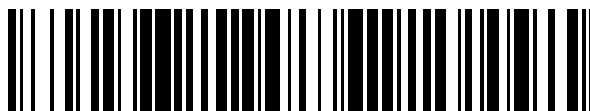


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 418**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00	(2006.01)	C12N 5/02	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	C12N 5/08	(2006.01)
C12N 5/06	(2006.01)	A61K 38/00	(2006.01)
C12N 5/02	(2006.01)	A01N 65/00	(2006.01)
C12N 5/08	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
A01N 65/00	(2009.01)		
A01N 63/00	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
C12N 5/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00987995 .8**
96 Fecha de presentación: **22.11.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1231840**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

54 Título: **AGENTE CELULAR ANTIANGIOGÉNICO PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
24.11.1999 US 167513 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:
**RED CLIFF HOLDING
STRATHVALE HOUSE ROULSTONE TURNER
P.O. BOX 2587
GEORGETOWN, KYI-1103 GRAND CAYMAN, KY**

72 Inventor/es:
HOPE, ERNEST G.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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

ES 2 383 418 T3

DESCRIPCIÓN

Campo de la Invención

La invención se refiere a métodos para usar las células del sistema inmune en el tratamiento de enfermedad proliferativa celular y cáncer.

Antecedentes de la Invención

La inmunidad celular transferida adoptivamente constituye un factor principal para controlar la recaída en algunos pacientes con cáncer que están sometidos a transplante de células hematopoyéticas alogénicas. Los beneficios mediados por la inmunidad del transplante de médula ósea (BMT) se describieron por primera vez como el efecto "injerto contra leucemia" (GvL) (Sullivan et al. (1989) Blood 73:1720; Weiden et al. (1979) N. Engl. J. Med. 300:1068). Tanto las células asesinas naturales (NK) como subconjuntos de células T contribuyen a GvL (Antin (1993) Blood 82:2273; Hauch et al. (1990) Blood 75:2250). La depleción de células T de la población de las células hematopoyéticas del donante resulta en unas proporciones de recaída incrementadas después de BMT (Martín et al. (1985) Blood 66:664). La infusión de linfocitos del donante en pacientes que han recaído después de BMT alogénico resulta en un porcentaje significativo de pacientes que consiguen remisiones completas duraderas (Kolb et al. (1995) Blood 86:2041; Porter et al. (1994) N. Engl. J. Med. 330:100).

Varias poblaciones distintas de células T y NK se han expandido *ex vivo* y se han utilizado como células efectoras para la terapia inmune adoptiva. Estas poblaciones incluyen células asesinas activadas por linfoquinas (LAK), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y células asesinas inducidas por citoquinas (CIK).

Las células LAK son productos de cultivo a corto plazo dependientes de interleuquina-2 (IL-2) obtenidas de células NK. Las células LAK reconocen un amplio espectro de dianas de células tumorales y células tumorales autólogas *in vitro*. Sin embargo, su eficacia *in vivo* está limitada por su limitado potencial proliferativo y el requerimiento de la coaplicación de IL-2 (Rosenberg et al. (1985) J. Exp. Med. 161:1169). La administración sistémica de IL-2 está asociada con toxicidades considerables, incluyendo destrucción endotelial masiva (Siegel et al. (1991) J. Clin. Oncol. 9:694). La terapia en pacientes con células LAK ha causado una morbilidad significativa debido al síndrome de hiperpermeabilidad vascular asociado con destrucción endotelial (VLS) (Kotasek et al. (1988) Cancer Res 48:5528).

Los TIL tienen una mayor especificidad para antígenos tumorales que las células LAK. Sin embargo, los TIL deben aislarse de un espécimen quirúrgico del paciente y su generación tiende a ser engorrosa y rinde pocas células. Los antígenos tumorales específicos no están disponibles frecuentemente para asegurar una expansión suficiente *in vitro* de los TIL para tratamientos sucesivos o escaladas de dosis (Rosenberg et al. (1988) N. Engl. J. Med. 319:1676).

Las células CIK se generan a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por cultivo en presencia de IFN- γ , OKT-3, e IL-2. Los cultivos de células CIK se expanden rápidamente en ausencia de células diana, lo que resulta en la expansión preferente de la población que de otra manera no sería habitual de células T α/β CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Las células CIK tienen una actividad GvL superior *in vivo* si se comparan con las células LAK y son capaces de purgar ratones SCID de la carga tumoral hematopoyética letal sin la necesidad de la administración sistémica de IL-2 (Lu et al. (1994) J. Immunol. 153:1687).

Compendio de la Invención

La invención presenta un método, usos y composiciones como se definen en las reivindicaciones dependientes.

Las células T anérgicas de varios linajes pueden estimularse, en determinadas condiciones, con citoquinas para activar los mecanismos de célula efectora que permiten a las células atacar selectivamente la vasculatura tumoral. Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, parece que esta función de la célula efectora es una evolutivamente arcaica que no está limitada a las células T alfa/beta o células T gamma/delta. La función de célula efectora deseada está presente en al menos una subclase de células conocida como células CIK. Además, la función de célula efectora también puede estar presente en determinadas células que no expresan un receptor de células T. Por ejemplo, la función puede estar presente en una subclase de células NK.

Las células inmunes de la descripción se refieren colectivamente como células T antiangiogénicas expandidas *ex vivo* ("células EAT"). Las células inmunes de la descripción pueden obtenerse a partir de las células del paciente que se va a tratar u otro sujeto, así pueden ser alogénicas o autólogas, y se expanden *ex vivo* para generar células con las propiedades deseadas y en una cantidad suficiente.

Se cree que la selectividad de las células EAT está regulada, al menos en parte, por uno o más de Hsp47, Hsp16, Hsp27, Hsp32 y posiblemente otras proteínas de choque térmico tales como Hsp65, Hsp70, Hsp72, Hsp94, Hsp90, Hsp96 y Hsp mayores de 100kD y menores de 60kD. Hsp47 pertenece a una familia de moduladores inmunes reconocidos que incluye, pero no está limitada a, Hsp47, subtipos HLA-A y receptores de IL-12. Así, las células EAT

pueden presentar (es decir, expresar) un receptor en la superficie celular que se une a Hsp47, una molécula HLA (p. ej., HLA-A o un subtipo de HLA-A), receptor de IL-12 o una de las proteínas Hsp mencionadas anteriormente.

Las células EAT pueden aislarse de una población de células asesinas activadas por selección positiva de células que expresan receptores como se ha indicado anteriormente, o por selección negativa que destruye o desecha las células que no tienen dichos receptores o que muestran reactividad frente a la vasculatura normal. Por ejemplo, pueden utilizarse células endoteliales cultivadas *in vitro* que bien se han preincubado hasta la saturación funcional con un miembro funcional de la familia Hsp47 de moduladores inmunes o que se han transformado genéticamente para secretar Hsp47 o una proteína relacionada para seleccionar células EAT que tienen las propiedades deseables. El uso de un péptido que corresponde a homologías compartidas entre los miembros de la familia Hsp47 de moduladores inmunes puede sustituir la expresión o uso de polipéptidos parciales o de longitud completa de este modulador inmune. Las células inmunes que atacan a las células endoteliales en presencia de una cantidad funcionalmente suficiente de Hsp47 (es decir, una cantidad que inhibiría la muerte por una dosis celular equivalente de células CIK, p. ej., usando un ensayo descrito más adelante) se eliminan por selección negativa. La selección positiva puede realizarse después de tinción con Hsp47 o un sustituto funcional y separación posterior por FACS de las células teñidas positivamente, o por reconocimiento y selección usando Hsp47 o un sustituto funcional inmovilizado (es decir, en lechos magnéticos, una columna u otro soporte sólido). Pueden usarse métodos similares para la selección negativa. En algunas circunstancias, no es necesaria la purificación de las células EAT de la población en la que se han generado.

A diferencia de determinadas células usadas para la inmunoterapia celular del cáncer, las células EAT no causan el síndrome de hiperpermeabilidad vascular (VLS), un efecto secundario muy grave, habitualmente potencialmente mortal de la inmunoterapia celular. VLS surge a partir del daño causado a las células endoteliales en la vasculatura normal por determinadas células NK activadas o células T activadas y puede implicar la activación o interacción con otras células del sistema inmune. Debido a las graves consecuencias de VLS, la inmunoterapia celular se considera generalmente apropiada sólo para pacientes que padecen cáncer renal terminal o melanoma terminal. Por el contrario, debido a que el riesgo de VLS asociado con la administración de células EAT es mínimo, las células EAT pueden usarse para el tratamiento de cánceres vascularizados generalmente, incluyendo cánceres no malignos, estadios tempranos de un cáncer, cáncer de cualquier grado y estadio e incluso trastornos que no son potencialmente mortales que están asociados con una vascularización inapropiada (p. ej., endometriosis).

Muchos tipos de células EAT atacan directamente las células tumorales además de atacar la vasculatura tumoral. Así, dichas células EAT pueden ser particularmente eficaces para el tratamiento del cáncer. Debido a que las células EAT atacan la vasculatura tumoral pueden ser terapéuticamente eficaces para el tratamiento de cáncer vascularizado incluso si no matan sustancialmente a las células tumorales por sí mismas ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, las células que no matan a las células de una línea celular de cáncer particular *in vitro* pueden sin embargo ser terapéuticamente eficaces para tratar ese cáncer porque pueden atacar la vasculatura tumoral.

En algunos casos un método particular para generar un tipo de célula EAT puede generar realmente una variedad de tipos celulares, p. ej., un tipo capaz de atacar la vasculatura tumoral y otro tipo capaz de atacar las células tumorales en sí mismas. En algunas circunstancias, los distintos tipos celulares pueden utilizarse en conjunto. En otros casos, puede ser deseable generar poblaciones puras de cada uno de los tipos celulares, p. ej., por FACS u otro método adecuado. También puede ser deseable generar una población clonal de una célula generada *ex vivo*.

Las células EAT, incluyendo las células CIK, pueden usarse sin la coadministración de una citoquina, p. ej., IL-2. Las células EAT, incluyendo las células CIK, pueden administrarse como células que son totalmente capaces de replicarse, es decir, preferiblemente no se irradian letalmente. Además, las células EAT se administran preferiblemente sin la coadministración de una citoquina, p. ej., una interleuquina tal como IL-1, IL-2, IL-7, IL-12 o IL-15. Además, preferiblemente las células no están transfectadas de manera estable con una molécula de ácido nucleico que codifica una citoquina, p. ej., una interleuquina tal como IL-1, IL-2, IL-7, IL-12 o IL-15, o cualquier otra molécula de ácido nucleico. Sin embargo, las células pueden estar transfectadas transitoriamente o de manera estable con una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador de la superficie celular. En una aplicación típica de células no fraccionadas en masa, la dosificación total de células es preferiblemente menos de 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , ó 10^{15} (incluyendo células no funcionales o células no EAT) células por paciente o por tratamiento. Debido a que las células son más seguras que otras terapias celulares inmunes, el límite superior de la dosificación es muy alto, quizá por encima de 10^{15} . Las células pueden titularse para determinar el número de unidades líticas para un tumor seleccionado o diana antiangiogénica. La dosificación puede ajustarse de acuerdo con esto. En algunas circunstancias pueden usarse dosis mucho menores (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7). La dosis de células por administración puede ser mayor de $1,25 \times 10^{10}$ ó $2,5 \times 10^{10}$ para pacientes que padecen tumores sólidos y al menos 2×10^9 células ó 4×10^9 células para pacientes que padecen tumores hematopoyéticos.

