg/kg de G-CSF durante 4 días, seguido de 4 días adicionales de G-CSF en 32 mg/kg. No obstante, el objetivo de movilización de protocolo, de 5 células CD34⁺/µL no se logró. Por lo tanto, la aféresis no se realizó. En estos pacientes se recogió la médula ósea 7-14 días después de terminar el tratamiento con G-CSF.

La colecta de células nucleadas fue la prevista en base a los aspirados de médula ósea. Sin embargo, la frecuencia de células CD34⁺ fue menor en 6 de 7 pacientes.

Tres de 4 pacientes alcanzaron más del 80% del objetivo propuesto a 5 años, y los cuatro alcanzaron una colecta de 2x10⁶ células CD34⁺/kg de peso actual. Los pacientes tratados con G-CSF en los que posteriormente se recogió la médula ósea, consiguieron superar, a diferencia de lo que ocurrió con aquellos que no recibieron G-CSF, el número de células CD34⁺ previsto por el análisis de aspirados de médula.

Aislamiento de células CD34⁺:

Las colectas con >10⁶ células CD34⁺/kg de peso futuro, o los pacientes participantes en el estudio de la transferencia génica que no cumplieron con estos criterios, o en los que el contenido de células CD34⁺ no estaba disponible en el momento de la selección fueron criopreservadas.

- La pureza de células CD34⁺ fue del 47-95%.
- La recuperación fue buena (48-133%) en 3 de los 4 productos frescos. Estos tres pacientes entraron en el ensayo en Fase I de transferencia génica.

EFFECTOS ADVERSOS: Un paciente desarrolló una infección localizada en el lugar del aspirado de médula ósea que requirió antibióticos por vía oral. La hemoglobina se redujo a 3,4-5,1 g/dL en los 3 pacientes que no recibieron transfusión de sangre. La hemoglobina volvió a los valores basales dentro de un mes de la colecta de médula ósea. Cuatro pacientes recibieron 10 ml/kg de transfusión de concentrados de hematíes durante el período perioperatorio.

2.2.5. Experiencia previa de colecta de progenitores CD34⁺ en pacientes no AF, pero con problemas para la colecta de células CD34⁺ :

2.2.5.1 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34⁺ en pacientes pediátricos con problemas para la colecta de células CD34⁺ con altas dosis de filgrastim

El efecto dosis de filgrastim ha sido demostrado en pediatría en varias publicaciones. En el H. del Niño Jesús se ha reportado la experiencia de un protocolo de movilización con G-CSF a 12 mcg /kg/12 horas durante cuatro días en pacientes pediátricos [17, 18]. En estos trabajos se demostró que los pacientes pediátricos no presentaban con este protocolo de movilización efectos adversos graves, y la frecuencia de mialgias y dolores musculares y/o cefalea y/o febrícula era baja (23%) comparada con la

frecuencia habitual de efectos adversos (> 80%) en la movilización de adultos. Además se observaba que las colectas se optimizaban al aumentar el número de células CD34⁺ al doble en sangre periférica en el 5º día de la movilización (40 vs 86 células CD34⁺/mcl –p=0,04-) tras el uso de G-CSF a altas dosis [18].

Por otra parte, la movilización de progenitores a sangre periférica con altas dosis de G-CSF (hasta dos dosis de 16 mc/Kg y día) fue empleada previamente por Kelly *et al* en pacientes con AF para optimizar la colecta, sin que se hayan reportado efectos adversos [16].

2.2.5.2 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34⁺ en pacientes con problemas para la colecta de células CD34⁺ con plerixafor:

En dos estudios en fase III controlados y aleatorizados, pacientes con linfoma no Hodgkin o mieloma múltiple recibieron 0,24 mg/kg de plerixafor o placebo cada noche antes de la aféresis [19, 20, 21]. Los pacientes recibieron dosis diarias matutinas de 10 µg/kg de G-CSF durante 4 días antes de la primera dosis de plerixafor o placebo y cada mañana antes de la aféresis. En las **Tablas IV y VI** se presentan las cantidades óptimas (5 ó 6 x 10⁶ células/kg) y mínimas (2 x 10⁶ células/kg) de células CD34⁺/kg durante un número determinado de días, así como las variables principales combinadas incluyendo el éxito del injerto; en las **Tablas V y VII** se presenta la proporción de pacientes que alcanzaron cantidades óptimas de células CD34⁺/kg por día de aféresis.

Tabla IV. Resultados de eficacia del estudio AMD3100-3101: movilización de células CD34⁺ en pacientes con linfoma no Hodgkin

Criterio de valoración de la eficacia ^b	Mozobil y G-CSF (n = 150)	Placebo y G-CSF (n = 148)	valor de p ^a
Pacientes que alcanzaron ≥ 5 x 10 ⁶ células/kg en ≤ 4 días de aféresis y prendimiento satisfactorio del injerto	86 (57,3%)	28 (18,9%)	< 0,001
Pacientes que alcanzaron ≥ 2 x 10 ⁶ células/kg en ≤ 4 días de aféresis y prendimiento satisfactorio del injerto	126 (84,0%)	64 (43,2%)	< 0,001

^a Valor de p calculado usando la prueba chi cuadrado de Pearson.

^b A nivel estadístico, un número significativamente mayor de pacientes alcanzó ≥ 5 x 10⁶ células/kg en ≤ 4 días de aféresis con plerixafor y G-CSF (n = 89; 59,3%) que con placebo y G-CSF (n = 29; 19,6%), p < 0,001; un número mayor estadísticamente significativo de pacientes alcanzó ≥ 2 x 10⁶ células/kg en ≤ 4 días de aféresis con Mozobil y G-CSF (n = 130; 86,7%) que con placebo y G-CSF (n = 70; 47,3%), p < 0,001.

Tabla V. Estudio AMD3100-3101: proporción de pacientes que alcanzaron ≥ 5 x 10⁶ células CD34⁺/kg por día de aféresis en pacientes con linfoma no Hodgkin

Días	Proporción ^a en Mozobil yG-CSF	Proporción ^a en placebo y G-CSF
------	-------------------------------------------	--------------------------------------------

	(n=147 ^b)	(n = 142 ^b)
1	27,9%	4,2%
2	49,1%	14,2%
3	57,7%	21,6%
4	65,6%	24,2%

^a Porcentajes determinados por el método de Kaplan Meier.

^b n incluye todos los pacientes que recibieron al menos un día de aféresis.

Tabla VI. Resultados de eficacia del estudio AMD3100-3102: movilización de células CD34+ en pacientes con mieloma múltiple

Criterio de valoración de la eficacia ^b	Mozobil y G-CSF (n = 148)	Placebo y G-CSF (n = 154)	valor de pa
Pacientes que alcanzaron $\geq 6 \times 10^6$ células/kg en ≤ 2 días de aféresis y prendimiento satisfactorio del injerto	104 (70,3%)	53 (34,4%)	< 0,001

^a Valor de p calculado usando la prueba estadística de Cochran-Mantel-Haenszel con datos agrupados por recuento de plaquetas inicial.

^b A nivel estadístico, un número significativamente mayor de pacientes alcanzaron $\geq 6 \times 10^6$ células/kg en ≤ 2 días de aféresis con Mozobil y G-CSF (n = 106; 71,6%) que con placebo y G-CSF (n = 53; 34,4%), p < 0,001; un número mayor estadísticamente significativo de pacientes consiguieron $\geq 6 \times 10^6$ células/kg en ≤ 4 días de aféresis con plerixafor y G-CSF (n = 112; 75,7%) que con placebo y G-CSF (n = 79; 51,3%), p < 0,001; a nivel estadístico, un número significativamente mayor de pacientes alcanzaron $\geq 2 \times 10^6$ células/kg en ≤ 4 días de aféresis con Mozobil y G-CSF (n = 141; 95,3%) que con placebo y G-CSF (n = 136; 88,3%), p = 0,031.

Tabla VII. Estudio AMD3100-3102: proporción de pacientes que alcanzaron $\geq 6 \times 10^6$ células CD34+/kg por día de aféresis en pacientes con mieloma múltiple

Días	Proporción ^a en Mozobil y G-CSF (n = 144 ^b)	Proporción ^a en placebo y G-CSF (n = 150 ^b)
1	54,2%	17,3%
2	77,9%	35,3%
3	86,8%	48,9%
4	86,8%	55,9%

^a Porcentajes determinados por el método de Kaplan Meier.

^b n incluye todos los pacientes que recibieron al menos un día de aféresis.

Terapia de rescate

En el estudio AMD3100-3101, 62 pacientes (10 del grupo plerixafor + G-CSF y 52 del grupo placebo + G-CSF), que no pudieron movilizar el número suficiente de células CD34⁺ y por tanto no prosiguieron para el trasplante, ingresaron en un procedimiento abierto de Rescate con plerixafor y G-CSF. De estos pacientes, el 55 % (34 de 62)

movilizó $\geq 2 \times 10^6$ /kg CD34⁺ células y se les realizó el trasplante con prendimiento satisfactorio. En el estudio AMD3100-3102, 7 pacientes (todos del grupo placebo + G-CSF) ingresaron en la terapia de Rescate. De estos pacientes, el 100% (7 de 7) movilizó $\geq 2 \times 10^6$ /kg CD34⁺ células y se les realizó el trasplante con prendimiento satisfactorio.

El investigador determinó la cantidad de células madre hematopoyéticas usadas para cada trasplante, por lo que no necesariamente se trasplantaban todas las células madre hematopoyéticas que se recogieron. En el caso de los pacientes trasplantados de los estudios en fase III, la mediana del tiempo hasta la recuperación de neutrófilos (10-11 días), la mediana del tiempo hasta la recuperación de plaquetas (18-20 días) y la durabilidad del injerto hasta 12 meses después del trasplante fueron similares en los grupos de plerixafor y placebo.

