

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 918**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13175985 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2824112**

54 Título: **Método para inducir la proliferación de células asesinas naturales por nanomatrices móviles**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.05.2017**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**MÜLLER, SABINE;  
SCHEFFOLD, ALEXANDER;  
OERDING, KATHARINA y  
HUPPERT, VOLKER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 612 918 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para inducir la proliferación de células asesinas naturales por nanomatrices móviles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología, en particular a procesos para inducir la proliferación de células asesinas naturales por nanomatrices.

Antecedentes de la invención

10 Las células asesinas naturales (NK) son una parte importante del sistema inmune innato y están implicadas en procesos contra enfermedades, tales como el cáncer. Las células NK están fenotípicamente definidas por la expresión de CD56 y la ausencia de CD3 y de moléculas receptoras de las células T. Las células NK pueden destruir células diana sin necesidad de sensibilización previa, un efecto que se regula por el equilibrio de las señales estimuladoras e inhibitorias. Es importante destacar que las células NK, a diferencia de las células T, no inducen la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) en pacientes después del trasplante alogénico clínico. Estas características hacen a las células NK candidatas altamente prometedoras para aplicaciones clínicas para combatir el cáncer a través de la inmunoterapia adoptiva.

15 El documento WO2004/056392 describe que los anticuerpos antirreceptores de células NK solubles tales como NKp30 y NKp46 pueden inducir una ligera proliferación de células NK a partir de PBMC humanas frescas.

El documento US 5919700 describe un método para inducir la proliferación de células NK suplementando medios de cultivo celular con IL-16. Pero la proliferación inducida por IL-16 da como resultado un enriquecimiento de solo aproximadamente cinco veces de células asesinas naturales.

20 El documento US2003/0068306 A1 describe un método para la expansión de células NK a partir de células mononucleares de sangre periférica usando una combinación de un medio de cultivo celular especial y citoquina IL-2 y anticuerpo OKT-3. Este método se basa en células T alimentadoras autólogas que son activadas por IL-2 y el anticuerpo anti-CD3 OKT-3 y segregan así factores solubles al medio de cultivo celular lo que induce la proliferación en células NK.

25 El documento US2004/0115198 A1 describe un método para expandir células efectoras que incluyen células NK por entrecruzamiento del receptor NKG2D con un anticuerpo monoclonal.

El documento US2004/0197903 A1 describe un método para inducir la proliferación de células NK mediante cocultivo con células dendríticas tratadas con cultivos celulares. Se logra una expansión de 10 veces de células NK mediante IL-12, TNF-alfa y GM-CSF secretadas por las células dendríticas.

30 La producción a gran escala de células NK de grado clínico mediante la activación a largo plazo en cultivos ex vivo es un medio para conseguir el objetivo de mejorar los diseños de ensayos clínicos aumentando la relación de células efectoras a dianas in vivo y mediante la aplicación de efectores NK citotóxicos superiores. Hasta ahora, para las células NK, el cocultivo con líneas celulares y/o células alimentadoras es parte de la mayoría de los protocolos de proliferación (Suck and Koh, 2012, Hematol Oncol Stem Cell Ther 3: 135-142, Cho and Campana, 2009, Korean J Lab Med, 29: 89 - 96, EP 1306427A1, US8026097).

35 Los dendrímeros encapsulados con fosfonato nanométrico mostraron un ligero aumento en el número de PBMC y la fenotipificación de las células multiplicadas en cultivos con el dendrímero 3a-G1 reveló la prominencia de las células NK. Después de cuatro semanas en cultivo, se consiguió una multiplicación media del número de células NK por un factor de 105 en medio suplementado con IL-2 y 3a-GI, frente a una multiplicación media sólo por un factor de 7,5 en un medio suplementado solo con IL-2 (Griffe et al., 2007, Angew. Chem, 119: 2575 - 2578).

Aunque el uso de superficies de fase sólida tales como perlas magnéticas de tamaño de micras son más prominentes para la estimulación y la expansión de células T, hay algunas divulgaciones acerca de la estimulación de células NK y también de la expansión.

45 Bryceson y col. (2006, Blood, 107: 159-166) mostraron que las respuestas por las células NK en reposo, en ausencia de citoquinas exógenas, pueden ser inducidas por combinaciones de receptores activadores. Las respuestas medidas fueron flujo de Ca<sup>2+</sup> desencadenado por mAbs entrecruzado en solución, y secreción de TNF-α e IFN-γ inducida por mAbs unidos a la superficie de la fase sólida y perlas de tamaño celular (Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Noruega) y citotoxicidad frente a una célula diana FcR + en presencia de mAbs dirigidos a receptores de activación de células NK. Se encontró que la combinación de NKp46 (CD335) y CD2 era suficiente para activar las células NK en dirección a la

liberación de citoquinas y la citotoxicidad.

El kit de activación/expansión de células NK de Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, Pedido nº 130-094-483) está diseñado para activar y expandir células NK humanas. El kit se compone de la superficie de fase sólida y las partículas antibiotina MACSiBead de tamaño celular (3,5 µm de tamaño) y anticuerpos biotinilados contra CD335 y CD2 humanas. Se utilizan partículas de antibiotina MACSiBead cargadas con anticuerpos biotinilados para activar y expandir células NK en reposo purificadas a partir de sangre o PBMCs humanos.

Contrariamente a las células NK, los anticuerpos contra CD3 son un elemento central en muchos protocolos de proliferación de células T policlonales. Inmovilizado en una superficie, el anti-CD3 genera una señal de activación y de inducción de la proliferación mediante entrecruzamiento del complejo receptor de células T en la superficie de células T. Al inmovilizar anti-CD3 y anti-CD28 para suministrar simultáneamente una señal y una señal coestimuladora, puede aumentarse la proliferación (Baroja y colaboradores (1989), Cellular Immunology, 120: 205-217). En WO09429436A1 se utilizan superficies de fase sólida, tales como placas de cultivo y perlas para inmovilizar los anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3. Regularmente, la inmovilización en perlas se realiza sobre DynaBeads®M-450 que tienen un tamaño de 4,5 µm de diámetro, aunque la US2012/0121649 describe un método de estimulación y expansión de células T antitumorogénicas específicas de antígeno que comprende administrar a un sujeto o in vitro un complejo antígeno/MHC coestimulador de nanopartículas que tiene un tamaño de aproximadamente 1 a 100 nm, en una cantidad suficiente para estimular la expansión de una célula T antitumorogénica específica del antígeno.

En la solicitud copendiente No. EP12185939.1 se divulga que los agentes estimulantes de células T policlonales tales como anticuerpos, e.g. contra CD3 y CD28, unidos a nanomatrices, que se caracterizan por una superficie no sólida, pueden ser utilizados para estimular células T ingenuas y con memoria in vitro, aunque su diámetro sea menor de 1 µm, preferiblemente menor de 500 nm, más preferiblemente menor que 200 nm. Contrariamente a lo anterior, se encontró que las perlas con superficies sólidas del mismo tamaño que las nanomatrices usadas en ellas no son capaces de estimular las células T en absoluto o a un nivel similar al de las nanomatrices lo cual está en concordancia con la opinión bien establecida del experto en la técnica. Debido a su pequeño tamaño, las nanomatrices *per se*, sin anticuerpos unidos a ellas, no alteran la estructura, la función, el estado de actividad o la viabilidad de las células, es decir, no causan perturbación en las células y no interfieren en los posteriores análisis, experimentos y aplicaciones terapéuticas de las células estimuladas. Además, preferiblemente, la nanomatriz es biodegradable y no tóxica para las células vivas, es decir, la nanomatriz es una entidad biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Por lo tanto la nanomatriz utilizada en el método de EP12185939.1 mejora la estimulación in vitro de células T conservando la viabilidad de las células.

Además sorprendentemente, se encontró que los agentes estimulantes de células T policlonales tales como anticuerpos, e.g. contra CD3 y CD28, unidos a nanomatrices pueden conjugarse a nanomatrices separadas (en lugar de conjugarse con la misma nanomatriz), que pueden mezclarse a continuación para un uso optimizado. En general, la relación de nanomatrices a células es mayor que 100:1, preferiblemente mayor que 500:1, más preferiblemente mayor que 1000:1. Esto da como resultado la posibilidad de ajuste fino de las nanomatrices usadas para la estimulación de las células T diana, e.g. facilita el proceso de producción y el control de calidad de las nanomatrices individuales y mejora la flexibilidad del reactivo, e.g. facilitando la optimización de las condiciones de activación para subconjuntos de células T especializadas por titulación de diversas concentraciones y relaciones CD3 y CD28.