Preferiblemente las células EAT, particularmente las células CIK, se crecen con agitación o aireación del medio en lugar de en cultivos estáticos. Las células CIK crecidas con agitación o aireación pueden crecerse hasta una densidad celular mayor y son más eficaces que las células crecidas en cultivo estático. Así, las células pueden crecerse en sistemas de cultivo cerrados, reactores con agitación, cultivos de perfusión, cultivo en fibra hueca, cultivo de esferoides, cultivo incluido en una membrana (suspendido en medio aireado). Preferiblemente, las células se crecen hasta una densidad mayor de 3×10^6 células/ml, más preferiblemente al menos 5×10^6 , 10×10^6 , 15×10^6 , 20×10^6 , 10^7 , 10^8 ,

10^9 , 10^{10} , 10^{11} ó 10^{12} células/ml. Las CIK transfectadas con una molécula de ácido nucleico distinta de la que codifica IL-2 o IL-7 pueden usarse para tratar a los pacientes.

Muchos otros tipos de células pueden ser células EAT, incluyendo: subclases de células T, subclases de células NK, y subclases de células generadas por estimulación de células dendríticas. Las células preferidas utilizan la ausencia de una señal de no matar para reconocer las células tumorales y para reconocer los componentes de la vasculatura tumoral (p. ej., células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos de la vasculatura tumoral, y otros componentes de la vasculatura tumoral). Además, las células preferidas no están restringidas por MHC clásico. En algunos casos, las células utilizan el receptor de la señal de no matar, por ejemplo, un receptor para Hsp47 u otro componente de la matriz extracelular.

Las células pueden combinarse con un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico que se une a la célula EAT y a la célula diana. Molema et al. 2000 J. Controlled Release 64:229-39. Un anticuerpo bivalente o multivalente también puede unirse a una molécula para administrarse incluyendo: una toxina, una molécula radiactiva, un modulador inmune y un indicador. Un anticuerpo monovalente puede unirse a una molécula para administrarse a la célula diana.

Debido a que las células EAT no están asociadas con un VLS significativo, pueden usarse para tratar pacientes menos gravemente enfermos que los pacientes tratados con inmunoterapia tradicional, p. ej., pacientes tratados con células NK activadas, y pueden administrarse en una dosis celular mucho más activa. Además, los pacientes pueden tratarse con una mayor relación coste eficacia en un contexto de consultas externas de pacientes total o parcial. El paciente puede tratarse en un entorno de consultas externas de pacientes, puede tratarse hasta que el tumor disminuya hasta 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, ó 70% de su tamaño original o hasta que desaparezca completamente. Así, las células pueden usarse en un contexto de intento de curar. Las células EAT también pueden usarse como una terapia preventiva o profiláctica en pacientes sanos o en supervivientes de cáncer.

Las células EAT pueden usarse para tratar, por ejemplo: recaída de cáncer hematopoyético posterior a transplante de médula ósea, cualquier carcinoma, cualquier sarcoma, tumores líquidos (p. ej., mieloma múltiple, gammopatía de Waldenstrom (IgM), Bergers (IgA), linfoma del SNC (p. ej., asociado con SIDA), linfomas gonadales y leucemias, linfomas de las células del manto, estadios vascularizados de leucemias (médula ósea) y linfomas (en los nódulos linfáticos) y cualquier otra leucemia o linfoma, incluyendo leucemias y linfomas de grado bajo, tumores sólidos (p. ej., tumores vascularizados, incluyendo angiosarcomas, sarcoma de Kaposi, mesotelioma, Sarcoma de Ewing, coriocarcinoma, tumores ascíticos (p. ej., cáncer de ovario especialmente con implantes peritoneales), cánceres gonadales (incluyendo ovárico y cervical), cánceres de las vías aéreas (células pequeñas de pulmón, pulmón, y bronquial), cánceres gastrointestinales (pancreático, intestinal, colon, rectal, intestino delgado, poliposis, conducto biliar, estómago), cáncer esofágico, cáncer esofágico de Barret, cáncer oral, cáncer parótido, cáncer nasofaríngeo, cáncer de tiroides, cánceres del SNC (gliol, neuroblastoma multiforme, neuromas, meningiomas, astrocitomas, cualquier cáncer del SNC pediátrico o de adulto), cánceres urogenitales (vejiga, renal, adrenal, próstata), cánceres de la piel (melanoma nodular, MF invasivo, de extensión superficial, células escamosas, labio), cánceres óseos y del tejido conectivo (mama, hueso, condromas, leiomiomas, tumor de Wilm, retinoblastoma), y cualquier otro carcinoma o sarcoma sólido de pacientes pediátricos o adultos. Las células EAT también pueden usarse para tratar enfermedades no malignas que están asociadas con neovascularización, por ejemplo: malformación de AV, endometriosis, y cualquier estado de vascularidad incrementada que se considera que refleja una salud que no es perfecta, incluyendo, pero no limitado a, enfermedades autoinmunes tales como psoriasis o artritis reumatoide. También pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier infección parasitaria, viral o fúngica con neovascularización, tales como, pero sin limitarse a echinococcus granulosus y sarcoide. Las células EAT pueden usarse para tratar una amplia variedad de trastornos que podrían mejorarse si se redujera la neovascularización asociada o la vascularización asociada.

Las células EAT dañan selectivamente la vasculatura asociada a tumores comparado con la vasculatura normal. Esta selectividad puede medirse comparando la muerte de HUVEC cultivadas en ausencia y presencia de Hsp47. En este ensayo la concentración de Hsp47 puede ser igual a la requerida por las células CIK para presentar 2 veces, 5 veces, 10 veces ó 100 veces de selectividad en el ensayo.

Las células EAT dañan selectivamente la vasculatura tumoral, reduciendo el flujo de sangre y nutrientes al tumor, parando o reduciendo el potencial de crecimiento del tumor.

Pueden usarse modelos predictivos para identificar a los pacientes que probablemente responderán a la terapia con EAT o terapia farmacéutica antiangiogénica antes de, simultáneamente a, o después de someter a los pacientes a terapia con EAT.

Las células EAT pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para cribar dianas farmacéuticas o dianas inmunológicas de antiangiogénesis tumoral, incluyendo por biblioteca de expresión de péptidos aleatoria, cribado de transgenes de cualquier célula que expresa péptidos 6-mer y/o nucleótidos 18-mer que codifican marcos usando estos transgenes.

Las células EAT pueden fusionarse con cualquier otra célula (hibridoma). Las células EAT pueden administrarse con plasma autólogo, plasma bovino, o sistemas transportadores lipídicos artificiales. Las células EAT pueden administrarse a cualquier mamífero, preferiblemente no a ratones.

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Más adelante se describen métodos y materiales adecuados, aunque también pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria.

En caso de conflicto prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción Breve de los Dibujos

La Figura 1 representa el perfil de expresión en la superficie celular de CD3 y CD56 en células CIK de 21 días expandidas *ex vivo* en un biorreactor.

La Figura 2A representa el perfil de citotoxicidad de células CIK de 21 días frente a células tumorales diana (K562, OCI-Ly8, y WM9) y células endoteliales diana (HUVEC).

La Figura 2B representa el perfil de citotoxicidad de células CIK de 21 días cultivadas en un biorreactor y cultivadas en matraces estándar frente a células diana OCI-Ly8.

La Figura 2C representa el perfil de citotoxicidad de células CIK de 21 días frente a células HUVEC recién confluentes y células HUVEC cinco días después de la confluencia.

La Figura 3 representa los efectos de anticuerpos anti-LFA-1 y anti-ICAM-1 en la lisis mediada por las células CIK de células OCI-Ly8 y HUVEC.

La Figura 4 representa los efectos del tratamiento de células efectoras con BFA y/o ConA (CMA) en la lisis de células OCI-Ly8 y HUVEC.

La Figura 5 representa los perfiles de citotoxicidad de clones de células CIK frente a células OCI-Ly8 y HUVEC.

La Figura 6 representa un ratón SCID con un injerto de piel humano de espesor completo.

La Figura 7 representa la protección de EC inducida por Brefeldina A frente a la lisis mediada por CIK.

La Figura 8 representa la protección de EC inducida por Hsp47 frente a la lisis mediada por CIK.

La Figura 9 representa el análisis FACS de células CIK.

La Figura 10 representa la protección de EC inducida por el transgén Hsp47 frente a la lisis mediada por CIK.

Descripción Detallada

Métodos para Generar Células EAT

Las células EAT pueden generarse mediante varios métodos. Los métodos más sencillos implican la incubación de PBL en medios con niveles intermedios a altos de IL-2. Los métodos más elaborados implican selección celular o depleción celular, estimulación con anticuerpos anti-TcR y la incubación con citoquinas o linfoquinas, incluyendo la incubación con interferón gamma (o IL-12 o IL-15) antes de la estimulación con anticuerpos anti-TcR. Los métodos preferidos dan lugar a la expansión de células que expresan CD3, CD56 y CD8. Dichas células tienen un alto nivel de función efectora deseada y de características de seguridad para el paciente.

Las células EAT, p. ej. CIK, pueden generarse a partir de varias fuentes de células hematopoyéticas, p. ej., sangre periférica, médula ósea, bazo, hígado fetal, nódulo linfático, timo, o cualquier tejido del cuerpo que contenga células linfoides. Los precursores de las células EAT pueden enriquecerse *in vitro* mediante varios métodos antes de la inducción con citoquinas. Los métodos ejemplares siguientes pueden usarse bien solos o en combinación antes de la inducción con citoquinas. En un ejemplo, se aíslan células mononucleares de sangre periférica a partir de una muestra de sangre periférica mediante una separación por gradiente de densidad, p. ej., centrifugación en gradiente de densidad ficoll. En otro ejemplo, los precursores de las células EAT en una muestra de células hematopoyéticas se enriquecen seleccionando células no adherentes al plástico (para deplecionar monocitos) y/o células no adherentes a lana de nilón (para deplecionar células B). En otro ejemplo, se seleccionan células que muestran un fenotipo antigénico particular en la superficie celular, p. ej., por reconocimiento y selección o por separación celular. Las células pueden seleccionarse tomando como base la presencia de un antígeno particular, p. ej., CD3, CD56, TCR α/β o TCR γ/δ o CD8. Además, pueden seleccionarse tomando como base la ausencia de un antígeno particular, p. ej., CD4, CD14, CD16, CD19 o CD20.

Las células enriquecidas según los métodos anteriores pueden crearse en los medios de cultivo de linfocitos muy conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., RPMI 1640 completo (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NY) que contiene 10% de suero fetal de ternera (FCS), 50 μ M β -mercaptoetanol (ME), 100 UI de penicilina-G/ml y 100 UI de estreptomycin/ml. Los métodos para la generación de células CIK se describen, p. ej., en Schmidt-Wolf et al. (1999) Br. J. Cancer 81:1009, Hoyle et al. (1998) Blood 92:3318 y Scheffold et al. (1995) Bone Marrow Transplant. 15:33, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia.

Las células CIK pueden generarse a partir de una muestra de células descrita anteriormente exponiendo la muestra de células a la combinación de una mezcla de citoquinas y un anticuerpo anti-CD3, p. ej., el anticuerpo monoclonal OKT3. Las células CIK se generan típicamente mediante una mezcla de citoquinas que incluye IL-2 e IFN- γ . Esta mezcla puede incluir citoquinas adicionales tales como IL-1 α , IL-7 y/o IL-12. IL-7 e IL-12 pueden usarse opcionalmente además de o en lugar de IL-2. En un ejemplo, se añaden 1.000 UI/ml de interferón gamma humano recombinante (rhu γ -IFN) (Genentech, San Francisco, CA) a la muestra de células en el día 0. En el día 1, las células se estimulan con 25-50 ng/ml del anticuerpo monoclonal soluble anti-CD3 humano, OKT-3, y 300 UI/ml de interleuquina-2 humana recombinante (rhu IL-2) (Cetus/Chiron, Emeryville, CA). Los cultivos celulares se mantienen a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ y cada 3-7 días se añade medio fresco que contiene 300 UI de rhu IL-2. Las células CIK generadas según este método pueden usarse, p. ej., para métodos *in vitro* o *in vivo* después de 21 a 30 días en cultivo.