Los datos de movilización y recuperación procedentes de los estudios adicionales fase II (0,24 mg/kg de plerixafor administrados la noche o la mañana previas a la aféresis) en pacientes con linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin o mieloma múltiple fueron similares a los datos obtenidos en los estudios en fase III.

En los estudios controlados con placebo se evaluó el número de veces que aumentaba el recuento de células CD34⁺ en sangre periférica (células/ μ l) durante el periodo de 24 horas desde el día previo a la primera aféresis hasta justo antes de la primera aféresis (**Tabla VIII**). Durante ese periodo de 24 horas, la primera dosis de 0,24 mg/kg de plerixafor o placebo se administró de 10 a 11 horas antes de la aféresis.

Tabla VIII. Número de veces que aumenta el recuento de células CD34⁺ en sangre periférica tras la administración de Mozobil

Estudio	Mozobil y G-CSF		Placebo y G-CSF	
	Mediana	Media (DE)	Median ^a	Media (DE)
AMD3100-3101	5,0	6,1 (5,4)	1,4	1,9 (1,5)
AMD3100-3102	4,8	6,4 (6,8)	1,7	2,4 (7,3)

Efectos farmacodinámicos:

En los estudios farmacodinámicos en voluntarios sanos tratados con plerixafor en monoterapia, la movilización máxima de células CD34⁺ se observó de 6 a 9 horas después de la administración. En los estudios farmacodinámicos en voluntarios sanos con plerixafor junto con G-CSF administrado con una pauta posológica idéntica a la de los estudios en pacientes, se observó un incremento mantenido del recuento de células CD34⁺ en sangre periférica de 4 a 18 horas después de la administración de plerixafor, con una respuesta máxima entre 10 y 14 horas.

Población pediátrica:

La Agencia Europea de Medicamentos ha eximido al titular de la obligación de presentar los resultados de los ensayos realizados con plerixafor en niños de 0 a 1 año con mielosupresión provocada por quimioterapia utilizada para tratar tumores malignos, que requieren un trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas.

La Agencia Europea de Medicamentos ha concedido al titular un aplazamiento para presentar los resultados de los ensayos realizados con plerixafor en niños de 1 a 18 años con mielosupresión provocada por quimioterapia utilizada para tratar tumores

malignos, que requieren un trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (ver sección 4.2 para consultar la información sobre el uso en población pediátrica).

2.2.5.3 Experiencia previa de colecta de progenitores CD34⁺ en pacientes pediátricos con problemas para la colecta de células CD34⁺ con plerixafor y altas dosis de G-CSF filgrastim:

El uso de plerixafor en población pediátrica ya se ha publicado por distintos grupos aunque solo en series con escaso número de pacientes, bajo programas de uso compasivo. Nuestro grupo unió su experiencia a la de otros centros italianos, demostrando un escaso número de efectos adversos (solo dos pacientes los refirieron; uno dolor óseo que podría deberse al uso de filgrastim otro pesadillas la noche en que se administró el plerixafor). Es de interés señalar que en esta serie dos pacientes recibieron altas dosis de filgrastim (12 mcg/kg /12 horas/día) además de plerixafor. Estos pacientes fueron los que presentaron un incremento mayor del número de células CD34+ en sangre periférica [22].

2.3.: Resumen de los riesgos conocidos y potenciales, si los hubiera, para los seres humanos.

2.3.1. Efectos hematológicos

Hiperleucocitosis: La administración de mozobil junto con G-CSF aumenta el número de leucocitos circulantes, así como las poblaciones de células madre hematopoyéticas. Debe realizarse un control de los recuentos de leucocitos durante el tratamiento con mozobil. La administración de mozobil a pacientes con recuentos de neutrófilos en sangre periférica por encima de 50.000 células/ μ l debe basarse en el criterio clínico.

Trombocitopenia: La trombocitopenia es una conocida complicación de la aféresis y se ha observado en pacientes que reciben mozobil. Debe realizarse un control de los recuentos de plaquetas en todos los pacientes que reciben mozobil y están sometidos a aféresis.

Control mediante análisis clínicos: Deben controlarse los recuentos de leucocitos y plaquetas durante el uso de mozobil y durante la aféresis.

Reacciones alérgicas: Mozobil se ha asociado en raras ocasiones con posibles reacciones sistémicas relacionadas con la inyección subcutánea, como urticaria, edema periorbital, disnea o hipoxia (ver sección 4.8) Los síntomas respondieron a los tratamientos (p. ej., antihistamínicos, corticoesteroides, hidratación o suplemento de oxígeno) o desaparecieron espontáneamente. Deben tomarse las precauciones adecuadas debido a la posibilidad de que aparezcan estas reacciones.

Reacciones vasovagales: Tras las inyecciones subcutáneas se pueden producir reacciones vasovagales, hipotensión ortostática o síncope (ver sección 4.8). Deben tomarse las precauciones adecuadas debido a la posibilidad de que aparezcan estas reacciones.

Esplenomegalia: En estudios preclínicos en ratas se observaron pesos absolutos y relativos más altos del bazo, asociados a la hematopoyesis extramedular tras la administración subcutánea diaria prolongada de Mozobil (2 a 4 semanas) a dosis aproximadamente 4 veces superiores a la dosis recomendada en humanos.

En estudios clínicos no se ha evaluado específicamente el efecto de plerixafor sobre el tamaño del bazo de los pacientes. No se puede excluir la posibilidad de que mozobil junto con G-CSF cause esplenomegalia. Debido a la rarísima posibilidad de rotura esplénica tras la administración de G-CSF, debe evaluarse la integridad esplénica en los individuos que reciban Mozobil junto con G-CSF y que refieran dolor en la parte superior izquierda del abdomen y/o dolor escapular o de hombro.

Sodio: Mozobil contiene menos de 1 mmol de sodio (23 mg) por dosis, por lo que se considera esencialmente „exento de sodio“.

2.3.2. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

No se han realizado estudios de interacciones. Los ensayos *in vitro* evidenciaron que plerixafor no se metaboliza por las enzimas del citocromo P450 y no inhibe ni induce dichas enzimas. Mozobil no actuó como sustrato o inhibidor de la glicoproteína P en un estudio *in vitro*.

En los estudios clínicos en pacientes con linfoma no Hodgkin, la adición de rituximab al tratamiento de movilización con Mozobil y G-CSF no afectaba a la seguridad de los pacientes ni a la producción de células CD34+.

2.3.3. Fertilidad, embarazo y lactancia

Embarazo: No existen datos suficientes sobre la utilización de Mozobil en mujeres embarazadas.

Su mecanismo de acción farmacodinámico sugiere que plerixafor puede causar malformaciones congénitas cuando se administra durante el embarazo. Los estudios en animales han demostrado su teratogenicidad. No debe utilizarse Mozobil durante el embarazo a menos que la situación clínica de la mujer requiera el tratamiento con plerixafor.

Mujeres en edad fértil: Las mujeres en edad fértil deben utilizar medidas anticonceptivas eficaces durante el tratamiento.

Lactancia: Se desconoce si plerixafor se excreta en la leche humana. No se puede descartar el riesgo para el lactante. Debe interrumpirse la lactancia durante el tratamiento con plerixafor.

2.3.4. Otras reacciones adversas

Los datos de seguridad de la administración de Mozobil junto con G-CSF en pacientes oncológicos con linfoma y mieloma múltiple se obtuvieron de dos estudios en fase III controlados con placebo y de 10 estudios en fase II no controlados en 543 pacientes. A los pacientes mayoritariamente se les administraron dosis diarias de 0,24 mg/kg de plerixafor mediante inyección subcutánea. La exposición a plerixafor en estos estudios oscilaba de 1 a 7 días consecutivos (mediana = 2 días).

En los dos estudios en fase III en pacientes con linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple (AMD3100-3101 y AMD3100-3102, respectivamente), un total de 301 pacientes recibieron tratamiento en el grupo de Mozobil y G-CSF y un total de 292 pacientes fueron tratados en el grupo de placebo y G-CSF. Los pacientes recibieron dosis matutinas diarias de 10 µg/kg de G-CSF durante 4 días antes de la primera dosis de

plerixafor o placebo y cada mañana antes de la aféresis. En la **Tabla IX** se muestran las reacciones adversas que se produjeron con más frecuencia con Mozobil y G-CSF que con placebo y G-CSF y que se notificaron como relacionadas con el tratamiento en $\geq 1\%$ de los pacientes que recibieron mozobil durante la movilización de células madre hematopoyéticas y la aféresis y antes de la quimioterapia o tratamiento ablativo como preparación para el trasplante. Las reacciones adversas se enumeran según la frecuencia y clasificación por órganos y sistemas. Las frecuencias se definen según el siguiente criterio: muy frecuentes ($\geq 1/10$); frecuentes (de $\geq 1/100$ a $< 1/10$); poco frecuentes (de $\geq 1/1.000$ a $< 1/100$); raras (de $\geq 1/10.000$ a $< 1/1.000$); muy raras ($< 1/10.000$); frecuencia no conocida (no puede estimarse a partir de los datos disponibles).

Desde la quimioterapia o tratamiento ablativo como preparación para el trasplante hasta 12 meses después del trasplante, no se observaron diferencias significativas en la incidencia de reacciones adversas en los distintos grupos de tratamiento.