Independientemente de EP12185939.1, era una opinión bien establecida en la comunidad científica que las partículas menores de 1 µm no eran convenientes para estimular las células T eficazmente debido a que tales partículas pequeñas no proporcionan suficiente entrecruzamiento para activar células T (véase, por ejemplo, US8,012,750B2). Generalmente se cree que el requisito de partículas de tamaño celular es un requisito previo para lograr la activación de otros tipos celulares tales como células NK y no hay indicación en el estado de la técnica de que estos requisitos sean diferentes. Especialmente las células T y las células NK son similares en sus moléculas de señalización y sus mecanismos efectores tales como la citotoxicidad mediada por Perforin/Granzyme y Fas/FasL, así como la inducción de la liberación de citoquinas.

Por ejemplo, la publicación de Erin R Steenblock y Tarek M Fahmy (Molecular Therapy vol. 16 no. 4, 765-772 April 2008) utiliza nanopartículas de superficie sólida (130 nm) y muestra que estas nanopartículas estimulan células T más débiles que las micropartículas (8 µm). Los autores afirmaron que estos hallazgos están respaldados por los informes anteriores (Mescher, MF (1992) J Immunol 149: 2402-2405), demostrando que las partículas de tamaño micrométrico, que son de tamaño cercano a las células T, proporcionan estimulación óptima de células T. El estudio de Mescher demostró la importancia crítica de una superficie de contacto superficial grande y continua para una activación eficaz de CTL. Utilizando aloantígeno de clase I inmovilizado sobre microesferas de látex, se encontró que los tamaños de partícula de 4 a 5 micrómetros proporcionan un estímulo óptimo. Por debajo de 4 micras, las respuestas disminuyeron rápidamente con la disminución del tamaño de partícula, y un gran número de partículas pequeñas no pudo compensar el tamaño subóptimo.

Elodie Macho Fernandez et al (2011, International Journal of Pharmaceutics, vol. 423, n° 1, páginas 45-54) describen el uso de nanopartículas basadas en PLGA (PLGA es un polímero amorfo) que comprende KRN7000, que es un activador

de células iNKT (que no son células NK) para activar la proliferación de células iNKT in vitro e in vivo. La activación es indirecta ya que el KRN encapsulado en PLGA puede ser tomado y presentado por el APC esplénico y hepático para activar in vitro, de una manera dependiente de CDLd, las células iNKT.

5 El documento WO2009/094273A2 describe la construcción de aAPCs poliméricas con el propósito de estimular/expandir células T. Las partículas portan uno o múltiples elementos funcionales en su superficie para la activación y expansión de células T. Las partículas pueden ser micropartículas o nanopartículas, pero se indica que las aAPCs de micropartículas son más eficientes que las aAPC en nanopartículas en la estimulación de la activación de células T. Entre las células T para estimular con la aAPC están las células NKT pero no las células NK. Las únicas partículas utilizadas en WO2009094273A2 consisten en el polímero amorfo PLGA.

10 Reim y colaboradores (2009, Cancer Research, vol. 69, nº 20, páginas 8058-8066) describen el aislamiento de células NK y su expansión usando el Kit de Activación/Expansión de Células NK de Miltenyi Biotec mencionado anteriormente que utiliza partículas de 3,5 µm de tamaño.

15 Tomados juntos, hasta ahora, para las células NK el cocultivo con líneas celulares y/o células alimentadoras es parte de la mayoría de los protocolos de proliferación, que albergan el riesgo de contaminar las células. Además, los compuestos celulares son complejos y no son fáciles de definir exactamente y, por tanto, pueden tener una influencia impredecible sobre el sistema de cultivo in vitro en comparación con sistemas de estimulación artificial exactamente definidos. Las perlas o microesferas utilizadas en el estado de la técnica para la activación de células NK a través de anticuerpos estimuladores de células NK inmovilizados se usan raramente. En los pocos ejemplos existentes, las partículas consisten en una partícula de tamaño de célula esférica sólida con ligandos activadores unidos a la superficie. Las perlas de este tamaño tienen varias desventajas con respecto a su potencial para interactuar con células NK, así como su producción, manipulación y seguridad en procedimientos clínicos de terapias con células NK.

1. Debido a la superficie sólida de la perla, el tamaño del área de interacción entre la perla y la célula es limitado.

25 2. Su preparación es compleja y costosa en comparación con anticuerpos solubles y es especialmente inconveniente generarlas en calidad cGMP, por ejemplo debido a su tamaño, no es posible una filtración estéril, la sedimentación complica la manipulación, es decir, el número/volumen constante de partículas durante el llenado y la carga de anticuerpos.

3. Son inconvenientes de usar para procesos in vitro para generar terapias de células NK para uso in vivo,

- puesto que tienen que ser añadidas a células en relaciones de célula/perla definidas a una densidad definida de células/perlas por área de superficie,

30 - la titulación es imprecisa debido a la sedimentación,

- la filtración estéril no es posible

35 - debido a su tamaño pueden afectar a la viabilidad la función celular y no pueden ser simplemente retiradas de las células por centrifugación. Por lo tanto, se han desarrollado protocolos especiales para la separación de gránulos o partículas biodegradables. Sin embargo, ambos métodos sufren imprecisiones con respecto al número real de perlas residuales después del proceso de eliminación, dejando un cierto riesgo de efectos tóxicos si se inyectan perlas estimuladoras de células NK en pacientes. Este problema es particularmente relevante debido al tamaño de las partículas, puesto que cada sola partícula por sí misma puede haber retenido todavía la capacidad para activar células NK in vivo.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método in vitro mejorado para inducir la proliferación de células NK.

40 Sumario de la invención

45 Sorprendentemente, se encontró que los agentes estimuladores de las células NK tales como anticuerpos, e.g. frente a CD2 y CD335 (NKp46), unidos a nanomatrices, que se caracterizan por una estructura móvil de matriz polimérica (superficie no sólida), que pueden haber incluido dentro de la matriz compuestos funcionales adicionales, tales como nanocristales magnéticos, pueden usarse para inducir proliferación de células NK in vitro, aunque su diámetro sea menor de 1 µm, preferiblemente menor de 500 nm, más preferiblemente menor de 200 nm. Preferiblemente, las nanomatrices de la invención inducen a las células NK a proliferar in vitro al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, lo más preferiblemente al menos 200 veces.

Inesperadamente, estas nanomatrices acopladas con agentes estimuladores de células NK pueden expandir células NK a una escala similar in vitro, ya que las perlas de tamaño de célula del estado de la técnica también se acoplan a

agentes estimuladores de células NK tales como, por ejemplo las perlas del Kit de Activación/Expansión de Células NK de Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, Pedido nº 130-094-483).

Debido a su pequeño tamaño, las nanomatrices per se, sin anticuerpos unidos a ellas, no alteran la estructura, la función, el estado de actividad o la viabilidad de las células, es decir, no causan perturbación en las células y no interfieren con análisis, experimentos y aplicaciones terapéuticas posteriores de las células estimuladas. Además, preferiblemente, la nanomatriz es biodegradable y no tóxica para las células vivas, es decir, la nanomatriz es una entidad biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Por lo tanto, la nanomatriz usada en el método de la presente invención mejora la expansión in vitro de células NK ahorrando la viabilidad de las células. Además, como es posible la filtración estéril de las pequeñas nanomatrices, es posible la expansión in vitro a largo plazo de células NK en condiciones que cumplan con rigurosas normas GMP y es una valiosa opción para la aplicación clínica de las células NK expandidas in vitro. Estas nanomatrices son adecuadas para su uso en sistemas de cultivo de células cerrados y estériles tales como los descritos e.g. En WO2009/072003.