Las células EAT, particularmente las células CIK, pueden generarse usando procedimientos que resultan en una actividad biológica mejorada, número total de células mejorado y función celular individual mejorada programados para solucionar los inconvenientes de estándar previos para cultivar estas células.

Las células EAT, p. ej. CIK, se generan preferiblemente por un medio distinto de los recipientes de medio estático a densidades celulares de entre 0,5 x 10⁶ y 20 x 10⁶.

Preferiblemente, las células EAT se crecen con agitación y/o aireación del cultivo, p. ej., en sistemas de cultivo "cerrados", tales como un biorreactor. Así, se pueden crecer, p. ej., con el uso de plataformas oscilantes, tambores giratorios, biorreactores agitados sin electrodos, biorreactores avanzados especialmente con el uso de electrodos (p. ej., pero no limitado a pO₂, pCO₂, RPM, temperatura, densidad celular/DO) insertados en la cámara de cultivo. Se crecen preferiblemente con una alimentación y recogida continuas. Además puede ser útil emplear recogida y procesamiento de datos analógico o digital, biorreactores agitados con turbina con o sin control de la velocidad, reactores de perfusión, reactores de difusión, reactores de transportador neumático, reactores de fibra hueca, reactores vibromezcladores, reactores con más de una cámara de incubación, reactores que permiten la recogida o muestreo estéril de las células, membranas u otros contenedores (p. ej., contenedores formados por cualquier material plástico o sintético incluyendo bolsas de infusión, bolsas de fluorocarbono, membranas de diálisis, especialmente membranas permeables a gas para cultivo estático) en combinación con cultivo en plataformas oscilantes o cualquier otro medio para agitar los medios en los contenedores. Los recipientes pueden estar formados por plástico, Teflón®, vidrio o acero. Las células pueden crearse en sistemas de soporte sólido o semisólido. Los soportes pueden ser estáticos o agitados.

Las células EAT pueden cultivarse con células no efectoras, incluyendo cocultivo con células dendríticas pulsadas o no pulsadas, células T auxiliares o dianas tumorales.

Las células EAT, p. ej. células CIK, pueden congelarse y transportarse. Por ejemplo, las células EAT o CIK maduras o los progenitores de éstas pueden almacenarse por criopreservación usando métodos establecidos para la conservación y almacenamiento de células madre de la médula ósea. Las células pueden almacenarse o transportarse por debajo de -80°C (entre -80°C y -20°C, entre -20°C y 0°C, entre 0°C y 4°C, o entre 4°C y la temperatura ambiente) con o sin algoritmos de ultracongelación computarizados para disminuir gradualmente la temperatura y con o sin el uso de aditivos anticongelantes. Las células pueden transportarse usando un código de barras, identificación numérica o alfanumérica y sistemas de seguimiento para identificar y entregar los productos para pacientes individuales. Las células pueden congelarse en alícuotas o en masa. Pueden transportarse envasadas y listas para usarse con o sin congelación. Pueden mantenerse en cultivo continuo hasta que se requieran alícuotas adicionales. El transporte puede realizarse durante la noche en hielo húmedo o seco, y las células pueden incluirse en metilcelulosa o alginato de calcio. Pueden transportarse junto con un registro de todos los parámetros del cultivo para el paciente.

Pueden utilizarse micromatrices de ADN, ARN o polipéptido en combinación con células EAT para identificar dianas de cualquier célula antiangiogénica o terapia farmacéutica, para generar CTL específicas de antígeno, para generar dianas para anticuerpos, para generar anticuerpos, para evaluar los resultados del tratamiento usando genes o fragmentos de genes (p. ej., obtenidos de tejido normal, tejidos cancerosos, o angioblastos específicos o preparaciones endoteliales específicas de tejido). Las matrices pueden incluir fragmentos de genes sintéticos diseñados para modelar formas o superficies de interacción tridimensionales con el fin de seleccionar/identificar familias de receptores o contrarceptores en las células EAT como base para estrategias adicionales de purificación y selección. Las células EAT pueden analizarse usando una micromatriz para el propósito de la recogida o análisis de datos de ensayos clínicos con EAT, para evaluar la selectividad vascular o para cualquier otro propósito.

Citotoxicidad No Restringida por MHC Clase I Mediada por Células CIK

Las células CIK cultivadas *in vitro* comparten algunas propiedades fenotípicas y funcionales con las células T y las células NK activadas. Las células CIK presentan una citotoxicidad significativa frente a una variedad de dianas hematopoyéticas y de tumores sólidos así como células endoteliales cultivadas *in vitro* (véanse los ejemplos). Todas las células diana examinadas en la presente memoria expresan niveles normales de MHC clase I. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I, W6/32, no inhibió la lisis de la diana mediada por células CIK. El hecho de que este anticuerpo, que evita la interacción entre un receptor de célula T y una molécula de MHC clase I, no pueda bloquear la lisis de las células tumorales ni endoteliales demuestra que las células CIK representan células T citotóxicas no restringidas por MHC clase I clásico y que no lisan dianas mediante el alo-reconocimiento de las moléculas MHC clase I de la célula diana. Ésta es la base para el uso de células EAT/CIK en entornos alogénicos sin el miedo de causar una enfermedad de injerto frente a anfitrión grave o fatal en el anfitrión.

En términos de inmunología evolutiva, el ataque vascular mediado por células es un mecanismo de defensa antiguo que no parece estar mediado solamente por células NK. En los tunicados formadores de colonias, el ataque vascular no restringido por MHC clase I es uno de los mecanismos principales de rechazo de aloinjerto cuando distintas colonias entran en contacto. La actividad antiangiogénica de las células CIK descrita en la presente memoria puede reflejar la activación de un sistema de reconocimiento propio-no propio antiguo.

La estimulación hormonal de altas dosis (p. ej., IFN- γ e IL-2) de tipo TH₁ de linfocitos de sangre periférica da lugar a la rápida expansión de células efectoras CD3+CD56+ en ausencia de células diana. Antes de esta estimulación, la población de células progenitoras no muestra una citotoxicidad significativa no restringida por MHC clase I frente a dianas tumorales ni EC cultivadas. Las células CIK pueden generarse a partir de fuentes purificadas de células T, y generalmente muestran marcadores de activación y diferenciación (p. ej., CD45RA). La pluralidad de marcadores de superficie expresados en clones de CIK y cultivos en masa hace que sea improbable la existencia de un linaje de células T específico de CIK con un precursor distinto.

Las condiciones de cultivo *in vitro* de CIK que comprenden una estimulación con dosis altas de IL-2 pueden rescatar células T y células NK previamente anérgicas, permitiendo que reanuden la división celular y expresar nuevas especificidades de diana no autorreactivas (Madrenas et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9736). Las condiciones de cultivo de las células CIK, que proporcionan una estimulación con dosis altas de IL-2 así como estimulación mitogénica, pueden rescatar un conjunto heterogéneo de linfocitos de sangre periférica previamente anérgicos. Las células CIK maduras mantienen sus patrones de expresión de receptores no funcionales y adquieren adicionalmente la expresión *de novo* de moléculas efectoras implicadas en funciones antitumorales recién adquiridas. Este modelo no sólo explica la heterogeneidad observada de marcadores de la superficie celular presente en poblaciones de células CIK con la misma funcionalidad, sino que también estudia la pérdida de función asociada con CAM, TcR, CD4 y CD8.

Distintos Mecanismos de la Lisis Celular de Dianas EC y Dianas Tumorales por CIK y EAT

La lisis de células diana por CTL requiere tanto una interacción específica TcR-MHC clase I como la interacción no específica entre las moléculas coestimuladoras ICAM-1 y LFA-1. La coestimulación de las células T mediante la unión ICAM-1/LFA-1 implica la acumulación mediada por la proteína motora miosina de moléculas coestimuladoras de señalización en la interfase célula T/diana tumoral, que da lugar a un proceso de señalización amplificado y prolongado (Wulfig et al. (1998) Science 282:2266; Wulfig et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6302). Las células NK también utilizan la interacción ICAM-1/LFA-1 cuando matan células diana que carecen de la señal apropiada de "no matar" mediada por MHC clase I.

En los estudios descritos en la presente memoria se pusieron de manifiesto distintos mecanismos de reconocimiento de las células tumorales y células EC por las células CIK. La interacción entre ICAM-1 en las dianas tumorales y LFA-1 en las células efectoras CIK era necesaria para la lisis eficaz de las dianas tumorales. Sin embargo, la interacción ICAM-1/LFA-1 no parecía necesaria para la lisis de las células EC mediada por las células CIK. Estos datos sugieren que la citotoxicidad mediada por las células CIK/EAT frente a dianas tumorales y dianas EC está mediada por mecanismos distintos.

Los tratamientos con BFA y conA de las células CIK reveló más diferencias entre la lisis de dianas tumorales y dianas EC. Estos tratamientos se usaron para estimar la contribución de perforina/granzima (tratamiento con conA) y los mecanismos basado en Fas (tratamiento con BFA) en la lisis celular de dianas mediada por las células CIK. La lisis de EC se basó virtualmente completamente en perforina y granzima, mientras que la lisis de las dianas tumorales mediada por las células CIK utilizó ambas vías, dominando la vía Fas en la lisis de dianas hematopoyéticas.

Lisis *In Vitro* de EC por "Citotoxicidad de Espectador No Inocente" de Células EAT

Las células endoteliales vasculares cultivadas secretan fibronectina y laminina tanto en la matriz extracelular (ECM) como en el medio de cultivo (Vlodavsky et al. (1981) Nature 289:304). El control del crecimiento y la diferenciación celular dependen de las interacciones célula-célula y célula-sustrato que están mediadas en parte por receptores de la membrana plasmática para componentes de la ECM tales como fibronectina, laminina y colágeno. La

señalización celular depende, al menos parcialmente, de la movilidad lateral de dichos receptores de la ECM. Esta movilidad puede variar significativamente según el sustrato al que las células se adhieran (colágeno, fibronectina o una membrana basal natural) y de la topografía de la célula (membrana plasmática basal frente a apical) (Nakache et al. (1985) Nature 317:75).

Las condiciones estándar de cultivo de las células endoteliales típicamente privan a las EC del contacto célula-célula, ya que el subcultivo ocurre antes de que se alcance la confluencia de la monocapa. El subcultivo repetido de EC con tripsina elimina las proteínas de la ECM del cultivo y después de la tripsinización las células se depositan en matrices de colágeno estándar cultivadas o desnaturalizadas con calor. Los ensayos de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr usando EC como dianas se realizan típicamente en las 24 horas en las que una monocapa de EC alcanza la confluencia.

Como se describe en la presente memoria, la susceptibilidad de lisis de las monocapas de EC por células CIK *in vitro* está inversamente correlacionada con el momento en el que las EC se cultivan después de alcanzar la confluencia. Esta observación sugiere un papel protector para los factores de la matriz extracelular que se depositan de una manera dependiente del tiempo después de la tripsinización y subcultivo de EC *in vitro*.

La destrucción de EC cultivadas en monocapa por las células CIK *in vitro* no es predictiva de la ocurrencia de VLS cuando las células CIK se inyectan *in vivo* (véanse los ejemplos). Las células CIK son más tóxicas frente a las monocapas de EC no diferenciadas que proliferan recientemente que frente a monocapas de EC inhibidas por contacto a las que se ha permitido depositar fibronectina, laminina y colágeno después de periodos de tiempo largos en cultivo. Las células CIK lisan vigorosamente monocapas endoteliales que crecen en matrices extracelulares desprovistas o que están activadas mitógenicamente. Estas características son comunes a las monocapas de EC cultivadas en subconfluencia y a la angiogénesis tumoral.