Tabla IX. Reacciones adversas producidas con más frecuencia con mozobil que con placebo y consideradas relacionadas con mozobil durante la movilización y aféresis en estudios en fase III

Trastornos del sistema inmunológico	
Poco frecuentes	Reacciones alérgicas*
Trastornos psiquiátricos	
Frecuentes	Insomnio
Trastornos del sistema nervioso	
Frecuentes	Mareos, cefalea
Trastornos gastrointestinales	
Muy frecuentes	Diarrea, náuseas
Frecuentes	Vómitos, dolor abdominal, molestias estomacales, dispepsia, distensión abdominal, estreñimiento, flatulencia, hipoestesia oral, sequedad de boca
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	
Frecuentes	Hiperhidrosis, eritema
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	
Frecuentes	Artralgia, dolor musculoesquelético
Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración	
Muy frecuentes	Reacciones en el lugar de inyección e infusión
Frecuentes	Fatiga, malestar

2.4. Descripción y justificación de la vía de administración, dosis, pauta de dosificación, y periodo de tratamiento

El tratamiento movilizador de células CD34⁺ será realizado y supervisado por un médico especialista en hematología y/o hematología pediátrica. Para calcular las dosis de plerixafor y G-CSF filgrastim se utilizará el peso del paciente medido en la semana previa a la primera administración de plerixafor.

El tratamiento con filgrastim se realizará con dosis de filgrastim de 12 mcg /Kg cada 12 horas y tendrá una duración máxima de 8 días. La utilización de una dosis de G-CSF superior a la estándar (10 mcg/Kg/día) se fundamenta en estudios previos realizados en pacientes pediátricos definidos como malos movilizadores de células CD34⁺ [17, 18].

Tal como se recomienda en la ficha técnica del producto, la dosis de plerixafor será de 0,24 mg/kg de peso/día. Se administrará mediante inyección subcutánea en un plazo de 2 a 8 horas antes de iniciar la aféresis y siempre después del tratamiento con G-CSF (ver figura 2). La cinética de movilización de células CD34⁺ a diferentes dosis de plerixafor se muestra en la figura 1 [19].

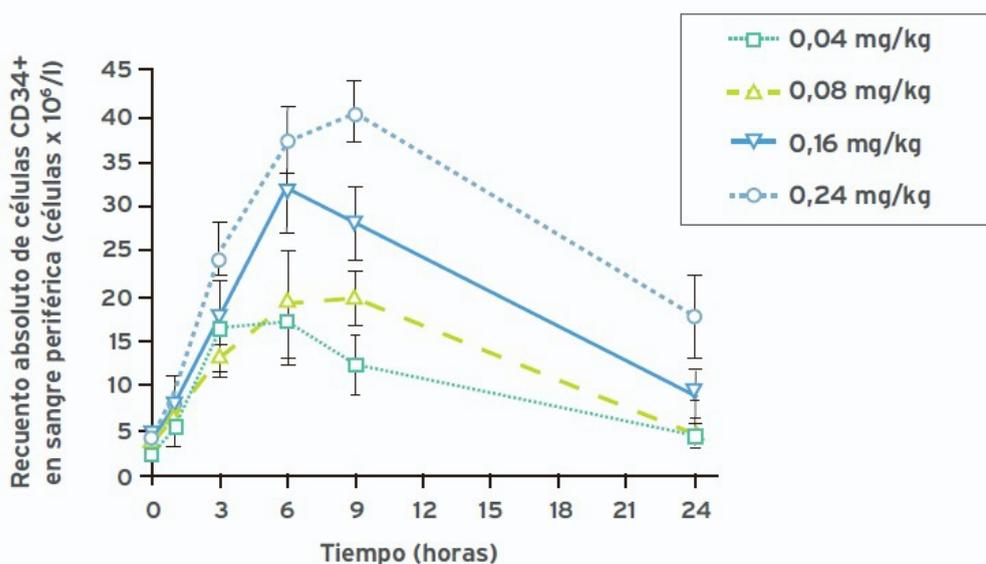


Figura 1. Movilización inducida por plerixafor en voluntarios sanos.

2.5. Declaración de que el ensayo será realizado de acuerdo al protocolo, la BPC, y los requisitos legales pertinentes:

El ensayo será realizado de acuerdo al protocolo, las guías de buena práctica clínica, y los requisitos legales pertinentes.

2.6. Descripción de la población a estudiar

Cualquiera de los pacientes con diagnóstico de AF que cumpla los criterios de inclusión será susceptible de entrar en este protocolo, independientemente del grupo de complementación, y de que se trate de pacientes pediátricos o adultos.

2.7. Referencias de la literatura y datos que sean relevantes para el ensayo y que proporcionen una justificación del mismo.

1. Butturini, A., Gale, R. P., Verlander, P. C., Adler-Brecher, B., Gillio, A. P., and Auerbach, A. D. (1994). Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 84: 1650-1655.

2. Kutler, D. I., et al. (2003). A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 101: 1249-1256.
3. Bueren, J. (2010). Lentiviral vector carrying the Fanconi anemia-A (FANCA) gene. *Orphan Medicinal Product Designation. Promoter: Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases Ref EU/3/10/822.*
4. Dufour, C., and Svahn, J. (2008). Fanconi anaemia: new strategies. *Bone Marrow Transplant* 41 Suppl 2: S90-95.
5. Tischkowitz, M., and Dokal, I. (2004). Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* 126: 176-191.
6. Gluckman, E., and Wagner, J. E. (2008). Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. *Bone Marrow Transplant* 41: 127-132.
7. Macmillan, M. L., and Wagner, J. E. (2010). Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol* Epub 2010 Feb 5.
8. Wagner, J. E., et al. (2007). Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* 109: 2256-2262.
9. Gluckman, E., et al. (2007). Results of unrelated cord blood transplant in fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 1073-1082.
10. Casado, J. A., et al. (2007). A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *J Med Genet* 44: 241-249.
11. Waisfisz, Q., et al. (1999). Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 22: 379-383.
12. Gregory, J. J., Jr., et al. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2532-2537.
13. Rio, P., et al. (2008). In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood* 112: 4853-4861.
14. Liu, J. M., et al. (1999). Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther* 10: 2337-2346.
15. Croop, J. M., et al. (2001). Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia. *Blood* 98: 2917-2921.
16. Kelly, P. F., et al. (2007). Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther* 15: 211-219.
- 17 - Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L, Garcia-Sanchez F, Diaz MA. Granulocyte colony stimulating factor alone at 12 microg/kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 417-420.
- 18- Sevilla J, González-Vicent M, Madero L, García-Sánchez F, Díaz MA. Large volume leukapheresis in small children: safety profile and variables affecting peripheral blood progenitor cell collection. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 263-267.
- 19- Mozobil (2010). Ficha Técnica. www.emea.europa.eu.
- 20- DiPersio, J. F., et al. (2009). Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* 113: 5720-5726.
- 21- Tricot, G., Cottler-Fox, M. H., and Calandra, G. Safety and efficacy assessment of plerixafor in patients with multiple myeloma proven or predicted to be poor mobilizers, including assessment of tumor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 45: 63-68.

22- Priming of Hematopoietic Progenitor Cells by Plerixafor Plus Filgrastim in Children With Previous Failure of Mobilization With Chemotherapy and/or Cytokine Treatment (Sevilla in press)

3. OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ENSAYO CLÍNICO PROPUESTO:

Objetivo principal:

- El objetivo principal es determinar la seguridad de la movilización de las células CD34+ tras el tratamiento con filgrastim y plerixafor en pacientes diagnosticados de Anemia de Fanconi para su posterior utilización en un ensayo de terapia génica de estos pacientes.

Objetivos secundarios:

- Determinar la eficacia de movilización de células CD34⁺ a sangre periférica en pacientes diagnosticados de Anemia de Fanconi tras el tratamiento con filgrastim y plerixafor.
- Determinar la eficacia de la colecta de células CD34⁺ en pacientes diagnosticados de Anemia de Fanconi tras el tratamiento con filgrastim y plerixafor.
- Determinar la eficacia de la selección de progenitores hematopoyéticos (células CD34⁺) del producto de aféresis obtenido mediante procedimiento inmunomagnético.

4. DISEÑO DEL ENSAYO:

Ensayo clínico exploratorio Fase II, abierto no randomizado y multicéntrico.

4.1 Descripción específica de las variables principales y secundarias, si las hubiera, que se evaluarán en el ensayo.

- **Variables principales:**

- Se clasificará la toxicidad del protocolo de movilización según los criterios comunes de toxicidad del National Cancer Institute (CTC NCI, versión 3.0). Anexo I

- **Variables secundarias:**

- Se determinará la eficacia de la movilización por el porcentaje de pacientes que alcancen en sangre periférica recuentos superiores a 5 células CD34⁺/microlitro.
- Se determinará la eficacia de la colecta de células CD34⁺ por el porcentaje de pacientes que alcancen tras las aféresis cuatro millones de células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años tras la movilización.
- Se determinará la eficacia de la selección de células CD34⁺ del producto obtenido tras aféresis, por el porcentaje de muestras en donde la recuperación de células CD34⁺ sea superior al 50%, y por el porcentaje final de células CD34⁺.
- Se determinará la eficacia del procedimiento global por el porcentaje de pacientes que alcancen cuatro millones de células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años, tras la selección inmunomagnética de todas las aféresis realizadas.

4.2 Una descripción del tipo/diseño del ensayo que se realizará (por ejemplo, doble ciego, controlado con placebo, diseño paralelo) y un diagrama esquemático del diseño del ensayo, procedimientos y periodos.

Ensayo clínico exploratorio Fase II, abierto no randomizado y multicéntrico.

4.2.1. Principales etapas del protocolo:

Evaluación	Movilización	Colecta	Seguimiento
------------	--------------	---------	-------------

Evaluación: Se evaluará a los pacientes antes de iniciar el tratamiento obteniendo de ellos el consentimiento informado previamente.