Además sorprendentemente, se encontró que los agentes estimuladores de células NK tales como anticuerpos, e.g. contra CD2 y CD335, unidos a nanomatrices pueden conjugarse a nanomatrices separadas (en lugar de conjugarse con la misma nanomatriz), que pueden mezclarse a continuación para uso optimizado. En general, la relación de nanomatrices a células es mayor que 100:1, preferiblemente mayor que 200:1, más preferiblemente mayor que 500:1. Esto da como resultado la posibilidad de ajuste fino (titulación) de las nanomatrices usadas para inducir la proliferación de las células NK diana, por ejemplo facilitando el proceso de producción y el control de calidad de las nanomatrices individuales y mejora la flexibilidad del reactivo, por ejemplo facilitando la optimización de las condiciones de activación para subconjuntos de células NK especializadas mediante titulación, por ejemplo a diversas concentraciones y relaciones de CD2 y CD335.

Las células NK son "educadas" o "licenciadas" durante su desarrollo por contacto de las moléculas del receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR) en su superficie con moléculas de Clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en células vecinas. Las combinaciones de moléculas KIR se distribuyen por clonación en células NK individuales, dando como resultado un nivel heterogéneo y continuo de requisitos de señalización. Diferentes subconjuntos continuos (en contraste con los claramente distinguibles) pueden ser inducidos a la proliferación por titulación de las nanomatrices. Además, los subconjuntos de células NK se definen basándose en una expresión de marcador distinguible (por ejemplo CD16, CD62L, CD2, CD159a, CD27) que tienen diferentes requisitos de señalización para la activación.

En comparación con ello, se usan las perlas de Kit de Activación/Expansión de Células NK de (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, Pedido nº 130-094-483) en una proporción perla:célula de 1:2 a 2:1 resultando en una menor flexibilidad para el ajuste fino.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una nanomatriz para inducir la proliferación in vitro de células NK, comprendiendo la nanomatriz

a) una matriz de cadenas poliméricas móviles, y

b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células NK;

en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para inducir la proliferación de células NK in vitro, comprendiendo el método poner en contacto una población de células NK con una nanomatriz, en el que la nanomatriz comprende una matriz de cadenas poliméricas móviles y se ha unido a ella uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células NK; activando e induciendo así las células NK para que proliferen, es decir, para expandirse; y en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato. Preferiblemente, la nanomatriz es biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Además, preferiblemente, la nanomatriz es biodegradable.

Las células NK estimuladas y opcionalmente expandidas logradas con el método de la presente invención pueden usarse en aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas subsiguientes sin la necesidad de eliminar o retirar la nanomatriz debido a la propiedad de la nanomatriz de ser biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular

Alternativamente, debido a que son solubles o coloidales las nanomatrices pueden diluirse fácilmente mediante etapas

de lavado repetidas hasta concentraciones eficaces por debajo del umbral de activación de las células NK después del proceso de estimulación y proliferación de células NK.

La nanomatriz es de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm de tamaño. La nanomatriz es una matriz móvil que consiste en un material polimérico pero no tiene una superficie de fase sólida en contraste con perlas o microesferas. Los agentes tales como anticuerpos anti-CD2 y/o anti-CD335 que permiten la estimulación de células NK se unen a las cadenas poliméricas móviles de la matriz. Dentro de la matriz pueden incrustarse sustancias adicionales, tales como nanocristales magnéticos, pigmentos fluorescentes, etc., y añadir funciones adicionales a la nanomatriz sin alterar su estructura móvil básica, características superficiales o parámetros de interacción celular de la nanomatriz.

Esta movilidad, es decir, la flexibilidad de las matrices poliméricas en soluciones acuosas, incluso cuando están unidas a superficies sólidas, son bien conocidas en el campo. Por ejemplo, una estimación cuantitativa de la flexibilidad o movilidad del dextrano y otros polímeros usados para aplicaciones biológicas o médicas se da en Bertholon et al. Langmuir 2006, pp 45485 - 5490.

La movilidad introducida en la matriz de estimulación por el polímero usado está bien descrita en múltiples publicaciones para polisacáridos y nanocristales superparamagnéticos embebidos, que se utilizan frecuentemente para tecnologías de formación de imágenes in vivo en situaciones clínicas. Estos reactivos son muy similares al tipo de reactivo que se usó aquí en varios de los ejemplos dados. Es bien sabido que a pesar del término "partícula" estos reactivos no son en realidad comparables a las partículas de superficie sólida esféricas: "La mayoría de las nanopartículas coloidales (así denominadas) usadas con fines médicos están recubiertas con polímeros o polielectrolitos y no pueden ser consideradas realmente como esferas rígidas (Di Marco y colaboradores, Int. J. Nanomed., 2007, p618, línea 5 y siguientes)".

Para ejemplificar directamente: esta característica típica de los nanocristales superparamagnéticos incrustados en polisacáridos se describe mejor por la discrepancia en los valores de tamaño obtenidos por diferentes métodos utilizados para la determinación del tamaño. Normalmente, la microscopía electrónica de transmisión utiliza muestras secas y, por tanto, determina principalmente el tamaño de los nanocristales embebidos, que están siempre en el intervalo de 10 nm. Sin embargo, en contraste, la dispersión láser dinámica que también toma en consideración el tamaño de la matriz circundante en solución acuosa, determina diámetros mucho más grandes (por ejemplo 5-10 nm frente a 80-150 nm para AMI-25, un reactivo de contraste clínico, consistente en una matriz de dextrano y los cristales de óxido de hierro incrustados, lo que significa que el >99% del volumen total del complejo en solución acuosa está constituido por la matriz móvil (Wang y colaboradores, Eur. Radiol. 2001: página 2323). Para las matrices que se usaron por ejemplo, en el Ejemplo 1, la medida del tamaño reveló 30 nm (TEM) y 65 nm (DLS), de modo que aproximadamente 80-90% del complejo en solución acuosa está constituido por la matriz móvil. Por lo tanto en este tipo de matrices móviles, el polímero móvil determina el comportamiento biofísico durante la interacción con las células, en lugar de una partícula rígida o superficie sólida cubierta, que podría además recubrirse con una delgada capa de polímero utilizada para la unión, de modo que la flexibilidad o movilidad bien conocida de las cadenas de polímero en la matriz descrita sea la característica determinante y la diferencia crítica con respecto a los anticuerpos unidos a superficie sólida sobre microesferas usadas clásicamente para estimulación.

En resumen, estos ejemplos indican el conocimiento común actual sobre el comportamiento de matrices de polímero flexibles móviles en solución acuosa (requisito previo para todas las aplicaciones de cultivos celulares) y ponen de relieve el hecho de que también las propiedades biofísicas de los coloides revestidos con polímero, las matrices de polisacáridos que contienen óxido de hierro usadas en este estudio pero no limitadas a aquellas, están determinadas principalmente por la característica del material polimérico, independiente de las sustancias embebidas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vitro para inducir la proliferación de células NK, comprendiendo el método poner en contacto una población de células NK con una nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz

a) una matriz de cadenas poliméricas móviles; y

b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes estimuladores que proporcionan señales de activación a las células NK; activando e induciendo así la proliferación de las células NK, en las que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, y en la que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, y en donde la mayoría (es decir, más del 50%), preferiblemente más del 80% y más preferiblemente más del 90% y más preferiblemente más del 99% del volumen total de la nanomatriz en solución acuosa consiste en cadenas poliméricas móviles.

Si se incrustan en la matriz sustancias adicionales, tales como nanocristales magnéticos, pigmentos fluorescentes, etc., el complejo resultante consta principalmente de cadenas poliméricas móviles, que representan más del 50%, preferiblemente más del 80% y más preferiblemente más de 90% y más preferiblemente más del 99% del volumen en

solución acuosa.

#### Descripción detallada de la invención

5 Era una opinión bien establecida en la comunidad científica el que las partículas menores de 1  $\mu\text{m}$  no son convenientes para estimular eficazmente las células, en particular las células T, sino también otras células, tales como las células NK, porque estas pequeñas partículas no proporcionan suficiente entrecruzamiento para activar las células. Por lo tanto, generalmente, las perlas o microesferas con superficies en fase sólida usadas para estimular células, en su mayoría células T, son siempre mayores de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño en el estado de la técnica, y regularmente son de tamaño celular.