El cultivo de EC como monocapas proliferativas interfiere con su diferenciación y disminuye la producción del ARNm de la fibronectina. En entornos *in vitro* más relevantes fisiológicamente que limitan la proliferación celular, las EC tienden a organizarse en estructuras tubulares tridimensionales viables y tienen una producción incrementada del ARNm de la fibronectina (Jaye et al. (1985) Science 228:882). Se ha mostrado que la activación de EC con acetato miristato de forbol (PMA), un promotor tumoral que incrementa de manera importante la producción por EC de collagenasa y activador del plasminógeno, da lugar a la degradación de la ECM que precede la invasión de espacios perivasculares con neoangiogénesis rápida, un proceso que puede bloquearse por el inhibidor de la metaloproteasa 1,10-fenantrolina (Montesano et al. (1985) Cell 42:469). El descubrimiento *in vitro* de que la activación de EC está asociada a la expresión de la collagenasa IV y es sinérgica con la expresión del factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF) mitógeno se confirmó adicionalmente *in vivo* con la demostración de que bFGF y la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) son sinérgicos en la inducción de lesiones angiogénicas similares al sarcoma de Kaposi en ratones. La sinergia se debe a un crecimiento incrementado de las células endoteliales y la expresión de la collagenasa de tipo IV en respuesta a bFGF que mimetiza las proteínas de la matriz extracelular (Ensoli et al. (1994) Nature 371:674).

Neo-Vasculatura Tumoral como una Diana Selectiva de Inmunoterapia Adoptiva con Células T

Las células CIK son singulares por su potente efecto antitumoral *in vivo* sin causar GvHD o VLS mensurable en los modelos murinos. Este descubrimiento se demostró por primera vez utilizando células CIK humanas en un modelo SCID/hu *in vivo* de purgado para el linfoma de células B SU-DHL₄ (Lu et al. (1994) J. Immunol. 153:1687). En estos estudios iniciales, las paredes vasculares de los animales tratados eran de origen murino. La ausencia de GvHD y VLS en este sistema era así potencialmente atribuible a la ausencia de interacciones de moléculas de adhesión celular humano a murino eficaces. En los experimentos descritos en la presente memoria, se usó un sistema SCID murino con aloinjertos de piel humana ortotópicos de espesor completo para proporcionar moléculas de adhesión celular humanas en las paredes de los vasos de los injertos de piel. La línea celular de melanoma WM9 es angiogénica e induce selectivamente la hipertrofia de la neovasculatura humana cuando se inyecta en ratones SCID (Juhász et al. (1993) Am J Pathol 143:528).

Usando el sistema SCID murino, las células CIK expandidas *ex vivo*, cuando se inyectan en ratones, carecieron de alorreactividad, no causaron VLS y no dañaron la vasculatura normal ni de origen murino ni humano. Los injertos de piel establecidos no mostraron signos de infiltración local de células CIK, inflamación o GvHD. Sólo la neoangiogénesis humana de los tumores sólidos fue la diana selectiva de la vigilancia inmune mediada por las células CIK en los injertos infiltrados de WM9, demostrando así que un subconjunto de CIK que comprende células EAT no tiene como diana la vasculatura que está fuera de la proximidad del tumor. No se detectó que los lechos vasculares normales fuera de la proximidad del tumor fueran diana de las células CIK. Estos resultados demuestran la existencia de una función de vigilancia inmune de las células EAT, dirigida frente a la neoangiogénesis tumoral. Las células EAT pueden representar un prototipo de células asesinas expandidas *ex vivo* para la terapia antiangiogénica adoptiva del cáncer. Este modelo particularmente sofisticado puede usarse para el análisis de las células CIK y de otras células EAT.

Un Papel para las Células EAT Expandidas *Ex Vivo* en la Inmunoterapia Adoptiva del Cáncer

La seguridad clínica de la terapia con células NK activadas ha sido una preocupación existente desde hace mucho tiempo después de los resultados de destrucción endotelial masiva y VLS fatal como efectos clínicos secundarios de la administración de células LAK e IL-2 (Rosenberg et al. (1987) N. Engl. J. Med. 316:889). La expansión celular engorrosa, inseguridad acerca de la disponibilidad de dosis celulares suficientemente altas de manera oportuna y la corta duración a temperatura ambiente de las células NK activadas también pueden haber impedido la aceptación clínica amplia de estos agentes celulares que de otra manera serían prometedores para la terapia adyuvante del cáncer.

Como se describe en la presente memoria, las funciones citotóxicas deseadas de la citotoxicidad directa frente a dianas tumorales y reconocimiento antineoangiogénico no están limitadas a las poblaciones de células NK/EAT activadas. Los cultivos de CIK EAT se expanden rápidamente hasta números altos de células T a partir de precursores de sangre periférica y activan vías de citotoxicidad no restringida por MHC clase I frente al tumor y la neoangiogénesis tumoral.

Como se describe en la presente memoria, pueden activarse al menos dos vías distintas como propiedades de células EAT clonales. Una de estas vías determina la citotoxicidad frente a dianas tumorales y la otra determina la citotoxicidad frente a endotelios aberrantes o neoangiogénicos. Las células EAT/CIK son distintas de las células NK activadas en que atacan más selectivamente la vasculatura tumoral pero no causan VLS o GvHD *in vivo*. *In vitro*, las células CIK lisan las dianas tumorales de una manera dependiente de ICAM-1/LFA-1 y lisan EC de una manera independiente de ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4. Se ha publicado que la última es una característica necesaria de la adhesión de A-NK a la vasculatura tumoral (Melder et al. (1996) Nat. Med. 2:992). Sin embargo, una correlación de la adhesión de A-NK a la vasculatura tumoral no se ha correlacionado con una mejora de los resultados del cáncer (Ferrara (1996) Nat. Med. 2:971).

Las células EAT muestran una alta selectividad *in vivo* para la vasculatura tumoral y median la infiltración y destrucción de los vasos neoangiogénicos. Se ha indicado que subconjuntos de células T activados estudiados previamente carecen de la capacidad de adherirse al endotelio (Melder et al. (1996) Nat. Med. 2:992). El perfil de dianas de las células EAT expandidas *ex vivo*, la facilidad con la que se generan, y sus efectos secundarios relativamente mínimos pueden facilitar su aceptación clínica como agentes antiangiogénicos para la terapia inmunológica del cáncer.

Métodos de Tratamiento

Las células EAT pueden administrarse a un individuo para tratar un trastorno proliferativo celular. Las células EAT pueden administrarse al individuo por una variedad de rutas, p. ej., intramuscular, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea. El tratamiento puede consistir en una única administración o comprender múltiples administraciones dadas en el curso de días, semanas, meses o años. Se espera que el número de células administrado varíe dependiendo de factores tales como el individuo, la ruta de administración y las características de la enfermedad. La dosificación puede basarse en las unidades líticas, p. ej., midiendo la actividad frente a células endoteliales y/o células tumorales cultivadas (p. ej., líneas de células tumorales).

Las células EAT administradas a un individuo pueden tener un origen autólogo o alogénico. Además, los cultivos de células EAT pueden ser cultivos en masa (policlona) o poblaciones de células EAT clonales. En cualquier caso, la población de células EAT que se va a usar en un tratamiento dado puede seleccionarse tomando como base una cualidad particularmente deseada. Por ejemplo, pueden seleccionarse las células EAT que tienen un potencial citotóxico particular como se demuestra en un ensayo funcional *in vitro* o *in vivo*. En otro ejemplo, pueden seleccionarse las células EAT que tienen un perfil antigénico asociado con citotoxicidad y/o la presencia o ausencia de alorreactividad.

Las células EAT pueden usarse en monoterapia (es decir, como una única modalidad terapéutica) o en terapia de combinación con cualquier quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia adyuvante, terapia inmunológica conocidas o cualquier otra terapia clínicamente probada o experimental. Pueden administrarse incluidas en gel (p. ej., incluidas en MatriGel), encapsuladas (p. ej., por el método del alginato de calcio). Además, todos estos métodos pueden usarse con o sin el uso de ultrasonificación para la homogeneización *in situ* de las células EAT y la liberación de sus contenidos citotóxicos.

Las células EAT pueden administrarse intraperitonealmente, especialmente para tumores ascíticos y aquellos con implantes intraperitoneales (tal como cáncer de ovario), por aplicación intratecal (tal como para cánceres neurológicos y/o metástasis en el cerebro), por inmuoembolización usando un procedimiento similar al procedimiento de radiología intervencional conocido como quimioembolización. En este procedimiento, el agente antitumoral en una alta concentración se libera directamente en el suministro de sangre final del tumor primario o metastásico y el vaso sanguíneo que soporta el tumor se sella mediante una forma de gel, una espiral, un clip o equivalente.

Las células pueden administrarse por canulación directa de la vasculatura tumoral o un vaso que soporta el tumor junto con un reservorio de células EAT. Este método permite la liberación continua o pulsada de las células EAT (y otros factores del reservorio) e incluye la opción de un relleno continuo o esporádico del reservorio. El dispositivo puede ser temporal o permanente. Alternativamente, las células EAT o las composiciones que las comprenden pueden

administrarse directamente al tumor o a la cavidad que permanece después de la escisión quirúrgica de un tumor o partes de éste con o sin el uso de un catéter.

Aunque las células EAT pueden inyectarse simplemente en un sitio distante del tumor que se va a tratar, también pueden administrarse quirúrgicamente directamente en la región del tumor. Así, puede administrarse una composición que comprende células EAT y matrices, geles, sólidos, esferas, fibras, colágeno o material tisular.

Las células EAT pueden usarse en combinación con el reconocimiento génico del cáncer o de las células efectoras en sí mismas. Así, puede emplearse la expresión transitoria o estable de marcadores de superficie que no se encuentran habitualmente en las células EAT. Por ejemplo, CD20 puede expresarse y usarse como un sitio de unión para un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multispecífico.

Las células EAT pueden transfectarse de manera transitoria o estable con un gen suicida (que permite la inducción controlada de la muerte celular), gen del receptor Hsp47, un gen KIR, gen TCR, gen de anticuerpo antiidiotípico o una biblioteca de expresión de péptidos.

Las células EAT pueden administrarse en lesiones óseas líticas (p. ej., en cáncer de mama o en mieloma múltiple) o en espacios de la médula ósea con una carga patológica significativa de cánceres hematológicos que sugiere neovascularización.

Además de los métodos terapéuticos *in vivo*, los cultivos de células EAT descritos en la presente memoria pueden usarse para purgar médula ósea autóloga en el contexto de un trasplante de médula ósea (BMT) autólogo, p. ej., para pacientes con leucemia mielógena crónica (CML) sometidos a BMT autólogo. Si se usan clones de células EAT en este proceso de purgado, los clones pueden seleccionarse tomando como base perfiles citotóxicos particulares según se determina por sus marcadores de la superficie celular o su potencia en ensayos funcionales.

Los clones pueden immortalizarse o usarse en un contexto alogénico como "donante estándar" de células EAT para pacientes que son incapaces de donar precursores de células EAT suficientemente viables, suficientemente expandibles o suficientemente funcionales, p. ej., cuando la duración del tratamiento es relativamente corta (p. ej., menos de aproximadamente 14 días). Esto es similar al uso de productos sanguíneos que son del grupo sanguíneo O, Rh- (donante universal).