La evaluación se realizará en el plazo de 1 mes respecto al comienzo de la movilización, a través de una exploración física habitual (incluido peso y talla) un recuento de células de sangre periférica, una bioquímica básica, y la realización de un aspirado de médula ósea para la determinación de cantidad de células CD34⁺, descartar mosaicismo, y descartar mielodisplasia y alteraciones clonales significativas.

Movilización: Se realizará con filgrastim 12 mcg /kg/ 12 horas y a partir del cuarto día plerixafor 240 mcg/kg/día hasta completar la colecta. Una vez comenzado el tratamiento con filgrastim se realizarán controles de células CD34⁺ en sangre periférica a partir del cuarto día y hasta que finalice la última aféresis.

Colecta: Se realizará la colecta con el separador celular habitual en cada centro y de acuerdo a los protocolos de cada uno de ellos. Se iniciarán las colectas en cuanto el paciente supere la cifra de 5 células CD34⁺ circulantes en sangre periférica. Deben procesarse al menos tres volemias del paciente y no más de seis, en cada jornada. Se realizarán un máximo de cuatro colectas, si bien a discreción del médico responsable de la colecta del paciente se podría realizar una aféresis más para alcanzar el objetivo proyectado a 5 años, si con ello se cree posible alcanzar ese objetivo. La cosecha finalizará cuando se alcance el objetivo de 4×10^6 células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años por el percentil 50 de peso del paciente para aquel momento.

Selección de células CD34⁺

Se realizará de acuerdo al procedimiento habitual empleado en los centros de referencia mediante tecnología de selección inmunomagnética (Miltenyi Biotec). Se realizarán contajes de poblaciones celulares antes y después del procedimiento para valorar su eficacia. Se realizarán también el resto de controles de calidad habituales en los centros que al menos deberán incluir estudios de viabilidad celular de los progenitores y estudios microbiológicos que descarten contaminaciones microbiológicas.

Seguimiento:

Se prevé que el paciente será dado de alta al finalizar la última aféresis. Una vez dado el paciente de alta médica, se realizarán controles hematológicos a las 2 semanas de la última aféresis (en el centro donde se realizó la colecta), a los 2 meses, a los 6 meses y a los 9 meses (en el centro de referencia del paciente si su médico es investigador del ensayo, o en el de la colecta).

Al año (± 30 días) de realizada la última aféresis, se realizará un examen físico completo, recuento celular sanguíneo, bioquímica básica y un aspirado de la médula ósea del paciente para control.

4.3 Descripción de las medidas tomadas para minimizar o evitar sesgos, tales como aleatorización o enmascaramiento.

No proceden por tratarse de un estudio abierto en el que el tratamiento es conocido por el investigador y el paciente.

4.4 descripción de los tratamientos del ensayo y de la dosis y pauta de tratamiento del medicamento(s) en investigación. Además, deberá incluir una descripción de la forma farmacéutica, envasado y etiquetado del medicamento(s) en investigación.

4.4.1.: Dosis y Pauta de Tratamiento:

Para calcular las dosis de plerixafor y filgrastim se utilizará el peso del paciente medido durante la semana previa a la primera administración de plerixafor.

El tratamiento con filgrastim se realizará con dos dosis diarias de 12 µg/Kg/12horas y tendrá una duración máxima de 8 días.

La dosis de plerixafor será de 0,24 mg/kg de peso/día. Se administrará mediante inyección subcutánea en un plazo de 2 a 8 horas antes de iniciar la aféresis y siempre después del tratamiento con filgrastim a partir del cuarto día.

Hasta que no se alcance la cifra de 5 células CD34⁺/µL, se mantendrá el tratamiento hasta un máximo de 8 días de filgrastim y cuatro dosis de plerixafor.

4.4.2. Forma farmacéutica, envasado y etiquetado del medicamento:

Se utilizarán los fármacos comercializados cuya descripción se expone a continuación y se adjunta la ficha técnica de ambos en el Anexo II

En cualquier caso el etiquetado del producto cumplirá el anexo 13 de la normativa NCF:

- código de referencia del ensayo que permita identificar al ensayo, el centro, investigador, y promotor
- nombre del investigador
- número de lote
- forma farmacéutica, vía de administración, número de unidades, nombre /identificación del producto, concentración/ potencia;
- número de identificación del sujeto del ensayo/número de tratamiento
- instrucciones de uso dirigido a la persona que administre el producto)
- “exclusivamente para ensayo clínico”
- condiciones de conservación
- periodo de validez (fecha de uso, fecha de caducidad) en formato mes/año y de forma que se eviten ambigüedades
- “manténgase fuera del alcance de los niños

4.4.2.1 Nombre del medicamento

Mozobil 20 mg/ml solución inyectable
Plerixafor

- Principio(s) activo(s)

Cada ml contiene 20 mg de plerixafor.

Cada vial contiene 24 mg de plerixafor en 1,2 ml de solución.

- Lista de excipientes

Excipientes: cloruro sódico; ácido clorhídrico (concentrado) e hidróxido sódico para el ajuste del pH; agua para preparaciones inyectables. Para mayor información consultar el prospecto

- Forma farmacéutica y contenido del envase

Solución inyectable

1 vial

24 mg/1,2 ml

- Forma y vía(s) de administración

Vía subcutánea. Para un solo uso.

- Advertencia especial de que el medicamento debe mantenerse fuera de la vista y del alcance de los niños

Mantener fuera del alcance y de la vista de los niños.

- Condiciones especiales de conservación

Mantener fuera del alcance y de la vista de los niños.

No usar Mozobil después de la fecha de caducidad que aparece en el envase y en el vial.

No requiere condiciones especiales de conservación.

Una vez abierto el vial, Mozobil debe utilizarse inmediatamente.

- Precauciones especiales de eliminación del medicamento no utilizado y de los materiales derivados de su uso (cuando corresponda)

La solución no utilizada debe eliminarse.

- Nombre y dirección del titular de la autorización de comercialización

Genzyme Europe B.V.

Gooimeer 10

NL-1411 DD Naarden

Países Bajos

- Número(s) de autorización de comercialización

EU/1/09/537/001

4.4.2.2. Nombre del medicamento

Neupogen 30 MU (0,3 mg/ml) solución inyectable

filgrastim

- Forma farmacéutica y contenido del envase

Solución inyectable.

Cada vial contiene 30 millones de unidades (300 microgramos) de filgrastim en 1 ml (0,3 mg/ml)

- Lista de excipientes

Acetato de sodio*

Sorbitol (E420)

Polisorbato 80

Agua para preparaciones inyectables

*El acetato de sodio se forma durante la valoración del ácido acético glacial con hidróxido de sodio

Cada ml de solución contiene de 0,0010 a 0,0022 mmol o de 0,023 a 0,051 mg de sodio y 50 mg de sorbitol (E420).

- Incompatibilidades

Neupogen no debe diluirse en soluciones salinas.

El filgrastim diluido, puede adsorberse al vidrio y materiales plásticos.

Este medicamento no debe mezclarse con otros productos excepto glucosa al 5% y albúmina.

- Periodo de validez

30 meses.

La estabilidad química y física de la solución diluida para perfusión ha sido demostrada durante 24 horas almacenada entre 2°C y 8°C. Desde el punto de vista microbiológico, el producto debe ser usado inmediatamente. Si no se usa inmediatamente, el tiempo y las condiciones de almacenamiento de la solución diluida son responsabilidad del usuario y normalmente no deberían sobrepasar las 24 horas entre 2°C y 8°C, a no ser que la dilución se haya realizado bajo condiciones de asepsia validadas y controladas.

- Precauciones especiales de conservación

Conservar entre 2°C y 8°C

Para las condiciones de conservación del medicamento diluido, ver sección anterior.

La exposición accidental a temperaturas de congelación no afecta de forma adversa a la estabilidad de Neupogen.

- Naturaleza y contenido del envase

Envase con 1 ó 5 viales de 1 ml de Neupogen solución inyectable.

Los viales son de vidrio tipo I con tapones de goma.

- Precauciones especiales de eliminación y otras manipulaciones

Neupogen se puede diluir, si es necesario, en glucosa al 5%.

No se recomienda en ningún caso diluir a concentraciones finales inferiores a 0,2 MU (2 µg) por ml.

La solución debe inspeccionarse visualmente antes de usarla. Solamente deben utilizarse soluciones transparentes sin partículas.

Si filgrastim se diluye a concentraciones inferiores a 1,5 MU (15 µg) por ml, debe añadirse albúmina sérica humana (ASH) a una concentración final de 2 mg/ml.

Ejemplo: si el volumen de inyección final es de 20 ml y la dosis total de filgrastim inferior a 30 MU (300 µg), deben administrarse 0,2 ml de una solución de albúmina humana al 20% .

Neupogen no contiene conservantes. En vista de un posible riesgo de contaminación microbiana, las jeringas precargadas de Neupogen son para uso único.

Neupogen, diluido en glucosa al 5%, es compatible con el vidrio y diversos plásticos como PVC, poliolefina (copolímero de polipropileno y polietileno) y polipropileno.

La eliminación del medicamento no utilizado y de todos los materiales que hayan estado en contacto con él, se realizará de acuerdo con la normativa local.

- Forma y vía(s) de administración

Vía subcutánea. También puede ser administrado por vía iv

- Titular de la autorización de comercialización

Amgen Europe B.V.

Minervum 7061

4817 ZK Breda
 Países Bajos

- Números de la autorización de comercialización
 59.102

4.5 duración esperada de la participación de los sujetos y una descripción de la secuencia y duración de todos los periodos del ensayo, incluyendo el seguimiento, cuando proceda.