10 Ahora, de forma inesperada, los inventores descubrieron que las nanopartículas que son menores de 1  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menores de 500 nm, más preferiblemente menores de 200 nm, que tienen una matriz móvil y que están unidas a ellas, son convenientes para expandir las células NK. Es esencial para la presente invención que la nanomatriz que es menor de 500 nm no tenga superficie de fase sólida en contraste con perlas o microesferas del mismo tamaño. La nanomatriz es como una malla o red que consiste en un material polimérico móvil, preferiblemente dextrano. La nanomatriz es muy plástica, dando como resultado la capacidad de arrollarse a la membrana de la superficie celular de las células diana, es decir, las células NK que se activarán. Por lo tanto, la nanomatriz se une con sus agentes unidos a la matriz móvil a los respectivos receptores (antígenos) en la superficie celular, por lo que la movilidad o flexibilidad de la matriz permite una interacción óptima con los asociados de unión. Hasta cierto punto, la forma de la nanomatriz se adapta a la superficie de la célula diana extendiendo de este modo la superficie de contacto entre la nanomatriz y la célula diana. Debido al tamaño de la nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, son demasiado pequeñas para causar perturbación en la célula, es decir, la nanomatriz es biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Tales perturbaciones desencadenadas por el contacto directo entre células y gránulos son problemáticas si se utilizan perlas o microesferas de 1  $\mu\text{m}$  o más. Además, preferiblemente, la nanomatriz es biodegradable y no tóxica para las células debido a la composición que consiste en material polimérico biodegradable tal como un polímero de dextrano. En consecuencia, la nanomatriz es una entidad por completo biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular, pero biodegradable. Por lo tanto, no es necesario eliminar la nanomatriz después de ponerse en contacto con las células NK para estimulación y proliferación. No se producen efectos perturbadores debido a la presencia de nanomatrices en composiciones de células NK activadas para análisis, experimentos y/o aplicaciones clínicas subsiguientes de estas células.

25 Además, debido a que son solubles o coloidales, las nanomatrices no unidas se pueden diluir fácilmente mediante etapas de lavado repetidas a concentraciones eficaces por debajo del umbral de activación de las células NK después del proceso de expansión de las células NK.

30 La matriz móvil de la nanomatriz tiene unida a ella uno o más agentes estimuladores que proporcionan señales de activación a las células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células NK. Los agentes son moléculas que son capaces de unirse a una estructura de superficie celular e inducir la estimulación de las células NK. Un ejemplo de agentes unidos a la matriz móvil de la nanomatriz es el anticuerpo monoclonal anti-CD2 (mAb) en combinación con un mAb anti-CD335. Otros ejemplos son anti-CD137, anti-CD 134, anti-CD16, anti-CD25, anti-CD52, anti-CD69, anti-CD84, anti-CD122, anti-CD244 (2B4), anti-CD314 (NKG2D) Anti-CD336, anti-CD337, anti-NKp80, ligandos Notch, por ejemplo Delta-like1/4, Jagged1/2 o receptores de citoquina ya sea solos o en diversas combinaciones con anti-CD2 o anti-CD335.

35 Preferiblemente, el agente estimulador unido a la nanomatriz es un anticuerpo monoclonal anti-CD2 (mAb) en combinación con la proteína coestimuladora anti-CD335 mAb. Los dos anticuerpos pueden acoplarse a la misma nanomatriz o separar nanomatrices.

40 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir la proliferación de células NK, comprendiendo el método poner en contacto una población de células NK con una nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz

45 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles, y

b) unido a dicha matriz de cadenas poliméricas uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células NK; activando e induciendo así la proliferación de las células NK;

50 y en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato.

La nanomatriz puede ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular.

Además, o alternativamente, la nanomatriz puede ser biodegradable.

La nanomatriz puede ser de calidad cGMP para aplicaciones clínicas. La esterilidad puede conseguirse, por ejemplo por filtración estéril usando filtros con un tamaño de poro adecuado (200 nm) o por otros métodos bien conocidos por el experto en la técnica. El procesamiento GMP de productos celulares se realiza frecuentemente en sistemas de cultivo de células cerrados. El uso de la nanomatriz en sistemas de cultivo GMP es ventajoso debido a:

- 5 - características de la nanomatriz para pasar un filtro estéril
- una baja densidad de partículas o un comportamiento coloidal que evita una sedimentación más rápida de la matriz en comparación con las células NK
- dosificación de la nanomatriz en relación con el volumen del cultivo en lugar del número de células NK.

10 La característica de la nanomatriz de ser capaz de pasar filtros estériles permite la adición a sistemas de cultivo de células cerradas que están equipadas o son equipables con filtros estériles, por ejemplo bolsas para cultivo celular (Miltenyi Biotec, Baxter, Cell-Genics), dispositivos G-Rex (fabricación de Wilson Wolf), WAVE Bioreactors (GE Healthcare), Quantum Cell Expansion System (Terumo BCT), CliniMACS® Prodigy (Miltenyi Biotec, véase Apel y colaboradores. 2012, Chemie Ingenieur Technik 85: 103 - 110). La nanomatriz puede añadirse a sistemas de cultivo de células cerradas usando una jeringa para empujar la nanomatriz a través del filtro o una bomba para tirar de la nanomatriz a través del filtro de una bolsa o un vial (conectado a un adaptador de vial ventilado).

15 Otros agentes utilizados para inducir la proliferación de células NK (perlas magnéticas de tamaño celular, líneas celulares) no pueden pasar por un filtro estéril. El uso de estos reactivos requeriría conectar agentes al sistema de cultivo de células cerrado usando un soldador de tubos estéril (por ejemplo, Terumo, GE, Genesis). No todos los soldadores de tubos están diseñados para funcionar dentro de una sala limpia de GMP. De este modo, la adición de un agente al sistema de cultivo de células cerrado a través de filtros estériles proporciona una ventaja significativa.

20 Las partículas magnéticas de tamaño de células rígidas utilizadas para inducir la proliferación de células NK (kit de activación y expansión de células Miltenyi Biotec NK) tienen una densidad mayor como linfocitos incluyendo células NK (1,07 g/l) y por lo tanto sedimentan más rápidamente que la nanomatriz. Los sistemas de cultivo celular agitados tales como el WAVE Bioreactor (GE Healthcare) evitan la sedimentación completa de las células mediante el movimiento del recipiente utilizado para el cultivo. El movimiento del recipiente aplica fuerzas diferentes a las células/partículas de diferente tamaño y densidad, dando como resultado un movimiento relativo. La inducción de la proliferación se reduce dentro del biorreactor WAVE en comparación con el cultivo estático en matraces de cultivo celular.

25 El uso del kit de activación y expansión de células NK (Miltenyi Biotec) que utiliza partículas magnéticas rígidas de tamaño celular se ha optimizado para ser utilizado en una proporción dada de perlas por célula (por ejemplo 1:2), requiriendo la determinación del número de NK dentro del recipiente de cultivo. Para una aplicación clínica de células NK expandidas esto da como resultado un paso de muestreo adicional, posiblemente afectado por la esterilidad del producto. El uso de la nanomatriz de la presente invención permite la dosificación del agente inductor de proliferación de células NK con base en el volumen del cultivo. El volumen de la célula NK que contiene la suspensión de células puede determinarse mediante un sistema de balance o cámara sin afectar a la barrera de esterilidad. La dosificación del agente basándose en la determinación de volumen permite un proceso de fabricación de productos celulares completamente automatizado (por ejemplo, usando el sistema Clini-MACS Prodigy®) sin etapas de recuento manual de células.

30 El contacto puede ocurrir, por ejemplo in vitro en cualquier recipiente capaz de contener células, preferiblemente en un ambiente estéril. Tales recipientes pueden ser, por ejemplo frascos de cultivo, bolsas de cultivo, biorreactores o cualquier dispositivo que pueda usarse para cultivar células (por ejemplo, el sistema de procesamiento de muestras del documento WO2009072003).

35 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir la proliferación de células NK en un sistema de cultivo de células cerrado, comprendiendo el método poner en contacto un cultivo de células que comprende una población de células NK dentro de dicho sistema de cultivo de células cerrado con una dosificación de nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz

- a) una matriz de cadenas poliméricas móviles; y
- b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células NK;

40 en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato, y en el que dicha dosificación de nanomatriz se aplica estéril a dicho sistema de cultivo de células cerrado, y en el que dicha dosificación depende del volumen del

cultivo celular en dicho sistema de cultivo de células cerrado.

Dicho volumen del cultivo celular puede determinarse mediante una balanza o un sistema de cámara sin afectar a la barrera de esterilidad.