Métodos para Evaluar la Selectividad de las Células EAT

Con el fin de identificar (o ensayar) las células por la capacidad de atacar vasculatura no deseada (p. ej., vasculatura tumoral), puede compararse la toxicidad de las células frente a células HUVEC en presencia y ausencia de Hsp47. La toxicidad (medida usando el ensayo descrito más adelante) en ausencia de Hsp47 es una medida de la toxicidad de las células frente a la vasculatura tumoral mientras que la toxicidad (medida usando el ensayo descrito más adelante) en presencia de Hsp47 es una medida de la toxicidad de las células frente a la vasculatura normal.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y Mantenimiento de Células y Líneas Celulares

(A) Células CIK

Las células CIK humanas se prepararon a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de sangre venosa total y capas leucocitarias de donantes sanos (Stanford Blood Center, Stanford, CA). Los PBL se aislaron usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). Los PBL aislados según este método se resuspendieron a una densidad de $0,5-2 \times 10^6$ células/ml en RPMI 1640 (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NY) que contiene 50 μ M β -mercaptoetanol (ME), 100 UI penicilina-G/ml, 100 UI estreptomicina/ml y 10% de suero fetal de ternera (FCS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Posteriormente, se obtuvo una población enriquecida de linfocitos grandes granulares (LGL) y células T por la exclusión de células adherentes a plástico y lana de nilón. La población enriquecida se cultivó en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono a 37°C.

La población celular enriquecida se estimuló en el día 0 mediante la adición de 1.000 UI/ml de interferón gamma humano recombinante (rhu γ -IFN) (Genentech, San Francisco, CA). En el día 1, la población celular se estimuló con: (1) 50 ng/ml del anticuerpo monoclonal soluble anti-CD3 humano, OKT-3 (obtenido del hibridoma obtenido de la American Tissue Culture Collection, Rockville, MD) y; (2) 300 UI/ml de interleuquina 2 humana recombinante (rhu IL-2) (Cetus/Chiron, Emeryville, CA). Los cultivos se mantuvieron mediante la adición de 50% de medio fresco y 300 UI de rhu IL-2 cada 3 a 4 días durante 21 a 28 días.

En el día 14, se ensayó la actividad lítica de las células CIK producidas según el método anterior en ensayos de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr frente a dianas tumorales y EC.

Para la producción a gran escala de las células CIK a partir de un único donante, se cultivaron células no adherentes a lana de nilón a 37°C en las condiciones de inducción de CIK descritas anteriormente, con la excepción de

que las células se mantuvieron a una densidad de $5-10 \times 10^6$ células/ml en biorreactores agitados con turbina/impulsor con una capacidad de 500 ml, 1.000 ml (Nalgene, Rochester, NY) y/o uno mayor de 15.000 ml con pO₂ y pH controlados (Chemap, Völketsvil, Suiza).

(B) Células Endoteliales

5 Se cultivaron células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) recién aisladas de un único donante o un conjunto de HUVEC de varios donantes (ATCC, Rockville, MD) en frascos de cultivo tisular recubiertos con gelatina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), placas de 6 pocillos o placas de 24 pocillos (Corning, Corning, NY) en medio TC-199 o en medio Ham F12-K. El medio de cultivo de EC se suplementó con 100 UI penicilina-G/ml, 100 UI estreptomicina/ml, 5 µg de heparina porcina/ml, 20% FCS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 80 µg mitógeno endotelial/ml (Biomedical Technology Inc., Stoughton, MA) y las células se mantuvieron en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de alcanzar el 90% de confluencia, las HUVEC se subcultivaron usando 0,25% tripsina y 0,02% EDTA en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺.

(C) Dianas Tumorales

15 Las líneas celulares de tumor hematopoyético SU-DHL, OCI-Ly8 y K562 se cultivaron a una densidad de $0,5-2 \times 10^6$ células/ml en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NY) que contiene 50 µM β-mercaptoetanol (ME), 100 UI penicilina-G/ml, 100 UI estreptomicina/ml y 10% de FCS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Las líneas celulares de melanoma WM9 y 1205 LU (Dr. M. Herlyn, Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA) se mantuvieron en frascos de cultivo tisular tratados (Beckton Dickinson, San Jose, CA) en medio MCDB 153 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 5 µg/ml de insulina y 2% de FCS en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono a 37°C.

Ejemplo 2: Ensayos de Citotoxicidad de Liberación de ⁵¹Cr

25 Las células diana usadas en los ensayos de citotoxicidad se marcaron metabólicamente con ⁵¹Cr (DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) incubando 1×10^6 células con 300 mCi de ⁵¹Cr a 37°C durante 1-1,5 horas. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 0,1% de albúmina de suero bovino. Las células diana marcadas se distribuyeron en triplicado en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo. Las células efectoras (CIK) se añadieron en las proporciones indicadas. Los anticuerpos monoclonales se incubaron con las células diana durante 15-30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de las células efectoras. El volumen final de la mezcla de ensayo en cada pocillo fue 0,2 ml. Después de 4 horas a 37°C, las células se recogieron por centrifugación y una alícuota del sobrenadante se contó en un contador gamma (Micromedic Systems, Horsham, PA). El porcentaje de liberación

$$\% \text{ liberación específica de } ^{51}\text{Cr} = \frac{(\text{liberación de ensayo}) - (\text{liberación espontánea}) \times 100\%}{(\text{liberación máxima}) - (\text{liberación espontánea})}$$

específica de ⁵¹Cr se calculó según la ecuación siguiente:

35 La liberación espontánea se determinó incubando las células diana marcadas en medio completo solo. La liberación máxima se determinó lisando las células marcadas con 1% NP-40. Los experimentos se realizaron en ensayos en triplicado y los datos en conjunto del cultivo de CIK se repitieron con tres donantes diferentes aleatorios.

Ejemplo 3: Expansión Ex Vivo y Perfil Citotóxico de las Células CIK

40 Del tres al cinco por ciento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sin manipular presentan un fenotipo CD3⁺56⁺. La expansión preferente de células CD3⁺56⁺ es observable tan pronto como en el día 10 de cultivo (usando las condiciones de cultivo de células CIK del Ejemplo 1), cuando 12-15% de las células se tiñen positivamente para el fenotipo CD3⁺56⁺. Los cultivos del día 14 al día 28 rindieron típicamente 30-50% de células CD3⁺56⁺.

45 La expresión en la superficie celular de CD3-y CD56 se analizó para células CIK maduras (día 21) que se expandieron ex vivo en biorreactores. Aproximadamente 10^6 células CIK se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD56-PE y anti-CD3-FITC según las recomendaciones del fabricante y se analizaron en un FACS-Star® (Beckton-Dickinson, San Jose, CA). El gráfico de contorno de un lote típico de células CIK (Figura 1) muestra que 26,5% de las células CIK son CD3⁺56⁺ y 2,3% son CD3⁺56⁺.

Cuando se usan como efectoras en los ensayos de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr, las células CIK de 21 días (cultivadas como se describe en el Ejemplo 1) fueron capaces de mediar una actividad antitumoral significativa frente a las líneas celulares de linfoma de células B OCI-Ly8 y SU-DHL₄ y frente a la línea celular de leucemia mieloide K562 (Figura 2A). Además, las células CIK también lisaron, aunque en menor medida, HUVEC cultivadas recién

confluentes (subcultivo número tres) (Figura 2A). Las células CIK mostraron una citotoxicidad directa mínima frente a la línea celular de melanoma WM9 (Figura 2A).

Los cultivos de células CIK crecidos en biorreactores agitados con impulsor pueden crecerse hasta una densidad de $5\text{-}10 \times 10^6$ células/ml, una densidad que es diez veces la de un cultivo en matraz estático. El uso de un biorreactor de 15 litros con un control opcional de pH y pO_2 permite la expansión de hasta 3×10^{11} células CIK en el día 21 a partir de PBMC de capa leucocitaria única, poseyendo más del 25% de las células un fenotipo CD3^+56^+ . Las células CIK crecidas en biorreactor se compararon con las células CIK cultivadas en matraces de cultivo tisular estáticos convencionales (generadas a partir de una alícuota de la misma capa leucocitaria de PBMC) en un ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr frente a la diana tumoral OCI-Ly8. La actividad lítica de las células CIK crecidas en biorreactor excedió la de las células CIK crecidas en matraces estándar, medida frente a la diana tumoral OCI-Ly8 a una proporción E:T de 10:1 (Figura 2B).

Se encontró que la duración de la confluencia de la monocapa de EC se correlacionaba con la sensibilidad a la citotoxicidad de las células CIK. El subcultivo trípico rutinario de HUVEC se realizó generalmente cuando las células alcanzaban más del 80% de confluencia. Los ensayos de liberación de ^{51}Cr usando HUVEC cultivadas como dianas se realizaron en dos puntos de tiempo: (1) cuando la confluencia de HUVEC se acababa de alcanzar ("recién confluentes"); y (2) cuando las monocapas de HUVEC se cultivaron durante cinco días después de alcanzar la confluencia (el medio se cambió cada 48 horas). Las HUVEC recién confluentes se lisaron con células CIK tres veces más fácilmente que las monocapas de HUVEC confluentes durante cinco días (Figura 2C).

Ejemplo 4: Efecto de Anticuerpos Monoclonales en la Lisis Mediada por Células CIK

Se ensayó un amplia gama de anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de adhesión celular (CAM), marcadores de células T, y marcadores de células NK en ensayos de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr para determinar el papel de estas moléculas de la superficie celular en la citotoxicidad no restringida por MHC de clase I mediada por células CIK frente a dianas tumorales y EC. Los anticuerpos monoclonales usados en estos experimentos impedían estéricamente la interacción entre las moléculas de receptor y de ligando, sin estimular los eventos de señalización mediados por el receptor (Shields *et al.* (1998) Tissue Antigens 51:567). Antes de la adición de las células efectoras al ensayo, se añadió anticuerpo monoclonal purificado sin NaN_3 a las células diana a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ de medio y se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 15 minutos. Se usaron anticuerpos con isotipo coincidente como controles. Las células efectoras se añadieron directamente a las dianas tratadas a una proporción 20:1 de E:T y se incubó en estándar durante 4 h. El resto del ensayo de citotoxicidad se realizó como se ha detallado anteriormente, a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 .

Los anticuerpos monoclonales frente a MHC clase I, marcadores de células T CD4, CD8, $\text{TcR}\alpha/\beta$ y $\text{TcR}\gamma/\delta$ y marcadores de células NK CD16, CD56, NK-B1 y Nkp40 no bloquearon la citotoxicidad de ninguna de las dianas. Los anticuerpos monoclonales frente a varias CAM (véase la Tabla 1) tampoco tuvieron efecto en la citotoxicidad mediada por las células CIK, con la excepción de los anticuerpos anti-ICAM-1 y anti-LFA-1. Los anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1 y anti-LFA-1 redujeron significativamente la lisis de las dianas tumorales por CIK, pero no de las dianas EC (Figura 3 y Tabla 1). No se identificaron anticuerpos monoclonales en estos experimentos que fueran capaces de bloquear la citotoxicidad mediada por las células CIK frente a dianas EC.