Período de reclutamiento: 3 años a partir de la inclusión del primer paciente

Período de seguimiento: 1 año tras la movilización

Periodos del ensayo:

Evaluación	Movilización	Colecta/selección progenitores	Seguimiento
------------	--------------	--------------------------------	-------------

A partir de ese momento el paciente habrá finalizado su participación en el ensayo, y continuará con controles rutinarios por su médico especialista.

4.5.1. Calendario de evaluaciones.

	Pre-tratamiento	Durante el tratamiento	Post-tratamiento				
			15 días	2m	6m	9m	12m
Procedimiento		Desde el 4º día de tratamiento y hasta fin de tratamiento					
Consentimiento informado	X						
Criterios inclusión/exclusión	X						
Test embarazo (mujeres edad fértil)	X						
Exploración física/Peso y Talla	X						X
Hemograma	X	diariamente	X	X	X	X	X
Bioquímica	X						
Aspirado médula ósea: determinación CD34, descartar mosaicismo, mielodisplasia y alteraciones clonales	X						X
Colocación catéter aféresis		Entre el día 1 y 4 de tratamiento					
CD34 en sangre periférica		diariamente					

4.6 descripción de los “criterios de finalización” y de los “criterios de interrupción”, de parte o durante todo el estudio o de los sujetos.

Los pacientes serán excluidos ó abandonarán su participación en el estudio por cualquiera de las siguientes razones:

- Retirada del consentimiento por parte del paciente.
- Evidencia de progresión de la enfermedad.
- Desarrollo de toxicidad inaceptable a juicio del investigador.
- Si se considera de interés para el paciente un cambio en el tratamiento por pérdida del beneficio clínico, según el criterio del investigador.

Todos los casos de retirada de un paciente del estudio deberán de documentarse en el apartado Fin de Estudio del Cuaderno de Recogida de Datos.

Deberá registrarse en el Cuaderno de Recogida de Datos la fecha y el motivo por el que un sujeto interrumpe el ensayo clínico. Se define como interrupción cuando un sujeto incluido finaliza su participación en el ensayo clínico antes de completar el protocolo, independientemente de las circunstancias. Deberá notificarse inmediatamente al monitor la circunstancia de la discontinuación si esta ha sido un:

Acontecimiento Adverso Grave.

Los sujetos que hayan discontinuado el tratamiento del estudio como consecuencia de acontecimientos adversos recibirán un tratamiento alternativo adecuado y el investigador deberá registrar el motivo de la discontinuación del estudio, facilitar o programar un seguimiento adecuado (si es necesario) de estos sujetos y documentar la evolución del estado del sujeto. También deberán registrarse todas las medicaciones que empiecen a administrarse desde el momento de la discontinuación hasta la visita final en el apartado de medicación concomitante del Cuaderno de Recogida de Datos.

El paciente tiene derecho de discontinuar el estudio en cualquier momento que lo desee y cualquier paciente puede ser retirado del estudio por cualquier motivo beneficioso para su bienestar.

Según la buena práctica clínica, a todos los pacientes que abandonen prematuramente el estudio se les tendrá que recomendar un tratamiento alternativo. Si la retirada es debida a un acontecimiento adverso significativo, los pacientes serán controlados por el investigador o su designado(a) hasta la finalización adecuada, es decir, hasta que desaparezca el acontecimiento adverso o hasta que se determine que es permanente.

4.7 Procedimientos para contabilizar (reconciliar) el medicamento en investigación, incluyendo el placebo y el comparador, si lo hubiera.

Los Servicios de Farmacia de cada uno de los centros se encargarán de custodiar la medicación del ensayo y la dispensarán a petición del investigador principal para los pacientes incluidos en el mismo

4.8 Mantenimiento de los códigos de aleatorización del tratamiento del ensayo y los procedimientos para la apertura de los mismos.

No procede al ser un estudio abierto

4.9 identificación de todos los datos que deban ser recogidos directamente en el CRD y que deban ser considerados como dato fuente (es decir, no existe ningún registro escrito o electrónico de los datos).

Las historias clínicas de los pacientes serán los documentos fuente en este ensayo.

4.10 definición de lo que se considerará *final del ensayo*, proporcionando una justificación cuando esta fecha no sea la de la última visita del último sujeto reclutado.

El final del ensayo vendrá definido por la fecha de la última visita del último sujeto reclutado.

5. SELECCIÓN Y RETIRADA DE SUJETOS

Se ha previsto el reclutamiento de 10 pacientes realizándose la movilización y colecta en dos Centros, Hospital Vall d'Hebrón y Hospital Universitario Niño Jesús. Los pacientes podrán ser de cualquier raza o sexo. Antes de entrar en el estudio, los pacientes y/o sus familias en el caso de que se trate de pacientes pediátricos, deberán otorgar su consentimiento por escrito y cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión.

5.1. Criterios de Inclusión de los sujetos:

Sólo podrán entrar en este estudio aquellos sujetos que cumplan todos los criterios siguientes en el momento de la evaluación inicial:

- Pacientes con diagnóstico de AF confirmado por un test de inestabilidad cromosómica con diepoxibutano o mitomicina C
- Edad > 1 año.
- Al menos uno de los siguientes parámetros debe superar los valores indicados: Hemoglobina: 8,0 g/dL; Número de neutrófilos: 750/mm³; Número de plaquetas: 30.000/mm³.
- Índice de Lansky > 60%.
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo >50%.
- Otorgar consentimiento informado de acuerdo con la normativa legal vigente.
- Las mujeres en edad fértil deberán obtener un resultado negativo en la prueba de embarazo en suero o en orina en la visita de selección, y aceptar el empleo de métodos anticonceptivos adecuados al menos desde los 14 días previos a la primera dosis del tratamiento movilizador hasta los 14 días siguientes a la última.

5.2. Criterios de exclusión de los sujetos

Solamente podrán entrar en el estudio si no cumplen ninguno de los siguientes criterios en el momento de la evaluación inicial:

- Evidencias de síndrome mielodisplásico o leucemia, o anomalías citogenéticas predictivas de las mismas en aspirados de médula ósea. En este caso se darán por válidos estudios realizados con dos meses de antelación a la evaluación inicial.
- Pacientes con proceso infeccioso activo u otro estado médico subyacente grave.
- Alteración funcional de órganos (hepática, renal, respiratorio) grave (≥3), según los criterios del National Cancer Institute (NCI CTCAE v3).
- Haber recibido trasplante hematopoyético.
- Toda enfermedad o proceso concomitante que, en opinión del investigador, incapacite al sujeto para su participación en el estudio.
- Pacientes que tras una evaluación psico-social se censuran como no aptos para el procedimiento.
- Haber recibido soporte transfusional en los tres meses previos.
- Mujeres embarazadas o en período de lactancia

5.3. Criterios de retirada de los sujetos (es decir, finalizar el tratamiento del ensayo) y los procedimientos que especifican:

Se define como interrupción cuando un sujeto incluido finaliza su participación en el ensayo clínico antes de completar el protocolo, independientemente de las circunstancias.

El paciente tiene derecho de discontinuar el estudio en cualquier momento que lo desee y cualquier paciente puede ser retirado del estudio por cualquier motivo beneficioso para su bienestar.

a) Cuándo y cómo retirar a los sujetos del ensayo o del tratamiento con el medicamento en investigación.

Un paciente será retirado del ensayo clínico cuando una vez reclutado, concurra alguna de las siguientes circunstancias:

- Cuando el paciente no coopere o no cumpla los requerimientos del estudio.
- Cuando el investigador considere que la salud del paciente está comprometida debido a reacciones adversas, enfermedades concomitantes o cualquier otra circunstancia que se presente durante el estudio.
- Acontecimiento(s) adverso(s).
- Violación del protocolo.
- Que el paciente retire el consentimiento.
- Pérdida de seguimiento.

b) El tipo de datos y el calendario en que se recogerán los datos de los sujetos retirados.

Deberá registrarse en el Cuaderno de Recogida de Datos la fecha y el motivo por el que un sujeto interrumpe el ensayo clínico. Deberá notificarse inmediatamente al monitor designado la circunstancia de la discontinuación si esta ha sido un Acontecimiento Adverso Grave.

Los sujetos que hayan discontinuado el tratamiento del estudio como consecuencia de acontecimientos adversos recibirán un tratamiento alternativo adecuado y el investigador deberá registrar el motivo de la discontinuación del estudio, facilitar o programar un seguimiento adecuado (si es necesario) de estos sujetos y documentar la evolución del estado del sujeto. También deberán registrarse todas las medicaciones que empiecen a administrarse desde el momento de la discontinuación hasta la visita final en el apartado de medicación concomitante del Cuaderno de Recogida de Datos.

c) Si van a ser reemplazados los sujetos y cómo se realizará.

Los sujetos retirados del ensayo podrán ser sustituidos por otros que cumplan criterios de inclusión hasta completar el número total de sujetos del estudio.

d) El seguimiento de los sujetos retirados del ensayo o del tratamiento con el medicamento en investigación

Según la buena práctica clínica, a todos los pacientes que abandonen prematuramente el estudio se les tendrá que recomendar un tratamiento alternativo. Si la retirada es debida a un acontecimiento adverso significativo, los pacientes serán controlados por el investigador o su designado(a) hasta la finalización adecuada, es decir, hasta que desaparezca el acontecimiento adverso o hasta que se determine que es permanente.

6. TRATAMIENTO DE LOS SUJETOS:

6.1.: Los tratamientos que se administrarán, incluyendo el nombre de todos los medicamentos, la dosis, esquema de dosificación, la vía o modo de administración, y los periodos de tratamiento incluyendo los periodos de seguimiento para los sujetos de cada grupo o brazo de tratamiento del ensayo:

Para calcular las dosis de Mozobil y Neupogen se utilizará el peso del paciente medido en la semana previa a la primera administración de Mozobil.