La determinación y aplicación de dicha dosificación se puede realizar de forma automática.

- 5 La nanomatriz utilizada en la presente invención puede ser una nanomatriz en la que al menos un primer agente y un segundo agente están unidos a la misma matriz móvil. Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células NK. La relación del primer y del segundo agente unidos a la misma matriz flexible puede estar en el intervalo de las proporciones de 100:1 a 1:100, preferiblemente entre 10:1 y 1:10, más preferiblemente entre 2:1 y 1:2.
- 10 Además sorprendentemente, se encontró que la nanomatriz usada en el presente método de la invención también puede ser una nanomatriz en la que al menos un primer agente y un segundo agente están unidos a matrices móviles separadas. Una mezcla de estas nanomatrices se pone en contacto con células NK, con lo que se activa e induce la proliferación de las células NK. La relación y/o concentración de la matriz móvil que tiene unido a la misma el primer agente y la matriz móvil que tiene unido a la misma, el segundo agente, puede variar para producir resultados de estimulación óptimos dependiendo del tipo de células NK utilizadas y/o agentes utilizados. Esto facilita la optimización de las condiciones de activación para subconjuntos de células NK especializadas mediante la titulación de diversas concentraciones y relaciones de la matriz móvil que tiene unidas al mismo el primer agente y la matriz móvil que tiene unido al segundo agente. Es ventajoso que generalmente la relación de nanomatrices a células sea mayor que 100:1, preferiblemente mayor que 200:1, más preferiblemente más de 500:1. La gran cantidad de nanomatrices por célula permite un ajuste fino de las nanomatrices marcadas separadas que sería imposible con relaciones menores de 1:10 a 10:1 comúnmente usadas por la estimulación de células usando perlas de tamaño celular.
- 15
- 20

La nanomatriz utilizada en la presente invención es una nanomatriz en la que la matriz móvil consiste en un material polimérico preferiblemente biodegradable que no es tóxico para las células, es decir, las cadenas poliméricas móviles de la nanomatriz son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato. Preferiblemente, la nanomatriz utilizada en la presente invención es una nanomatriz en la que la matriz móvil consiste en un polímero de dextrano. El uso de material polimérico tal como dextrano para generar la matriz da como resultado una matriz móvil y flexible. La movilidad (flexibilidad o plasticidad) de la matriz es superior en comparación con las partículas más rígidas (que tienen una superficie en fase sólida) o perlas del mismo tamaño, es decir, nanoestructuras, para la proliferación de células. En la solicitud pendiente EP12185939 se describe que a pesar de sus nanomatrices de tamaño pequeño (50-200 nm de diámetro) que comprenden una matriz de cadenas poliméricas móviles (matriz flexible), de hecho tienen un potencial único para activar células T cuando se comparan con partículas de tamaño similar con una superficie sólida.

25

30

La nanomatriz utilizada en la presente invención puede ser una nanomatriz en la que la matriz móvil es el único o al menos el principal componente de la nanomatriz independientemente de los agentes que están unidos a la misma.

- 35 Pero la nanomatriz utilizada en la presente invención también puede ser una nanomatriz en la que la nanomatriz lleva nanocristales magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos o pigmentos fluorescentes incrustados en la matriz móvil, preferiblemente incrustados en el polímero de dextrano.

La nanomatriz utilizada en la presente invención se puede usar en un método para proliferación de células NK en las que la nanomatriz no se elimina en aplicaciones posteriores de las células NK proliferadas.

- 40 Alternativamente, la nanomatriz usada en la presente invención también se puede usar en un método para proliferación de células NK en las que la nanomatriz se elimina antes de las aplicaciones subsiguientes de las células NK proliferadas.

El método inventivo divulgado aquí en el presente documento puede proporcionar una composición que comprende

- i) la nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz
- 45 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles; y
- b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células NK; activando e induciendo así la proliferación de las células NK; y en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato,
- 50

li) una población de células NK que son activadas e inducidas a proliferar provocadas por el contacto entre dicha nanomatriz y células.

La nanomatriz puede ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular.

La nanomatriz puede ser biodegradable.

5 Los agentes se unen a las mismas o a nanomatrices separadas a alta densidad, preferiblemente con más de 2µ mg por mg de nanomatriz, más preferiblemente con más de 50 µg por mg de nanomatriz.

Esta composición puede ser conveniente para generar agentes terapéuticos de células NK para uso in vivo (composición farmacéutica). La composición también se puede usar en otros análisis y experimentos posteriores.

10 El método inventivo descrito en la presente invención puede proporcionar una composición o una composición farmacéutica que comprende una población de células NK estimuladas y expandidas. La composición farmacéutica puede comprender una población de células NK proliferadas producidas por el método de la presente invención, en el que el método se lleva a cabo en un sistema de cultivo de células cerrado, tal como el sistema de procesamiento de muestras del documento WO2009072003.

15 Las nanomatrices pueden prepararse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo evaporación de disolvente, separación de fases, secado por pulverización o extracción con disolvente a baja temperatura. El proceso seleccionado debe ser simple, reproducible y escalable. Las nanomatrices resultantes deben ser de flujo libre y no agregadas con el fin de producir una suspensión uniforme manipulable con jeringa. La nanomatriz también debe ser estéril. Esto se puede asegurar, e.g. por filtración, una etapa de esterilización terminal y/o mediante un procesamiento aséptico. En el Ejemplo 1 se describe una preparación de nanomatrices.

20 Definiciones

Los términos "matriz de cadenas poliméricas móviles" y "matriz móvil" tal como se usan en el presente documento tienen un significado intercambiable. El término "móvil" se refiere a la característica común y bien descrita de biopolímeros orgánicos tales como dextrano u otros en nanopartículas (véase Bertholon y colaboradores, Langmuir 2006, pp45485-5490). Estos polímeros están constituidos por cadenas móviles (móviles), preferiblemente altamente móviles (móviles), por lo que la matriz se caracteriza por la ausencia de una superficie sólida como punto de unión para los agentes estimulantes tales como anticuerpos y que contrasta fuertemente con las perlas o microesferas utilizadas actualmente que tienen regularmente una superficie inflexible y rígida. Como resultado, la nanomatriz que comprende una matriz de cadenas poliméricas móviles es flexible y ajustable a la forma de la superficie de las células. Además, como resultado, la nanomatriz es una nanomatriz en la que la mayoría (es decir, más del 50%), preferiblemente más del 80% y más preferiblemente más del 90% y más preferiblemente más del 99% del volumen total de la nanomatriz en solución acuosa consiste en cadenas poliméricas móviles.

35 El contacto entre nanomatriz que se ha acoplado al mismo uno o más agentes estimuladores y las células que se van a estimular se beneficia del hecho de que la nanomatriz no tiene una superficie fija, dura o rígida que permita que la nanomatriz se acople a las células. La matriz consiste en un material inerte polimérico, preferiblemente biodegradable o biocompatible que es no tóxico para las células. La matriz está compuesta de cadenas poliméricas hidrófilas, que obtienen la máxima movilidad en solución acuosa debido a la hidratación de las cadenas. La matriz móvil es el único o al menos el principal componente de la nanomatriz independientemente de los agentes que están unidos a ella.

40 La matriz móvil es de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar o alginato. Preferiblemente, la matriz móvil es un polímero de dextrano.

45 La matriz móvil define la propiedad de la nanomatriz de ser muy plástica, es decir, flexible, dando lugar a la capacidad de enroscarse a la membrana de la superficie celular de las células diana, es decir, las células NK que se activarán y proliferarán. Por lo tanto, la nanomatriz se une estrechamente con sus agentes unidos a la matriz móvil a las células debido a que la movilidad de la matriz proporciona un acceso óptimo de los ligandos o anticuerpos unidos a sus receptores o antígenos de la superficie celular. Debido a esta propiedad, la nanomatriz tiene la capacidad de proporcionar suficiente entrecruzamiento para activar células NK independientemente del tamaño pequeño de la estructura, es decir, menor de 1 µm, preferiblemente menor de 500 nm, más preferiblemente menor de 200 nm. La adaptabilidad de la nanomatriz causada por la nanoestructura móvil y flexible extiende el área de contacto entre la membrana de la superficie celular y la nanomatriz, dando lugar a uniones más eficientes entre las moléculas de la superficie celular y los agentes unidos a la matriz móvil.