TABLA 1: Estudios De Bloqueo De La Citotoxicidad De CIK Con Anticuerpos Monoclonales			
Clase de Molécula:	Anticuerpo Frente A:	> 15% Reducción De La Lisis De EC	> 15% Reducción De La Lisis Del Tumor
Control	Isotipo irrelevante	-	-
MHC	MHC I (W6/32)	-	-
Marcadores De Células T	TCR α/β		
	TCR γ/δ	-	-
	CD 2 (LFA-2)	-	-
	CD 4	-	-
	CD 8	-	-
Marcadores De Células NK	CD 16	-	-
	CD 56	-	-
	p40 (mediante Mab NKTA 255)	-	-
	NKB1-Kir1 (mediante Mab DX 9)	-	-

TABLA 1: Estudios De Bloqueo De La Citotoxicidad De CIK Con Anticuerpos Monoclonales			
Clase de Molécula:	Anticuerpo Frente A:	> 15% Reducción De La Lisis De EC	> 15% Reducción De La Lisis Del Tumor
Moléculas De Adhesión Celular, Integrinas $\beta 2$	ICAM-1 (CD 54)	-	+
	LFA-1 (CD 18/11a)	-	+
	CD 18 (LFA-1 cadena β)	-	+
	CD 11a (LFA-1 cadena α)	-	+
	CD 11b (Mac-1 cadena α)	-	-
	CD 11c (CR 4 cadena α)	-	-
Otras CAM	CD 34	-	-
	PECAM-1 (CD 31)	-	-
	VAP-1	-	-
	VCAM-1	-	-
	VLA-4	-	-
	N-Cadherina	-	-

Ejemplo 5: Efecto de Brefeldina A y Concanamicina A en la Lisis Mediada por Células CIK

5 La brefeldina A (BFA) bloquea el transporte de FasL desde los almacenamientos intracelulares hacia la superficie celular (Lippincott-Schwartz et al. (1989) Cell 56:801; Lippincott-Schwartz et al. (1990) Cell 60:821; y Orci et al. (1991) Cell 64:1183). Se utilizaron células efectoras tratadas con BFA en ensayos de citotoxicidad para evaluar la

contribución fraccionaria de la vía Fas/FasL a la actividad lítica total de las células CIK frente a varias dianas. Para el tratamiento de las células efectoras con BFA, se incubaron 10^6 células CIK con medio suplementado con $1 \mu\text{M}$ BFA (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) y se incubaron durante 2 horas en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono a 37°C . La BFA se disolvió a $100 \mu\text{g/ml}$ en 70% etanol y se usó fresca o se almacenó hasta 4 semanas a -20°C . Antes de los ensayos de citotoxicidad, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió medio fresco sin BFA.

La concanamina A (conA) depleciona la perforina contenida en los gránulos de las células T citotóxicas (Kataoka et al. (1996) J. Immunol. 156:3678; Ohminami et al. (1999) Blood 93:925). Se usaron células efectoras tratadas con conA en ensayos de citotoxicidad para aproximar la contribución fraccionaria de la vía perforina/granzima al total de la citotoxicidad mediada por las células CIK. Para el tratamiento de las células efectoras con conA, las células CIK se lavaron y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en medio completo que contiene $0,1 \mu\text{M}$ conA (Sigma, St. Louis, MO). Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO_2 . Al final de la incubación, las células CIK se lavaron y se usaron como efectoras en los ensayos de citotoxicidad.

Se preincubaron células CIK de 21 días con BFA, conA, o ambas, se lavaron y se ensayaron frente a dianas de células tumorales y EC. El tratamiento de las células efectoras con BFA y el bloqueo asociado del transporte de FasL redujo la lisis por CIK de la diana tumoral OCI-Ly8 un 33% pero no tuvo efecto en la lisis de dianas EC (Figura 4). El tratamiento con conA de las células efectoras y la depleción asociada de los almacenamientos de perforina redujo la lisis tumoral por CIK de OCI-Ly8 un 66% y eliminó completamente la lisis de EC (Figura 4).

Ejemplo 6: Mecanismos Clonales para la Citotoxicidad Dirigida a EC y Tumores

Se generaron clones de células CIK como sigue. Se obtuvieron células $\text{CD}3^+\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ por separación FACS de la población de células no adherentes a lana de nilón descrita anteriormente en el Ejemplo 1. Para el análisis y separación FACS, aproximadamente 10^6 células se lavaron dos veces con tampón PBS que contiene Ca^{2+} , Mg^{2+} y 5% FCS, se suspendieron en $50 \mu\text{l}$ del tampón y se pusieron a $0-4^\circ\text{C}$ en oscuridad. Se mezcló con las células $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo monoclonal marcado con FITC, PE, Per-CP o Tricolor (Beckton Dickinson, San Jose, CA) por reacción de tinte de 10^6 células y se incubó durante 15 a 30 minutos a $0-4^\circ\text{C}$ en oscuridad. Las células teñidas se sometieron a tres lavados posteriores con 10 volúmenes de PBS que contiene Ca^{2+} , Mg^{2+} y 5% FCS y se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ de este tampón para análisis o separación por FACScan/FACStar (Beckton Dickinson, San Jose, CA) con excitación a 488 nm y los filtros de canal apropiados para la detección de la emisión.

Los cultivos en masa de las células separadas $\text{CD}3^+\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ se mantuvieron durante 72 horas en las condiciones de inducción de CIK descritas anteriormente. Después de este periodo de cultivo, se obtuvieron clones de CIK por dilución limitante que consiste en depositar una media de 0,6 células por pocillo de una placa de 96 pocillos. Los pocillos contenían cultivos de células CIK de soporte irradiadas dos veces a 1×10^6 células/ml y se les suministró IL-2 fresca a 300 UI/ml cada cinco días de cultivo.

Las poblaciones clonales de células CIK se expandieron hasta más de 2×10^6 células por cultivo. Cuando se usaron como efectoras en los ensayos de citotoxicidad, la especificidad de diana varió con los clones individuales. Las especificidades líticas de los clones CIK fueron como sigue: (1) lisis de dianas tumorales pero no de dianas EC; (2) lisis de dianas EC pero no de dianas tumorales; o (3) lisis tanto de dianas tumorales como de dianas EC.

Las propiedades líticas de tres clones representativos se muestran en la Figura 5. El clon 2D10 reconoció OCI-Ly8 con una lisis específica $>60\%$ a una proporción E:T de 2:1 y no reconoció HUVEC. El clon 5F7 presentó una citotoxicidad potente frente a HUVEC cultivadas y una actividad mínima frente a OCI-Ly8. El clon 2C10 reconoció tanto las dianas tumorales como las endoteliales eficazmente. La especificidad dual del clon 2C10 fue el tipo más comúnmente observado.

Ejemplo 7: Inmunoterapia Adoptiva Mediada por las Células CIK

La capacidad de las células CIK para destruir selectivamente las células tumorales *in vivo* se ensayó en un modelo de ratón que comprende injertos de piel humanos de espesor completo crecidos ortotópicamente, melanoma nodular humano WM9 crecido ortotópicamente y células CIK inyectadas intraperitonealmente. Este modelo se estableció para evaluar en condiciones fisiológicas la actividad directa antitumor mediada por las células CIK así como la actividad antineoangiogénica dirigida frente a la vasculatura tumoral. La línea celular de melanoma WM9 obtenida de seres humanos es angiogénica cuando se propaga en ratones, induciendo selectivamente la hipertrofia de la neovasculatura humana pero no murina (Juhász et al. (1993) Am J Pathol 143:528).

El sistema de modelo de ratón se estableció como sigue. Se irradiaron ratones SCID hembras de seis semanas (Dr. I. Weissman, Stanford University, Stanford, CA) a 500 Rads un día antes del injerto de piel. Se prepararon injertos de prepucio humano de espesor completo exponiendo asépticamente sus lechos vasculares subcutáneos, y recortando sus bordes para rendir un injerto de $20 \times 30 \text{ mm}$. Se rechazaron las muestras de prepucio que dieron lugar a injertos más pequeños o que habían estado más de 24 horas a temperatura ambiente. Se prepararon animales anestesiados en un entorno operativo a 37°C despejando asépticamente áreas marcadas en sus flancos. Los injertos de piel de espesor

completo se pusieron con sutura absorbible interrumpida, se vendaron asépticamente y los animales injertados se guardaron separadamente hasta que fue evidente que el injerto había prendido completamente.

Después de que el injerto se hubo prendido, se inyectaron intradérmicamente 10^5 células de melanoma WM9 suspendidas en PBS en un único sitio de la piel humana de espesor completo de animales en triplicado. El crecimiento tumoral se evaluó por observación y palpación. A los animales con una carga tumoral nodular evidente que excedía un diámetro de 5 mm se les inyectó intraperitonealmente 10^7 células CIK (suspendidas en RPMI sin FCS ni IL-2) con una actividad lítica probada en un ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr realizado el mismo día en el día de cultivo 14-21 de CIK. Los animales se sacrificaron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección de CIK. Los órganos internos y los injertos piel/melanoma humanos se fijaron y analizaron por microscopía óptica de las secciones de tejido teñidas con H y E e inmunoperoxidasa de anti-CD3 humano, PE-CAM humano y antígenos ker humanos (Dr. O. Kamel, Stanford University, Stanford, CA).

A las seis semanas del injerto de piel inicial, se establecieron injertos de piel humanos de espesor completo en la parte dorsal de los ratones anfitriones SCID (Figura 6a) y mostraron una histología humana normal (Figura 6b). Cuando se inyectaron intradérmicamente con células de melanoma nodular humano WM9, se desarrollaron numerosos nidos de tumor sólido de melanoma nodular en la dermis de los injertos de espesor completo (Figura 6d, 6e). El origen humano de la neovascularización tumoral hipertrofiada se confirmó por inmunodetección histológica (IPOX) usando una especie de anticuerpo monoclonal específica de anti-PECAM-1 humano (Figura 6h). Los histomicrográficos demostraron que estas masas tumorales nodulares invadían los capilares de origen humano hipertróficos circundantes (Figura 6g). No se observó metástasis en los tejidos murinos.

En los experimentos anteriores, se inyectaron aproximadamente 10^7 células CIK maduras en la cavidad peritoneal de los ratones que presentaban: (1) injertos establecidos de piel humana de espesor completo; o (2) injertos de piel humana de espesor completo con carga de melanoma nodular ortotópico. Los injertos de piel con y sin carga tumoral se recogieron en el día 3 después de la inyección intraperitoneal de las células CIK. Ninguno de los ratones desarrolló signos de síndrome de hiperpermeabilidad vascular. No hubo una evidencia visible de infiltración de piel alorreactiva por las células CIK o inflamación acompañante a ningún punto de tiempo después de la inyección de las células CIK ni en el control ni en los injertos de piel de melanoma (Figura 6c, 6f). Las células CIK humanas inyectadas fueron detectadas por inmunohistoquímica de anti-CD3 humano.

Las células CIK migraron selectivamente a los lechos vasculares que sirven de suministro a los nódulos tumorales (Figura 6f). El perímetro de la vasculatura tumoral fue rodeado por un infiltrado celular denso concéntrico de linfocitos humanos con tinción $\text{CD}3^+$. Las células $\text{CD}3^+$ transmigraron selectivamente a la proximidad del tumor y causaron edema y destrucción tisular neovascular. La vasculatura y los espacios perivasculares de los injertos de piel control sólo mostraron una tinción mínima de fondo de $\text{CD}3^+$ (Figura 6c). Los numerosos recubrimientos endoteliales de los vasos dérmicos del injerto control permanecieron intactos sin infiltrados linfocíticos focales. El bazo, pulmón y médula ósea atroficos murinos carecían de manera similar de infiltrados linfocíticos. Las células CIK se colocaron con las células de melanoma que invadían los capilares endoteliales, sin embargo no fue evidente una lisis tumoral directa (Figura 6g).