El tratamiento con Neupogen se realizará con dos dosis diarias de (12 µg/Kg/12 horas) y tendrá una duración máxima de 8 días.

La dosis de Mozobil será de 0,24 mg/kg de peso/día. Se administrará mediante inyección subcutánea en un plazo de 2 a 8 horas antes de iniciar la aféresis y siempre después del tratamiento con G-CSF a partir del cuarto día.

Hasta que no se alcance la cifra de 5 células CD34⁺/µL, se mantendrá el tratamiento hasta un máximo de 8 días de Neupogen y cuatro dosis de Mozobil.
(Ver Figura 2).

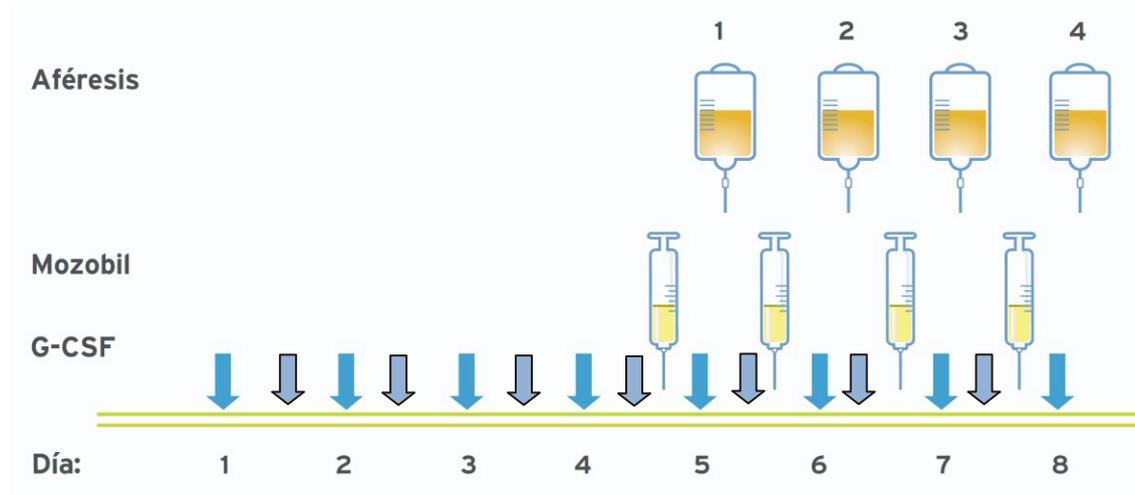


Figura 2. Esquema de movilización y aféresis propuesto

6.2. Medicamentos o tratamientos permitidos (incluyendo la medicación de rescate) y no permitidos antes y/o durante el ensayo.

En el momento de iniciar el estudio, los pacientes continuarán recibiendo las medicaciones concomitantes que les haya prescrito su médico, los cuales deben recogerse en el Cuaderno de Recogida de Datos. Además se deberán registrar todos los procedimientos diagnósticos, terapéuticos o quirúrgicos realizados durante el periodo del estudio, incluyendo la fecha, indicación, descripción del procedimiento y todos los hallazgos clínicos.

Se proporcionará a todos los pacientes las medidas paliativas y de soporte que sean necesarias para el tratamiento de los síntomas relacionados con la enfermedad.

Estarán prohibidos durante la realización del ensayo todos los tratamientos que se consideren experimentales excepto la entrada en ensayo clínico de terapia génica para el que se estarán recogiendo las CMH.

7. VALORACIÓN DE LA EFICACIA

7.1 La especificación de los parámetros de eficacia

Los parámetros a analizar para determinar la eficacia del procedimiento de movilización de CMHs son los siguientes:

- Se determinará la eficacia de la movilización por el porcentaje de pacientes que alcancen en sangre periférica recuentos superiores a 5 células CD34⁺/microlitro.
- Se determinará la eficacia de la colecta de células CD34⁺ por el porcentaje de pacientes que alcancen tras las aféresis 4 millones de células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años tras la movilización.
- Se determinará la eficacia de la selección de células CD34⁺ del producto obtenido tras aféresis, por el porcentaje de muestras en donde la recuperación de células CD34⁺ sea superior al 50%, y por el porcentaje final de células CD34⁺.
- Se determinará la eficacia del procedimiento global por el porcentaje de pacientes que alcancen 4 millones de células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años, tras la selección inmunomagnética de todas las aféresis realizadas.

7.2 Los métodos y el calendario para la evaluación, registro y análisis de los parámetros de eficacia.

Todos los datos referentes a los pacientes del ensayo serán recogidos en el cuaderno de recogida de datos que se ha diseñado específicamente para este estudio.

7.2.1. Período INCLUSIÓN:

Se evaluará a los pacientes antes de iniciar el tratamiento obteniendo de ellos el consentimiento informado previamente.

Una vez obtenido se hará una evaluación del paciente para comprobar que cumple los criterios de inclusión y exclusión del estudio.

La evaluación se realizará en el plazo de 30 días previos al comienzo de la movilización a través de una exploración física habitual (incluido peso y talla) un recuento de células de sangre periférica, una bioquímica básica, y la realización de un aspirado de médula ósea para la determinación de cantidad de células CD34⁺, descartar mosaicismo, y descartar mielodisplasia y alteraciones clonales significativas.

7.2.2. Período de MOVILIZACIÓN:

Se realizará con Neupogen 12 µg /kg/ 12 horas y a partir del cuarto día Mozobil 240 µg/kg/día hasta completar la colecta. Una vez comenzado el tratamiento con G-SCF se realizarán controles de células CD34⁺ en sangre periférica a partir del cuarto día y hasta que finalice la última aféresis.

7.2.3. Colecta y selección de células CD34⁺:

Se realizará la colecta con el separador celular habitual en cada centro y de acuerdo a los protocolos de cada uno de ellos. Se iniciarán las colectas en cuanto el paciente supere la cifra de 5 células CD34⁺ circulantes en sangre periférica. Deben procesarse

al menos tres volemias del paciente y no más de seis en cada jornada. Se realizarán un máximo de cuatro colectas, si bien a discreción del médico responsable de la colecta del paciente se podría realizar una aféresis más para alcanzar el objetivo proyectado a 5 años sin con ello se cree posible alcanzar ese objetivo.

La colecta finalizará cuando se alcance el objetivo de 4×10^6 células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años por el percentil 50 de peso del paciente para aquel momento.

Tras cada aféresis se evaluará la posibilidad de realizar un procedimiento de selección inmunomagnética o esperar a la siguiente aféresis para aumentar el número de células a procesar. Las células obtenidas nunca permanecerán más de 48 horas en espera de ser manipuladas para selección de células CD34⁺. Los estudios realizados, recuento de células CD34⁺ antes y después de la selección y el resto de variables (cultivos, viabilidad) serán recogidas en el cuaderno de recogida de datos del investigador.

7.2.4. Seguimiento:

Se prevé que el paciente será dado de alta al finalizar la última aféresis. Una vez dado el paciente de alta médica, se realizarán controles hematológicos a las 2 semanas de la última aféresis (en el centro donde se realizó la colecta), a los 2 meses, a los 6 meses y a los 9 meses (en el centro de referencia del paciente si su médico es investigador del ensayo, o en el de la colecta).

Al año (± 30 días) de realizada la última aféresis, se realizará un examen físico completo, recuento celular sanguíneo, bioquímica básica y un aspirado de la médula ósea del paciente para control.

8. VALORACIÓN DE SEGURIDAD

8.1 La especificación de los parámetros de seguridad.

Un Acontecimiento Adverso (AA) se define como cualquier ocurrencia o experiencia médica desfavorable en un paciente o sujeto en una investigación clínica que sucede después de la administración de la medicación del estudio, sin importar la dosis o relación causal. Esto puede incluir cualquier signo (como una erupción cutánea o la hepatomegalia) o síntoma (como las náuseas o el dolor torácico) desfavorable o no intencional, un hallazgo anormal de laboratorio (incluyendo análisis de sangre, radiografías o escáneres) o una enfermedad temporalmente asociada al uso del medicamento del estudio.

Una Reacción Adversa Medicamentosa (RAM) se define como cualquier respuesta a un medicamento que es nociva y/o inesperada, relacionada a cualquier dosis.

Las Respuestas a un Medicamento (usada en la definición de arriba) significan que una relación causal entre el medicamento y el acontecimiento adverso es al menos una posibilidad razonable, es decir, no se puede descartar dicha relación.

Un Acontecimiento Adverso Grave (AAG) se define como cualquier experiencia no deseada que afecta a un paciente, se considere o no relacionada con el tratamiento del protocolo. Un AAG que se considera relacionado con el tratamiento del protocolo se define como una Reacción Adversa Medicamentosa Grave (RAMG). Los AAG y las RAMG son aquellos que dan lugar a:

- Fallecimiento del paciente
- Acontecimiento con riesgo para la vida; es decir, que hubo un riesgo de muerte inmediato del paciente en el momento en que se observó la reacción.
- Hospitalización o prolongación de una hospitalización
- Discapacidad/incapacidad persistente o significativa
- Anomalía congénita o un defecto de nacimiento
- Cualquier otra condición médica importante; es decir, reacciones adversas importantes que no suponen un riesgo inmediato para la vida y no dan lugar a la muerte o a la hospitalización pero que pueden poner en peligro al paciente o pueden necesitar intervención para prevenir otro de los resultados listados arriba.

Se define la muerte tóxica como la muerte secundaria a la toxicidad. Esto debe especificarse en el formulario del informe de muerte: la causa de la muerte debe figurar como "toxicidad". La valoración de las muertes tóxicas es independiente de la valoración de la respuesta (los pacientes pueden morir por toxicidad después de una valoración completa de la respuesta al tratamiento).