50 En algunas realizaciones, la matriz móvil puede incrustar nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos u otras sustancias que añaden propiedades funcionales adicionales tales como pigmentos

fluorescentes sin alterar la estructura móvil básica y/o las características superficiales, es decir, la interacción con células diana.

El término "agente" que está unido a la matriz móvil de la nanomatriz tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas que son capaces de unirse a una estructura de superficie celular y contribuyen a una estimulación y proliferación de las células NK. Ejemplos de agentes adecuados para uso en la presente invención incluyen agentes tales como compuestos sintetizados, ácidos nucleicos y proteínas, incluyendo anticuerpos policlonales o monoclonales, y fragmentos o derivados de los mismos, y proteínas por bioingeniería, tales como proteínas de fusión. En un ejemplo, los agentes son proteínas mitogénicas. Las proteínas mitogénicas son dos o más proteínas que son capaces de proporcionar el mínimo requerido de dos señales a las células NK con el fin de hacer que las células NK se activen. Por lo tanto, en el método de la presente invención, al menos dos agentes estimuladores se unen a las matrices flexibles poliméricas (las mismas matrices o matrices separadas) que proporcionan señales de activación a las células NK, preferiblemente los al menos dos agentes se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de los mismos o ligandos a CD2, CD7, CD8a, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD16, CD18, CD25, CD26, CD29, CD30, CD31, CD32c, CD38, CD39, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49d, CD49e, CD50, CD52, CD53, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD62L, CD63, CD69, CD81, CD82, CD84, CD85C, CD85E, CD85J, CD87, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD119, CD120a, CD120b, CD122, CD130, CD132, CD147, CD148CD, CD158a, CD158k, CD259a, CD159c, CD160, CD161, CD172g, CD178, CD183, CD185, CDw210b, CD212, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD221, CD222, CD223, CD225, CD226, CD229, CD230, CD232, CD244, CD247, CD257, CD261, CD262, CD263, CD264, CD270, CD274, CD277, CD280, CD295, CD298, CD314, CD316, CD319, CD321, CD328, CD329, CD335, CD336, CD337, CD352, CD354, CD355, CD357, CD360, CD361, CD363. Más preferiblemente, los al menos dos agentes se seleccionan del grupo constituido por anticuerpos, fragmentos de los mismos o ligandos a CD28, CD137 (4-1BBL), CD226 (DNAM-1), CD314 (NKG2D), CD159c (NKG2C), NKp30, NKp44, CD335 (NKp46), CD69, CD16, NKp80. Más preferiblemente, los al menos dos agentes se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de los mismos o ligandos a CD2 y CD335.

Otros agentes adecuados incluyen agentes capaces de suministrar una señal a las células NK a través de receptores de citoquina tales como IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R e IL-10R, incluyendo anticuerpos monoclonales (mAbs) a estos receptores, proteínas de fusión con un extremo reactivo específico para estos receptores y los ligandos correspondientes a estos receptores o fracciones de los mismos. Otros agentes adecuados incluyen cualquier agente capaz de unirse a moléculas de adhesión celular sobre células NK tales como mAbs, proteínas de fusión y los correspondientes ligandos o fracciones de las mismas a moléculas de adhesión en las siguientes categorías: cadherinas, ICAM, integrinas y selectinas. Ejemplos de moléculas de adhesión en las células NK son: CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-selectina) y CD29/CD49d (VLA-4). Otros agentes adecuados incluyen cualquier agente capaz de unirse a receptores de quimioquinas, incluyendo los de las categorías C-C y C-X-C. Ejemplos de receptores de quimioquinas asociados con la función de las células NK incluyen CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 y CXCR3.

Un agente puede estar unido o acoplado a la matriz móvil por una diversidad de métodos conocidos y disponibles en la técnica. La unión puede ser covalente o no covalente, electrostática o hidrófoba y puede realizarse mediante una variedad de medios de fijación, incluyendo, por ejemplo, medios químicos, mecánicos, enzimáticos u otros medios mediante los cuales un agente es capaz de estimular las células. Por ejemplo, el anticuerpo frente a una estructura de superficie celular puede estar unido a la matriz, o la avidina o estreptavidina puede estar unida a la matriz para unirse a un agente biotinilado. El anticuerpo a la estructura de superficie celular puede estar unido a la matriz directa o indirectamente, por ejemplo a través de un anticuerpo anti-isotipo. Otro ejemplo incluye el uso de proteína A o proteína G, u otras moléculas no específicas de unión a anticuerpo, unidas a matrices para unirse a un anticuerpo. Alternativamente, el agente puede estar unido a la matriz por medios químicos, tales como entrecruzamiento a la matriz.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, haptenos y fragmentos de anticuerpo, y moléculas que son equivalentes de anticuerpos en cuanto que se unen específicamente a un epítipo sobre el antígeno. El término anticuerpo incluye anticuerpos policlonales y monoclonales de cualquier isotipo (IgA, IgG, 25 IgE, IgD, IgM), o una porción de unión a antígenos de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos F (ab) y Fv tales como sc Fv, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y una biblioteca de expresión de Fab.

El término "biológicamente inerte" tal como se usa en el presente documento se refiere a las propiedades de la nanomatriz, que es no tóxica para las células vivas y no induce fuertes alteraciones de la función celular a través de la interacción física con la superficie celular, debido a su tamaño pequeño, excepto la función específica de activación de ligando/receptor de los ligandos o anticuerpos unidos. Las nanomatrices, además, pueden ser biodegradables, por ejemplo degradadas por actividad enzimática o eliminadas por células fagocíticas. El material biodegradable puede derivarse de materiales naturales o sintéticos que se degradan en fluidos biológicos, por ejemplo medios de cultivo celular y sangre. La degradación puede ocurrir usando medios enzimáticos o puede ocurrir sin medios enzimáticos. El material biodegradable se degrada en días, semanas o pocos meses, lo que puede depender de las condiciones ambientales a las que está expuesto. El material biodegradable debe ser no tóxico y no antigénico para las células vivas

5 y en humanos. Los productos de degradación deben producir subproductos no tóxicos. Un aspecto importante en el contexto de ser biológicamente inerte es el hecho de que la nanomatriz no induce una fuerte alteración en la estructura, función, estado de actividad o viabilidad de las células marcadas, es decir, no causa perturbación de las células y no interfiere con los experimentos y las aplicaciones terapéuticas posteriores de las células estimuladas. La irritación mecánica o química de la célula se reduce debido a que las propiedades de la nanomatriz son muy pequeñas, es decir, en un rango de nanoescala y tiene una matriz móvil que se acopla más bien a la superficie celular en lugar de alterar la forma de la superficie celular o ejercer una elevada fuerza de corte a las células, resultando, por ejemplo, en rotura de la membrana.

10 El término "PBMC" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a células mononucleares de sangre periférica aisladas de preparaciones de sangre periférica humana, e.g. mediante el uso de un gradiente de densidad (por ejemplo Ficoll, PanColl). Las "PBMC" consisten en linfocitos y monocitos.

15 El término "población de células NK" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una suspensión celular que contiene células asesinas naturales humanas. Las células NK son positivas para CD56 y negativas para CD3. En donantes sanos, las células NK son positivas para CD335 (NKp46). Una suspensión de células que contiene células NK puede ser sangre periférica, una preparación de capa pulida de sangre periférica, sangre de cordón o una recolección por aféresis o preparaciones de los mismos ("PBMC") o "células NK purificadas". Una "población de células NK" puede contener varias subpoblaciones de células NK y células NK en un estado diferente de diferenciación y/o activación. Además, el término "población de células NK" tal como se usa en el presente documento no se limita a la población humana de células NK sino que también puede ser de otras especies tales como ratón, rata, res, perro, caballo, cerdo y oveja. Por lo tanto, el alcance del uso de la nanomatriz de la presente invención no se limita a la especie humana. Para la estimulación eficaz de células NK de otras especies distintas de las humanas, la nanomatriz de la presente invención puede acoplarse con agentes que se unen a células NK de otras especies.