Ejemplo 8: Brefeldina A Protege a EC de la Muerte No Restringida por MHC I

La Figura 7 ilustra los resultados de un experimento que demuestra que la brefeldina A (BFA; un compuesto que bloquea el transporte de proteínas del golgi al RE) protege a EC de la muerte no restringida por MHC I. Las dianas de CIK se trataron con BFA y/o tunicamicina (TM). El pretratamiento con BFA no redujo la muerte de las dianas tumorales o linfoblastoides. Sin embargo, suprimió la lisis mediada por CIK de EC en un ensayo de liberación de ^{51}Cr (proporción E:T 20:1) con una protección completa a $10 \mu\text{M}$ BFA. Esta resistencia se mantiene después de eliminar BFA del medio. La diana linfoblastoide resistente AMK se hizo susceptible mediante un pretratamiento de 22 h con TM que no revirtió por tratamiento con BFA. Ni TM ni TM y BFA juntos alteraron la lisis mediada por CIK de las dianas tumorales OCI-Ly8.

El tratamiento de EC con BFA incrementa los niveles extracelulares de Hsp47, dando lugar al efecto protector. Pueden identificarse moléculas protectoras adicionales tratando las células con BFA y cribando para detectar agentes protectores en el cultivo o extracto de EC tratadas con BFA.

Ejemplo 9: Una Proteína de Fusión rhuHsp47-GST Expresada en Bacterias Protege a EC de la Lisis por CIK de una Manera Dependiente de la Dosis

Un ensayo de liberación de ^{51}Cr (proporción E:T 20:1) demostró que la proteína de fusión rhuHsp47-GST purificada por afinidad protege a EC de la lisis mediada por CIK (Figura 8). La proteína GST control no tuvo efecto en la lisis. Sin embargo, una cantidad tan pequeña como 1 nM de la proteína de fusión rhuHsp47-GST redujo la lisis de las células EC un 50% y la preincubación con $100 \mu\text{M}$ de la proteína de fusión rhuHsp47-GST protegió completamente a EC de la lisis mediada por CIK. En este estudio, las células se lavaron después de la incubación con la proteína de fusión y antes de la exposición a CIK, lo que demuestra que Hsp47 interacciona con EC o la matriz extracelular es eficaz durante el periodo de incubación.

Ejemplo 10: Una Proteína de Fusión rhuHsp47-GST Etiquetada con GFP Identifica un Subconjunto de 26% de las Células CIK

Como se muestra en la Figura 9, el análisis FACS de las células CIK (cultivo de 21 días) con una proteína de fusión rhuHsp47-GST etiquetada con GFP y CD56-PE reveló que el 26% de las células CIK se teñían con la proteína de fusión Hsp47, 39,7% se teñían con la proteína de fusión CD56 y 6,6% se teñía con ambas.

Ejemplo 11: Las Células EC Transfectadas con Hsp47, pero no con una Deleción RDEL de Hsp47, están Protegidas de la Lisis Mediada por CIK

Se transfectaron EC con Hsp47 de longitud completa o con un Hsp47 mutante que carece de la secuencia de retención de RE C-terminal RDEL. Las células se expusieron a las células CIK y se realizó un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar (proporción E:T 20:1). Como se muestra en la Figura 10, aproximadamente 25% de las células EC control se lisaron, aproximadamente 20% de las EC que expresan Hsp47 de longitud completa se lisaron, y virtualmente ninguna de las EC que expresan el Hsp47 mutante se lisaron. Este incremento en la protección surge del hecho de que la eliminación de RDEL dirige la producción de Hsp47 hacia la secreción. Ésta es la primera demostración de que las EC que de otra forma son universalmente sensibles pueden hacerse resistentes a la lisis por células asesinas no restringidas por MHC mediante la expresión de un transgén.

Ejemplo 11: Un Péptido Consenso HLA-A Protege a EC de la Lisis Mediada por CIK de una Manera Dosis Respuesta y Equivalentemente a Hsp47

Hsp47 tiene alguna homología con HLA-A2 lo que sugiere que un péptido consenso podría proteger a EC de la lisis mediada por CIK. Se generó un péptido (AVLSAEQRL) que tiene la secuencia de una región de Hsp47 que es homóloga a una parte de HLA-A2. Se expusieron las EC a células CIK en presencia del péptido consenso o de un péptido control irrelevante y se realizó un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar (proporción E:T 20:1). El péptido consenso protegió a EC de una manera dependiente de la dosis.

Otras realizaciones

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de ésta, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para preparar una composición de células inmunes para el tratamiento de cáncer vascularizado, que comprende células inmunes que reconocen Hsp47 o un péptido con la secuencia AVLSAEQRL como una señal de no matar y de esta manera tienen la capacidad de dañar selectivamente la vasculatura tumoral y no la vasculatura normal con
 - a. la etapa de expandir *ex vivo* la composición de células inmunes generada a partir de una muestra de células hematopoyéticas en un sistema de cultivo cerrado que comprende IL2, OKT3 e interferón gamma;
 - b. la etapa de evaluar la selectividad de las células expandidas respecto a la actividad lítica frente a la vasculatura tumoral comparada con la actividad lítica frente a la vasculatura normal
 - 10 c. la etapa de ajustar la selectividad de la composición.
- 2.** Una composición de células inmunes para el tratamiento de cáncer vascularizado que comprende células CIK que reconocen Wsp47 o un péptido con la secuencia AVLSAEQRL como una señal de no matar y de esta manera tiene la capacidad de dañar selectivamente la vasculatura tumoral y no la vasculatura normal en la que la actividad lítica de la composición se ajusta de manera que al menos 50% de las células expandidas *ex vivo* matan selectivamente a las células endoteliales vasculares asociadas con el tumor comparado con las células endoteliales vasculares asociadas con los tejidos normales.
- 3.** Una composición de células inmunes producida por el método de la reivindicación 2 en la que las células expandidas *ex vivo* comprenden células que expresan tanto CD3 como CD56.
- 20 **4.** Una composición de células inmunes producida por el método de la reivindicación 2 en la que las células expandidas *ex vivo* comprenden células que matan a las células tumorales.
- 5.** Una composición de células inmunes producida por el método de la reivindicación 2 que comprende además un compuesto quimioterapéutico.
- 6.** Una composición de células inmunes producida por el método de la reivindicación 2 que comprende además un agente que une las células expandidas *ex vivo* con un compuesto seleccionado.
- 25 **7.** La composición de células inmunes de la reivindicación 6 en la que el agente es un anticuerpo biespecífico.
- 8.** La composición de células inmunes de la reivindicación 6 en la que el agente comprende al menos dos anticuerpos unidos covalentemente.
- 9.** La composición de células inmunes de la reivindicación 6 en la que el agente comprende un anticuerpo que se une a las células expandidas *ex vivo*.
- 30 **10.** La composición de células inmunes de la reivindicación 9 en la que el compuesto seleccionado está unido covalentemente al anticuerpo.
- 11.** La composición de células inmunes de la reivindicación 9 en la que el compuesto seleccionado está unido no covalentemente al anticuerpo.
- 35 **12.** La composición de células inmunes de la reivindicación 6 en la que el compuesto seleccionado se selecciona del grupo que consiste en una toxina, un anticuerpo, una molécula marcada de manera detectable, un inmunomodulador y un compuesto radiactivo.
- 13.** Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer que estimula la neoangiogénesis, en la que las células expandidas *ex vivo* son autólogas para el paciente.
- 40 **14.** El uso de la reivindicación 13 en el que el tumor es un tumor sólido.
- 15.** El uso de la reivindicación 13 en el que las células *ex vivo* son capaces de replicarse en cultivo.
- 16.** El uso de la reivindicación 13 en el que la composición se administra sin la coadministración de una citoquina.
- 45 **17.** El uso de la reivindicación 13 en el que la composición no se administra en los cinco días posteriores a la administración de una citoquina.
- 18.** El uso de la reivindicación 13 en el que al menos 10^5 de las células expandidas *ex vivo* se administran en un día dado.

19. El uso de la reivindicación 13 en el que la composición se administra al menos dos veces en 7 días.
20. El uso de la reivindicación 13 en el que la composición se administra al menos dos veces en 30 días.
21. El uso de la reivindicación 13 en el que el paciente padece un cáncer seleccionado de un cáncer en estadio 1, cáncer en estadio 2, cáncer en estadio 3 o cáncer en estadio 4.
- 5 22. El uso de la reivindicación 13 en el que el paciente padece un cáncer seleccionado de un cáncer de grado bajo, cáncer de grado intermedio y cáncer de grado alto.
23. El método de la reivindicación 1 en el que las células se crecen en un contenedor de membrana.
24. El método de la reivindicación 1 para la expansión *ex vivo* de células inmunes con un receptor Hsp47 que comprende cultivar las células en un biorreactor con un sistema cerrado.
- 10 25. El uso de la reivindicación 13 en el que el tratamiento comprende tratamiento en consulta externa.
26. El uso de la reivindicación 13 en el que el paciente es un superviviente de cáncer.
27. El uso de la reivindicación 13 en el que el paciente está sano.
28. El uso de la reivindicación 13 en el que el paciente presenta un riesgo incrementado de padecer cáncer.
- 15 29. Un uso de una composición con una actividad lítica selectiva definida de cualquiera de las reivindicaciones 2-12 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un cáncer vascularizado en el que las células expandidas *ex vivo* son alogénicas para el paciente.
30. El uso de la reivindicación 29 en el que las células se han inmortalizado.
31. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-12 en la que las células expandidas *ex vivo* contienen un transgén estable que comprende un gen suicida regulable.

20

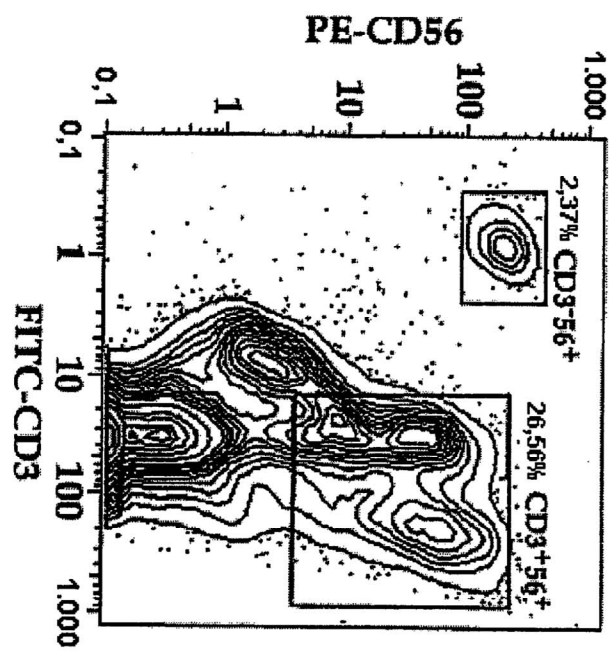
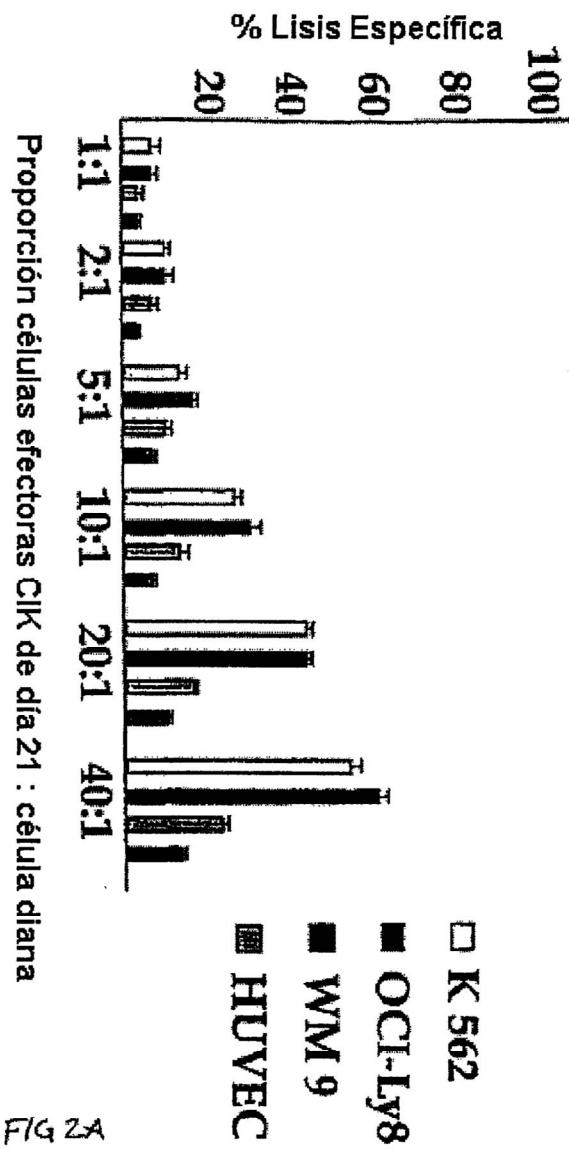