De forma previa al tratamiento se realizará una evaluación completa de la enfermedad que incluirá historia y exploración física incluyendo índice de Lansky según ase ha indicado anteriormente

Cada paciente será monitorizado para la detección de posibles efectos adversos. Para su valoración se seguirán los criterios NCI-CTC V3.0 (anexo I) y se determinará la proporción de pacientes que presentan toxicidad en función del grado. Los efectos tóxicos que no puedan clasificarse de acuerdo a los criterios para la toxicidad del citado sistema, se clasificarán de la siguiente manera (clasificación MedDRA):

- Leve (asintomático).
- Moderado (sintomático pero que no interfiere significativamente con la función).

- Severo (provoca una interferencia significativa de la función).
- Amenazante para la vida.

8.2 Los métodos y el calendario para la evaluación, registro y análisis de los parámetros de seguridad.

8.2.1. Métodos y calendario para evaluar la seguridad de la movilización con filgrastim y mozobil:

Se prevé que el paciente será dado de alta al finalizar la última aféresis. Una vez dado el paciente de alta médica, se realizarán controles hematológicos a las 2 semanas de la última aféresis (en el centro donde se realizó la colecta), a los 2 meses, a los 6 meses y a los 9 meses (en el centro de referencia del paciente si su médico es investigador del ensayo, o en el de la colecta).

Al año (± 30 días) de realizada la última aféresis, se realizará un examen físico completo, recuento celular sanguíneo, bioquímica básica y un aspirado de la médula ósea del paciente para control.

A partir de ese momento el paciente habrá finalizado su participación en el ensayo, y continuará con controles rutinarios por su médico especialista.

8.3 Los procedimientos para obtener los informes de los acontecimientos adversos y enfermedades intercurrentes y para el registro y comunicación de los mismos y de las reacciones adversas a los medicamentos que se investigan.

Se registrarán todos los acontecimientos adversos en los cuadernos de recogida de datos; el investigador decidirá si estos acontecimientos están relacionados con el proceso de la colecta de células hematopoyéticas (no relacionado, improbable, posible, probable, seguro, no valorable) y su decisión será registrada en las hojas para todos los acontecimientos adversos.

No se considerarán como efectos secundarios o toxicidad los acontecimientos adversos no relacionados con el proceso de colecta de las células hematopoyéticas; es decir, comunicados como no relacionados o de relación improbable. Estos serán informados por separado en el análisis.

LOS ACONTECIMIENTOS ADVERSOS GRAVES DEBEN SER COMUNICADOS DE FORMA INMEDIATA SEGÚN EL PROCEDIMIENTO DETALLADO EN ESTE PROTOCOLO.

8.3.1. Reacciones adversas no graves y reacciones adversas medicamentosas no graves:

Se deben registrar en los formularios correspondientes. Todos los Acontecimientos Adversos (AA) y Reacciones Adversas Medicamentosas (RAM) que sucedan durante el período de tratamiento o dentro de los 30 días posteriores a la administración de la última dosis del tratamiento del protocolo deben ser recogidos. El investigador decidirá si dichos acontecimientos están relacionados con el medicamento (es decir, no relacionado, improbable, posible, probable, seguro, o no valorable) y su decisión figurará en el formulario de toxicidad. Los AA que seguramente no estén relacionados

con el medicamento (es decir, comunicados como no relacionados) no serán considerados como reacciones adversas medicamentosas en los análisis de toxicidad y serán informados de forma independiente.

8.3.2. Acontecimientos adversos graves y reacciones adversas medicamentosas graves:

Se deben comunicar al investigador principal y al laboratorio responsable de la medicación todos los Acontecimientos Adversos Graves (AAG), relacionados o no con el tratamiento del estudio, que ocurren durante el período de tratamiento o en los 30 días siguientes a la administración de la última dosis del tratamiento del protocolo. Los responsables de la comunicación de los AAG será el investigador principal o investigadores colaboradores de la parte clínica, autorizados por el investigador principal. El responsable de la notificación de los AAG a las autoridades sanitarias pertinentes será el promotor

Esta comunicación debe realizarse por fax dentro de las primeras 24 horas desde la observación inicial del evento. Deben documentarse los detalles en el Formulario especificado de Acontecimientos Adversos Graves.

Para permitir que el promotor cumpla con los requisitos reglamentarios de información, la documentación cumplimentada de todos los acontecimientos adversos graves y reacciones adversas medicamentosas graves comunicados deben ser remitidos en el plazo de los 10 días siguientes a la fecha del informe inicial.

Se debe tener en cuenta que los Acontecimientos Adversos Graves (AAG) y las Reacciones Adversas Medicamentosas Graves (RAMG) que no han sido documentados previamente en el Manual del Investigador, o que ocurren en una forma más grave de lo anticipado (es decir, que son "inesperados"), están sujetos a una comunicación rápida a las Autoridades Reguladoras por parte del Promotor. Esto se aplica también a los informes procedentes de fuentes espontáneas y de cualquier tipo de investigación clínica o epidemiológica, independientemente de su diseño o propósito. Siempre debe especificarse la fuente del informe (investigación, espontánea, otra).

LA FECHA Y LA FIRMA DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE O DE UNO DE LOS MIEMBROS AUTORIZADOS DE SU PERSONAL DEBEN FIGURAR EN TODOS LOS INFORMES

8.3.3 Valoración de la causalidad y severidad de los AA

El investigador hará la valoración de causalidad usando las siguientes definiciones:

Relación	Definición
NO RELACIONADO	No hay evidencia de ninguna relación casual
IMPROBABLE	Existe poca evidencia que sugiera una relación casual (p.ej. el acontecimiento no se presentó en un periodo de tiempo razonable después de la administración del medicamento del estudio). Hay otra explicación razonable para el acontecimiento (p.ej. la condición clínica del paciente, otros tratamientos concomitantes)

POSIBLE	Existen evidencias que sugieren una posible relación causal (p.ej. porque el acontecimiento ocurrió en un tiempo razonable después de la administración del medicamento del estudio). Sin embargo, la influencia de otros factores pueden haber contribuido al acontecimientos (p.ej . la condición clínica del paciente, otros tratamientos concomitantes).
PROBABLE	Existen evidencias que sugieren una relación causal y la influencia de otros actores es poco probable.
SEGURO	Existen evidencias claras que sugieren una relación causal y se puede descartar una posible contribución de otros factores.
NO VALORABLE	No hay evidencia suficiente o es incompleta para poder hacer un juicio clínico sobre una relación causal.

Intensidad	Definición
MINIMO O MENOR	El AA es apreciado por el paciente pero no interfiere con su vida.
MODERADO	El AA produce molestia e interfiere con la vida habitual
SEVERO	El AA limita severamente la capacidad del paciente de realizar tareas habituales y requiere tratamiento sintomático.
RIESGO VITAL	El AA pone en peligro directo la vida del paciente.

8.4 Tipo y la duración del seguimiento de los sujetos después de los acontecimientos adversos.

Tras un acontecimiento adverso el paciente será evaluado al menos durante un año después de la ocurrencia del mismo.

9. ESTADÍSTICA

9.1 Descripción de los métodos estadísticos que se usarán, incluyendo el calendario de todos los análisis intermedios planificados.

En el estudio se prevén reclutar un total de 10 pacientes, no siendo necesario la consideración de un grupo control.

Se analizarán los parámetros analíticos y clínicos del paciente antes y después de la movilización y aféresis de los pacientes, con objeto de investigar:

- si han aparecido efectos adversos durante el protocolo de movilización.
- si se han alcanzado los objetivos de movilización (>5 células CD34⁺/ µL en sangre periférica)
- si se han alcanzado los objetivos de colecta (4x10⁶ células CD34⁺ por kilo de peso proyectado a 5 años).
- si se han alcanzado los objetivos de recuperación y pureza de células CD34⁺ en el proceso de inmunoselección.

9.2 Número previsto de sujetos que se incluirán. En los ensayos multicéntricos, se deberá especificar el número previsto de sujetos que se incluirán en cada centro donde se realizará el ensayo. Justificación del cálculo del tamaño de la muestra, incluyendo la explicación (o cálculo) del poder del ensayo y la argumentación clínica de dicho tamaño.

Se incluirán 10 pacientes entre los dos centros participantes.

9.3 Nivel de significación que será utilizado.

No procede por tratarse de un ensayo Fase II exploratorio

9.4 Criterios para la finalización del ensayo.

El ensayo finalizará cuando termine el seguimiento de los 10 pacientes (un año después de la colecta del último paciente).

9.5 Procedimiento utilizado para contabilizar los datos perdidos, no utilizados y erróneos.

Durante el ensayo se realizaran visitas de monitorización para verificar todos los datos y completar cualquier dato que falte o que surja como query durante la grabación de datos.

9.6 Procedimiento de comunicación de todas las desviaciones del plan estadístico original (toda desviación del plan estadístico original deberá ser descrito y justificado en el protocolo y/o en el informe final, si fuera necesario).

No procede

9.7 selección de los sujetos que se van a incluir en cada análisis (por ejemplo, todos los sujetos aleatorizados, todos los sujetos tratados, todos los sujetos elegibles, los sujetos evaluables).

El análisis se realizará con todos los sujetos incluidos y tratados en el estudio.

10. ACCESO DIRECTO A LOS DATOS/DOCUMENTOS FUENTE:

El promotor garantizará que se especifica en el protocolo u otro acuerdo por escrito que el investigador o la institución permitirá el acceso directo a los datos o documentos fuente para la realización de la monitorización, la auditoría, la revisión por el CEIC, así como la inspección del ensayo por las autoridades sanitarias.