25 El término "células NK purificadas" tal como se usa en el presente documento se refiere a poblaciones celulares con un contenido aumentado de células asesinas naturales. Las células NK pueden purificarse mediante diferentes métodos, incluyendo la clasificación FACS®, el enriquecimiento mediante perlas magnéticas (por ejemplo CD56 MicroBeads, Miltenyi Biotec), el agotamiento de las células magnéticas de células no NK (por ejemplo, kit de aislamiento de células NK, Miltenyi Biotec) Por ejemplo, RosetteSep®, Stem Cell Technologies) o métodos de aislamiento de sangre completa (MACSxpress®, Miltenyi Biotec), así como adhesión sobre superficies revestidas con anticuerpos.

30 El término "subconjuntos de células NK" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a subpoblaciones de células NK que están definidas por varios marcadores con poblaciones de células CD56 + CD3-NK que expresan estos marcadores con diferente densidad, por ejemplo CD56 atenuada/brillante, CD16 +/-, CD8 +/-, CD2 +/-, NKG2A +/-, NKG2C +/-, KIR +/-, CD161 +/-, CD25 +/-, CD69 +/-.

#### Realizaciones

35 En una realización de la presente invención, una primera nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, consta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y ha unido a éste un agente, por ejemplo anti-CD2 mAb. Una segunda nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm de tamaño consta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene unido a este otro agente, por ejemplo anti-CD335 mAb. En este caso, la nanomatriz utilizada en la presente invención es una nanomatriz en la que al menos un primer agente y un segundo agente se unen a matrices móviles separadas.

40 Una mezcla de estas nanomatrices se pone en contacto con células NK, con lo que se activa e induce la proliferación de las células NK.

El ajuste fino de nanomatrices para la estimulación de las células NK se realiza fácilmente debido a la alta proporción de nanomatrices a células (normalmente mayores de 100:1).

45 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm de tamaño consta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y ha unido a éste un agente, por ejemplo anti-CD2 mAb. En este caso, la nanomatriz utilizada en la presente invención es una nanomatriz en la que al menos un primer agente está unido a matrices flexibles. Esta nanomatriz se pone en contacto con células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células NK.

50 Se pueden añadir un segundo o más (múltiples) agentes coestimulantes, por ejemplo anti-CD335 mAb, como agentes solubles para optimizar o apoyar la activación inducida por la nanomatriz con el primer agente unido a ella.

En otra realización de la presente invención, una nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm, consta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene unidos a ella dos agentes que proporcionan señales de activación a la célula, e.g anti-CD2 mAb y anti-CD335 mAb. En este caso, la nanomatriz utilizada en la presente invención es una

nanomatriz en la que al menos un primer agente y un segundo agente están unidos a la misma matriz móvil. Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células NK.

5 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm de tamaño consta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene unidos a ella múltiples agentes que proporcionan señales de activación a la célula, por ejemplo anti-CD2mAb y mAb anti-CD335 u otras moléculas activadoras o coestimuladoras conocidas. En este caso, la nanomatriz utilizada en la presente invención es una nanomatriz en la que al menos un primer agente y múltiples otros agentes están unidos a la misma matriz móvil.

10 Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células NK.

15 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz de 1 a 500 nm, preferiblemente de 10 a 200 nm para uso en la presente invención, consiste en una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene unidos a éste uno o más agentes que proporcionar señales de activación a las células, por ejemplo anti-CD2 mAb y/o anti-CD335 mAb. Además, la nanomatriz lleva nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en el polímero. La nanomatriz se pone en contacto con células NK, activando e induciendo así la proliferación de las células T. Opcionalmente, después de estimular las células NK, la nanomatriz magnética, paramagnética o superparamagnética no unida puede ser eliminada aplicando un gradiente de campo magnético. Alternativamente, las células marcadas con las nanomatrices magnéticas pueden separarse aplicando un gradiente de campo magnético, en particular un campo magnético de alto gradiente, y posterior expansión de las células NK purificadas.

20 Aunque no es necesario eliminar la nanomatriz después de la activación y proliferación de la población de células NK debido a su propiedad de ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular, se puede eliminar opcionalmente la nanomatriz con condiciones de lavado suaves, las cuales son suficientes para lavar las nanomatrices de las células o cultivo celular. Las nanomatrices se pueden diluir fácilmente mediante etapas de lavado repetidas hasta concentraciones eficaces por debajo del umbral de activación de las células NK. Esta etapa de eliminación opcional es mucho más fácil de realizar con las nanomatrices que con perlas o microesferas bien conocidas en el estado de la técnica debido a su pequeño tamaño. Si la nanomatriz lleva nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en el polímero entonces puede realizarse opcionalmente la etapa de eliminación aplicando un gradiente de campo magnético a la mezcla célula/nanomatriz.

30 El método de la invención se puede usar para expandir poblaciones de células NK seleccionadas para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer. La población de células NK resultante puede transducirse genéticamente y utilizarse para inmunoterapia o puede usarse para el análisis in vitro de agentes infecciosos tales como VIH después de la expansión de la población de células NK a números suficientes, las células NK expandidas se vuelven a infundir en el individuo o paciente. De forma similar, se puede obtener una población de linfocitos infiltrantes de tumores de un individuo afectado con cáncer y las células NK estimuladas para que proliferen hasta números suficientes y ser restauradas al individuo. Además, los sobrenadantes de cultivos de células NK expandidas de acuerdo con el método de la invención son una fuente rica de citoquinas y pueden usarse para sostener células NK in vivo o ex vivo. En otra realización de la presente invención, se puede usar una nanomatriz como se describe en cualquier realización precedente en un sistema de cultivo de células cerrado, e.g. (Miltenyi Biotec, Baxter, CellGenics), dispositivos G-Rex (fabricación de Wilson Wolf), WAVE Bioreactors (GE Healthcare), Quantum Cell Expansion System (Terumo BCT), el sistema de procesamiento de muestras de WO2009072003 o bolsas de cultivo celular. Las nanomatrices tienen una conectividad óptima a tal sistema de cultivo celular cerrado, pueden ser fácilmente esterilizadas por filtración e integradas en el sistema de cultivo de células cerrado. Facilitan los procesos del sistema de cultivo de células cerrado, es decir, la estimulación de las células NK u otras células diana, porque no es necesaria la eliminación de las nanomatrices después del proceso de estimulación (y expansión) como se describe en el presente documento. La nanomatriz puede añadirse en relación con el volumen del cultivo en lugar del número de células NK. El volumen de cultivo puede evaluarse mediante un equilibrio o un sistema de cámaras (por ejemplo, en el sistema de procesamiento de muestras de WO2009072003).

50 El uso del método de la presente invención dentro de un sistema de cultivo de células cerrado tal como el sistema de procesamiento de muestras de WO2009072003 da como resultado una manera segura y fácil de producir una composición farmacéutica de células NK estimuladas debido al riesgo reducido de, e.g. agentes contaminantes tales como otras células eucariotas, bacterias o virus (manejo más seguro y más rápido por el operador).

55 En otra realización de la presente invención, se puede usar una nanomatriz como la descrita en cualquier realización anterior para inducir la proliferación en subconjuntos específicos de células NK que se caracterizan por su repertorio KIR único. Las células NK son "educadas" en su interacción de sus moléculas KIR con sus ligandos (es decir, moléculas HLA de clase I). Basándose en este proceso educativo, los subgrupos de células NK específicos de KIR se vuelven más citotóxicos y, por tanto, más atractivos para su uso como terapéutico celular. En esta realización, los anticuerpos que se unen a moléculas de KIR se unen a la nanomatriz para imitar el proceso de educación en células NK proliferantes.