Fig. 1



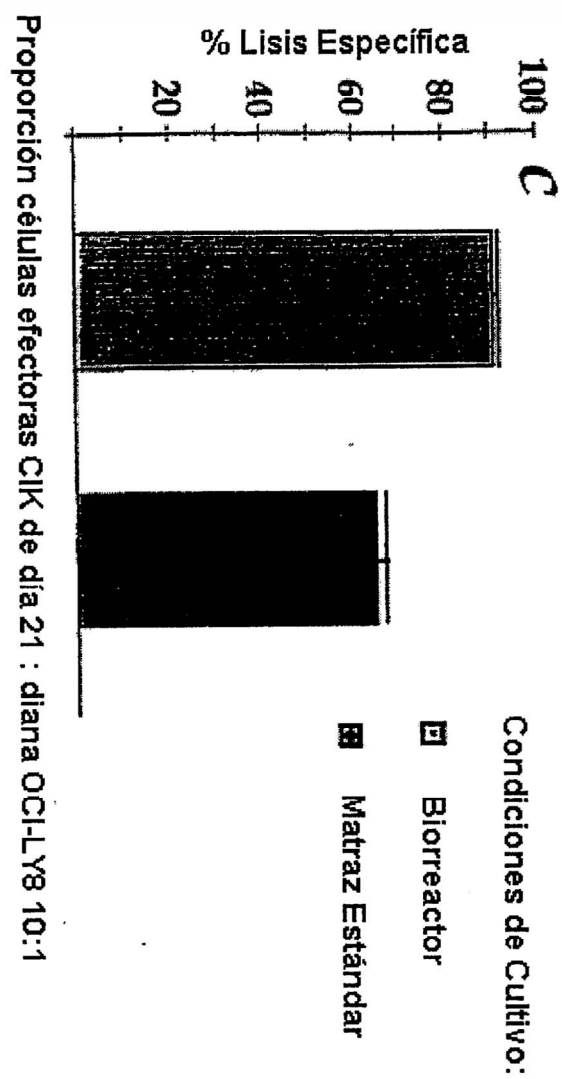


Fig 2B

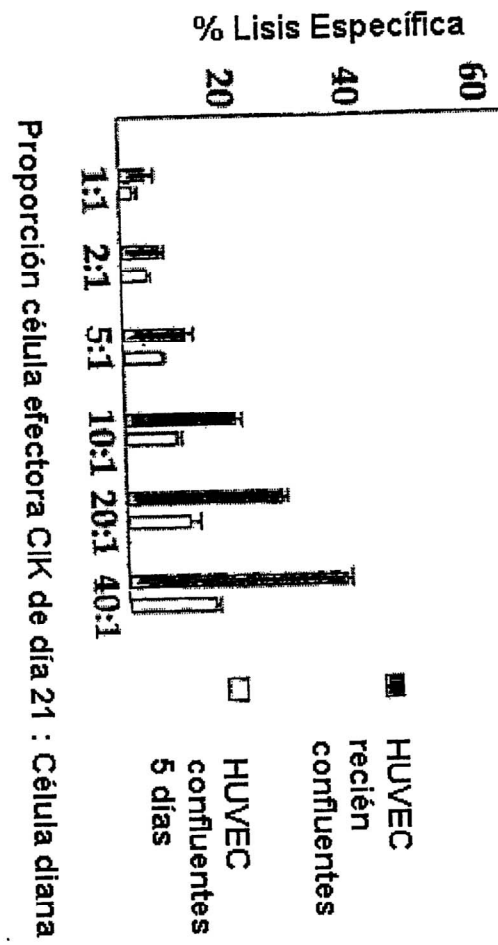
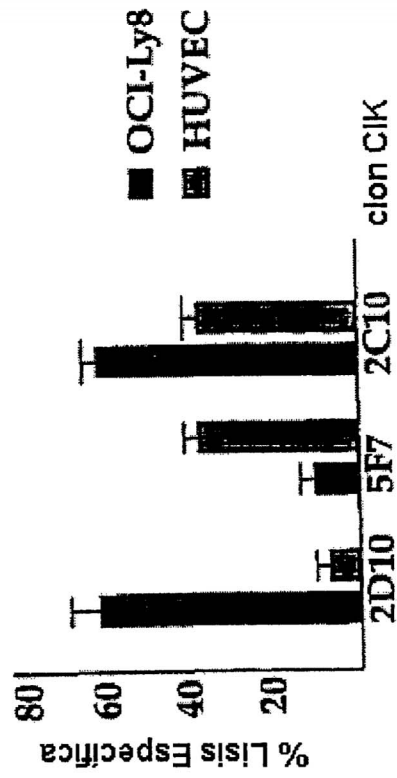


FIG. 2C



FIG. 3



Proporción célula efectora : célula diana de 2:1

FIG 5

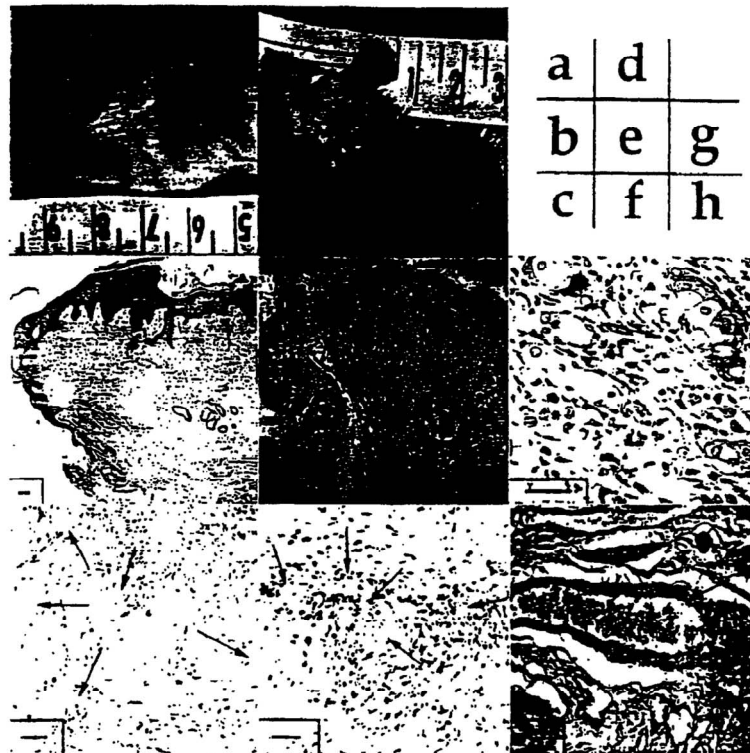


FIG. 6

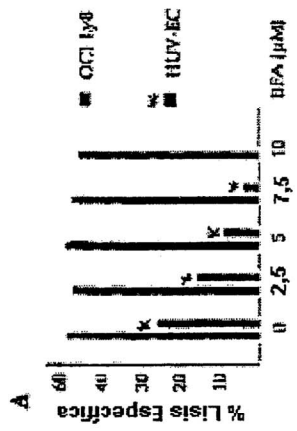
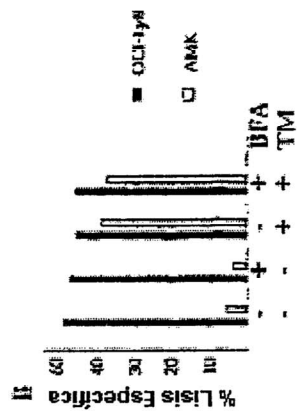


FIG 7

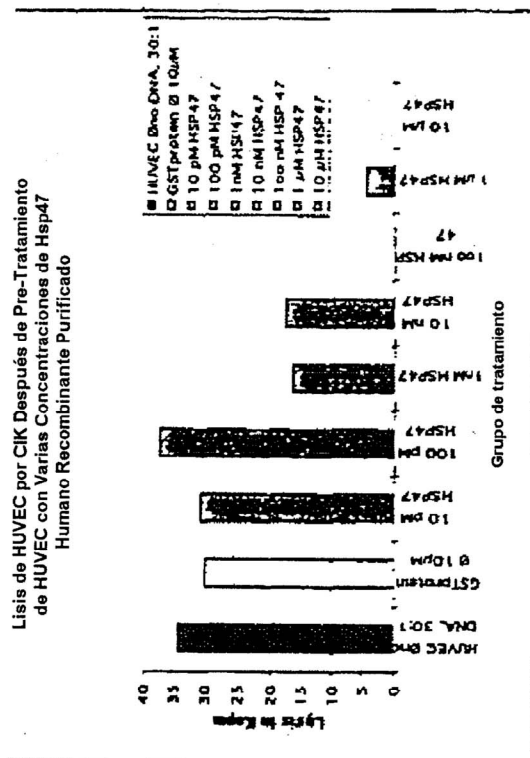


FIG. 8

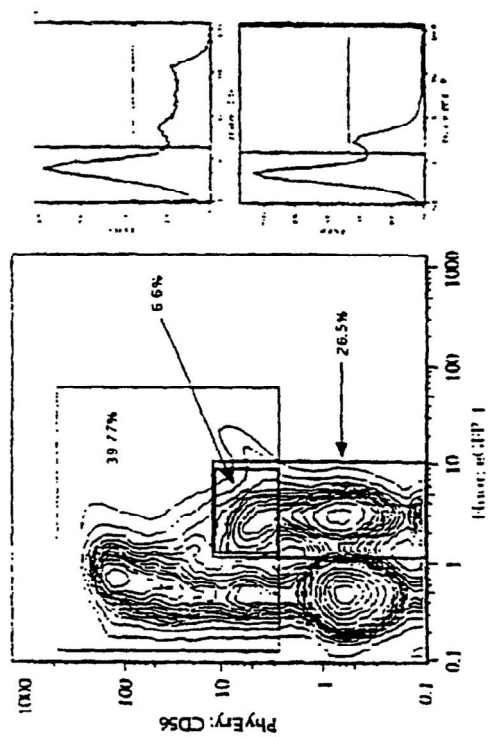


Fig. 9

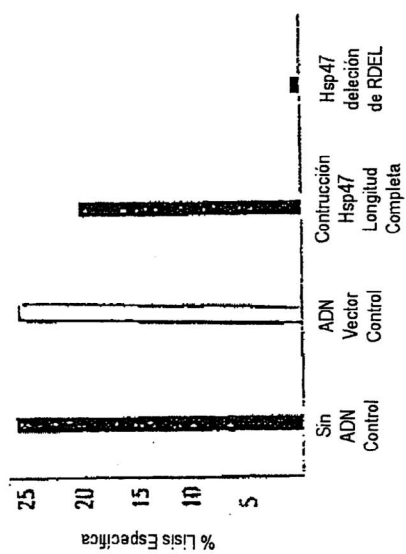


Fig 10