El promotor garantiza el acceso a los documentos fuente a los monitores asignados al ensayo, a los auditores, representantes de los CEICS y autoridades sanitarias, tanto durante el ensayo como en los periodos de auditorías o inspecciones.

11. CONTROL Y GARANTÍA DE CALIDAD

Con el fin de garantizar la calidad de los datos, el promotor o la CRO:

- realizaran visitas de monitorización regulares, de acuerdo con las BPC de ICH. Se comprobará el cumplimiento de los datos con el protocolo y su exactitud con respecto a los documentos fuente los monitores verificarán que el ensayo se está llevando a cabo y los datos se están generando, documentando y registrando de acuerdo con el protocolo, bpc y las normativas regulatorias aplicables.
- proporcionaran instrucciones y formación a los centros participantes en el ensayo.
- revisaran los datos de los cuadernos de recogida de datos
- detallaran cualquier otra acción tomada para garantizar la calidad de la investigación.

Desviaciones graves

Una desviación grave se define como “una violación de la buena práctica clínica o del protocolo del ensayo que pueda posiblemente afectar en un grado significativo a:

- (a) la seguridad e integridad física o mental de los sujetos del ensayo; o
- (b) el valor científico del ensayo”.

En el caso de que se sospeche una desviación grave, se debe contactar inmediatamente al promotor o a la CRO.

12. ÉTICA

12.1. Descripción de las consideraciones éticas relacionadas con el ensayo

La aprobación del presente estudio por el Comité de Ética e Investigación Clínica de cada Centro participante y la autorización del mismo por la Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) es indispensable para iniciar la inclusión de pacientes.

12.2. Consideraciones generales:

El ensayo se llevará a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Edimburgo octubre 2000) y siguiendo las recomendaciones de la Buena Práctica Clínica de la CEE (documento 111/3976/88, Julio de 1990) y la normativa española vigente (Real decreto 223/2004, del 6 febrero de 2004) por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. Se deberá someter el protocolo al Comité Ético de cada institución. El estudio solo comenzará una vez cumplidos todos los requisitos de las autoridades competentes correspondientes.

Tanto el protocolo, como la Hoja de Información y el Consentimiento Informado utilizados en este estudio contarán con la aprobación por escrito del Comité Ético de Investigación Clínica y por la AEMPS. Cualquier Enmienda Relevante a los documentos originales se presentará igualmente al Comité Ético y a la AEMPS para su aprobación escrita.

12.3. Información que será proporcionada a los sujetos y tipo de consentimiento informado que será solicitado en el ensayo:

A cada sujeto que se solicite la participación en el ensayo clínico, se le entregará un documento escrito denominado "Información al paciente", que contendrá información referente a los siguientes aspectos del ensayo clínico:

- Objetivo.
- Metodología
- Tratamiento que puede serle administrado
- Beneficios esperados para él o la sociedad.
- Incomodidades y riesgos derivados del estudio (número de visitas, pruebas complementarias a que se someterá, etc.).
- Posibles acontecimientos adversos.
- Tratamientos alternativos disponibles.
- Carácter voluntario de su participación, así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación médico-enfermo, ni se produzca perjuicio en su tratamiento.
- Personas que tendrán acceso a los datos del voluntario y forma en que se mantendrá la confidencialidad de los datos.

El investigador es responsable del ensayo y de informar al sujeto y contestar a sus dudas y preguntas, y modo de contactar con él en el caso de urgencia. De acuerdo con la normativa vigente, el investigador obtendrá el consentimiento del sujeto, o en su defecto de un tutor legal. El sujeto expresará su consentimiento por escrito, o en su

defecto, de forma oral ante testigos independientes del equipo del investigador que lo declararán por escrito bajo su responsabilidad. El sujeto participante en el ensayo clínico o su representante podrán revocar su consentimiento en cualquier momento, sin expresión de causa y sin que por ello se derive para él responsabilidad ni perjuicio alguno. En el caso de menores maduros (mayores de 12 años), éstos firmarán un Asentimiento junto con sus padres/tutores y tendrán una Hoja de Información con explicaciones adaptadas a su edad.

13. MANEJO DE LOS DATOS Y ARCHIVO DE LOS REGISTROS

13.1. Acceso a los datos de los voluntarios:

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del ensayo, sólo tendrán acceso a los mismos, el investigador y su equipo de colaboradores, el Monitor del ensayo, el Comité Ético de Investigación Clínica del correspondiente centro o el que tutela el ensayo y las autoridades sanitarias pertinentes .

13.2. Protección de los datos obtenidos del estudio:

El contenido de los CRD, así como los documentos generados durante el estudio serán considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceras partes. El Investigador Principal y su equipo colaborador mantendrán en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el Ensayo. Los sujetos se identificarán con un número en los CRDs y en cualquier base de datos electrónica. Todos los documentos se guardarán en un sitio seguro y con acceso restringido al equipo investigador y al personal autorizado. El estudio cumplirá la legislación vigente sobre la Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999). Los resultados o conclusiones del ensayo clínico se comunicarán prioritariamente en publicaciones científicas antes de ser divulgado al público no sanitario. No se darán a conocer de modo prematuro o sensacionalista, procedimientos de eficacia aún no determinada.

Todos los registros considerados como documentos fuente, incluyendo la historia clínica de los pacientes y cualquier otro documento, como registro de laboratorio, ECG y otros, se archivarán en el centro participante y se mantendrán durante el período de 15 años de acuerdo a la legislación en vigor.

14. FINANCIACIÓN Y SEGUROS

La financiación y el seguro, si no se contemplan en un contrato independiente. Debe hacerse referencia a que se tendrán en cuenta los requisitos de la normativa vigente en España.

Se adjunta la póliza del seguro o indemnización civil suscrita y las características de la misma. Este estudio se financiará con fondos públicos mediante la subvención de la convocatoria del Ministerio de Sanidad para ensayos en enfermedades raras.

15. POLÍTICA DE PUBLICACIÓN

La política de publicación. Debe constar en el protocolo, o en el resumen del protocolo el compromiso expreso del promotor de publicar los resultados del ensayo tanto si fueran positivos como si fueran negativos.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo clínico serán publicados en revistas científicas, tanto si los mismos fueran positivos como si fueran negativos.

16. CONSIDERACIONES PRÁCTICAS

16.1 Responsabilidades del investigador

Las responsabilidades del investigador principal en cada centro participante serán:

- Firmar el proyecto del ensayo.
- Conocer a fondo las propiedades del medicamento.
- Obtener el consentimiento informado de los sujetos antes de su inclusión en el ensayo.
- Recoger, registrar y notificar los datos de forma correcta.
- Notificar inmediatamente los acontecimientos adversos graves o inesperados al promotor.
- Garantizar que todas las personas implicadas respetarán la confidencialidad de cualquier información acerca de los sujetos del ensayo.
- Informar regularmente al Comité Ético de Investigación Clínica de la marcha del ensayo.
- Responsabilizarse de la elaboración del informe final del ensayo, dando su acuerdo al mismo con su firma.

16.2 Normas para la cumplimentación de los CRD

Para este ensayo se utilizará como Cuaderno de recogida de Datos las hojas diseñadas específicamente.

Cada investigador se compromete a:

- Registrar al paciente tan pronto como se incluya al enfermo en e estudio.
- Rellenar las hojas de datos de cada paciente:
 - al registrar al paciente.
 - en la evaluación precoz.
 - en la evaluación de seguimiento.

Para la correcta cumplimentación de las hojas se debe tener en cuenta:

- Las hojas en que se indica, deberán ir fechadas y firmadas por el investigador principal autorizado.
- Complimentará todas las casillas. Si no dispone del dato que se pide, deberá poner ND (no disponible).
- Los resultados poco usuales o extremos, o las que no concuerden con la secuencia esperada, deberán comprobarlos. Serán corregidos poniendo sus iniciales, la firma y la explicación correspondiente.
- Los resultados de laboratorio que excedan los rangos de normalidad establecidos por el laboratorio del centro, deberán ser comprobados por el investigador y su significado se anotará al lado del dato, poniendo sus iniciales y la firma. Remitirán al coordinador del estudio una relación de los valores analíticos normales (y su rango) para ese centro y de sus unidades
- Procurará escribir las preguntas abiertas con letra legible, pues en caso contrario se considerará como información perdida.
- El investigador realizará una comprobación o revisión final de todos y cada uno de los CRD y firmará el apartado Compromiso del Investigador antes de hacer la entrega de la documentación.

16.3 Protección de los datos obtenidos del estudio

El contenido de los CRD, así como los documentos generados durante el estudio serán considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceras partes. Se mantendrá en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el ensayo. Los resultados o conclusiones del ensayo clínico se comunicarán prioritariamente en publicaciones científicas antes de ser divulgado al público no

sanitario. No se darán a conocer de modo prematuro o sensacionalista, procedimientos de eficacia aún no determinada.

APENDICE A

A.1. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la

29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983

41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989

48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996

52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002

Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

INTRODUCCIÓN:

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están sub-representadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente

vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACIÓN MÉDICA:

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiadas.

15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades

de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público..En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACIÓN MÉDICA SE COMBINA CON LA ATENCIÓN MÉDICA:

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay intervención probada existente.

Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por

ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico/paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

APENDICE B

B.1 Hoja de información al paciente adulto y/o padres. Se adjunta aparte.

B.2 Consentimiento informado niño menor de 12 años (padres). Se adjunta aparte.

B.3 Modelo de hoja de información al paciente niño mayor de 12 años. Se adjunta aparte.

B.4. Asentimiento paciente niño mayor de 12 años. Se adjunta aparte.