- En otra realización de la presente invención, el cultivo de células NK mediante el uso de la nanomatriz se realiza dentro de un campo magnético. En esta realización, la nanomatriz consiste en núcleos superparamagnéticos incrustados en la matriz móvil. Cuando se aplican a un campo magnético se inducen fuerzas magnéticas en la nanomatriz y los ligandos que activan los receptores de células NK activadoras pueden concentrarse para mejorar la inducción de la proliferación.
- 5 El cultivo de células NK dentro de un campo magnético puede realizarse en una columna que consiste en una matriz ferromagnética (por ejemplo, de WO2009072003) o en una bolsa, matraz o cámara en proximidad cercana a un imán permanente fuerte.
- En otra realización de la presente invención se induce la proliferación de células NK para conseguir un aumento de al menos 50 veces en el número de células. Alrededor de  $4E8$  células NK pueden enriquecerse a partir de un producto de aféresis típico. La dosis de células diana para ensayos clínicos se define frecuentemente como  $1-2E8$  células NK por kg de peso corporal del paciente, es decir,  $2E10$  células NK expandidas para un paciente de 100 kg. La dosis de la célula diana se puede conseguir con una expansión de 50 veces (ejemplo 3). El grado de expansión se calcula como el número de células NK después del proceso de cultivo dividido por el número de células NK que se ha utilizado para iniciar el cultivo.
- 10
- 15 Típicamente 30-80% de las células NK mueren dentro de los primeros 5 días del cultivo. Éstas son células NK que están diferenciadas terminalmente y funcionalmente agotadas (por ejemplo no son capaces de proliferar). En el caso de que el 80% de las células NK de entrada mueran en la fase de cultivo inicial, una expansión de 50 veces, como se ha definido anteriormente, se traduce en una expansión de 250 veces con respecto al número de células más bajo en el cultivo.
- 20 En otra realización de la presente invención, se induce la proliferación de células NK para conseguir un aumento de al menos 200 veces en el número de células. Aproximadamente  $1E7$  de células NK pueden enriquecerse a partir de una donación de 100 ml de sangre entera. La dosis de células diana para ensayos clínicos se define frecuentemente como  $1-2E8$  células NK por kg de peso corporal del paciente, por ejemplo  $2E9$  células NK expandidas para un paciente pediátrico de 20 kg. La dosis de la célula diana se puede conseguir con una expansión de 200 veces (ejemplo 3).
- 25 En otra realización de la presente invención se induce la proliferación de células NK para conseguir un aumento de al menos 500 veces en el número de células y se usan donaciones semanales de sangre (100 ml) para cultivar células NK. Dentro de un tratamiento semanal de 8 semanas, se pueden administrar  $4E10$  células NK cultivadas a un paciente de cáncer (ejemplo 2).
- 30 Antes de la estimulación de células NK mediante la presente invención, las células NK pueden ser identificadas directamente y/o separadas o aisladas de sangre, células de sangre mononucleares periféricas (PBMC), tejido corporal o células de fluidos tisulares. Las células se identifican normalmente y/o se separan de muestras de células de mamíferos tales como seres humanos, ratón o rata, pero especialmente de humanos y preferiblemente de sujetos de ensayo y/o pacientes. La separación se realiza por métodos de clasificación bien conocidos en la técnica. Esto incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cualquier otra técnica de separación dependiente de anticuerpos conocida en la técnica. Cualquier técnica de separación dependiente de ligando conocida en la técnica puede usarse conjuntamente con técnicas de separación tanto positivas como negativas que dependen de las propiedades físicas de las células. Una tecnología de clasificación especialmente potente es la clasificación de células magnéticas. Los métodos para separar las células magnéticamente están disponibles comercialmente, por ejemplo de Invitrogen, Stemcell Technologies, Cellpro, Advanced Magnetics o Miltenyi Biotec. Además de las mezclas de células NK con otras células, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B u otras células que forman parte de muestras de células hematológicas, tales como sangre o leucaféresis, pueden usarse poblaciones de células NK altamente purificadas para ser puestas en contacto con presente invención, incluyendo subpoblaciones de células NK, tales como células NK de  $CD56^{atenuado}$ , células NK de  $CD56^{brillante}$ , subpoblaciones positivas y negativas de  $CD27$ , subpoblaciones positivas y negativas de  $CD2$ , subpoblaciones positivas y negativas de  $CD16$ , subpoblaciones positivas y negativas de  $KIR$ . Las nanomatrices proporcionan suficiente actividad de entrecruzamiento para activar receptores de células NK, por lo tanto no se requiere entrecruzamiento adicional para la activación, por ejemplo a través de células que expresan el receptor Fc, tales como monocitos o células dendríticas.
- 35
- 40
- 45 Las poblaciones de células diana, tales como las poblaciones de células NK obtenidas mediante la presente descripción, pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como  $IL-2$  u otras citoquinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender una población de células diana tal como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Una composición farmacéutica puede comprender
- 50
- 55 a) una población de células NK, en la que dichas células NK se hacen proliferar hasta cantidades terapéuticamente eficaces de acuerdo con la presente invención; y b) uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dicha composición puede contener trazas de nanomatrices que son biológicamente inertes con respecto a la alteración de la función celular, pero pueden ser biodegradables, y que no son tóxicas y no son antigénicas para los seres humanos. Las composiciones de la presente descripción se formulan preferiblemente para

administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de una manera apropiada a la enfermedad por tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración se determinará por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque pueden determinarse dosificaciones apropiadas mediante ensayos clínicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de nanomatrices

Las nanomatrices magnéticas se produjeron mediante una modificación del procedimiento de Molday y MacKenzie. Se disuelven 10 gramos de Dextran T40 (Pharmacia Uppsala, Suecia), 1,5 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.64 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se calienta a 40°C. Mientras se agita, se añaden lentamente 10 ml de NaOH 4N y la solución se calienta a 70°C durante 5 min. La suspensión de partículas se neutraliza con ácido acético. Para retirar los agregados, la suspensión se centrifuga durante 10 minutos a 2.000 g y se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GV, Millipore, Molsheim, Francia). El dextrano sin unir se elimina lavando en un campo magnético de alto gradiente (HGMF). El lavado con HGMF de nanomatrices magnéticas se realiza en columnas de lana de acero realizadas como se describe a continuación y colocadas en un campo magnético de aprox. 0,6 Tesla (imán permanente MACS®, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). Se aplican 10 mililitros de suspensión de nanomatrix a una columna de 15 x 40 mm de 2 g de lana de acero. La columna cargada se lava con 30 ml de acetato de sodio 0,05 M. Después de retirar la columna del campo magnético externo, las nanomatrices magnéticas se eluyen con acetato de sodio 0,05 M. Las nanomatrices forman una suspensión marrón. La concentración relativa de partículas se da como densidad óptica a 450 nm. El tamaño de las nanomatrices se determinó por microscopía electrónica y dispersión de luz dinámica a  $30 \pm 20$  nm (e.m.) y  $65 \pm 20$  nm (DLS). Se determinó que el contenido de dextrano y el contenido de magnetita de la matriz dentro de la solución coloidal estaban en el intervalo de aproximadamente 3,5 mg/ml y 4,8 mg/ml, respectivamente, resultando aproximadamente en una relación de 40:60 p/p. Con base en la densidad de la nanomatrix seca de 2,5 g/ml determinada por picnómetro y las densidades conocidas de dextrano y magnetita de 1,6 g/ml y 5,2 g/ml, respectivamente, se puede calcular que el volumen de dextrano es aproximadamente el 70% para la nanomatrix seca. Las nanomatrices muestran un comportamiento superparamagnético, determinado por las mediciones de susceptibilidad. El tamaño de los microcristales de ferritas atrapados se determinó a partir de mediciones magnéticas a aproximadamente 10 nm.

Se conjugaron anticuerpos de CD2 (anticuerpos de clon LT2, isotipo IgG2b de ratón) y CD335 (NKp46) (clon 9E2, isotipo IgG1 de ratón) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) con las mismas o separadas nanomatrices por química de bioconjugación estándar (Bioconjugate Techniques, 2nd Edition, de Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 2008).

Ejemplo 2: Expansión de células NK de células mononucleares de sangre periférica usando nanomatrices en diversas concentraciones de CD2/CD335 frente a CD2/CD335 MACSi - Beads

Los reactivos actuales de la técnica para la activación de células NK altamente purificadas comprenden anticuerpos activadores contra CD2/CD335 inmovilizados sobre las superficies de partículas de tamaño de célula grande (2-10  $\mu\text{m}$ ) o cocultivo con líneas celulares alimentadoras. Ambas técnicas son propensas a errores y técnicamente difíciles de realizar y estandarizar, especialmente bajo condiciones de producción compatibles con GMP. En contraste, las nanomatrices pueden prepararse fácilmente y usarse convenientemente para cultivo celular bajo condiciones GMP. Por lo tanto, se comparó el potencial para inducir la proliferación de células NK analizando el potencial de expansión de las nanomatrices recubiertas con CD2 y CD335 a diversas concentraciones con perlas de estimulación celular comercialmente disponibles (MACSiBeads,  $\varnothing$  4,5  $\mu\text{m}$ , Miltenyi Biotec GmbH). Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de preparaciones de capa leucocitaria a partir de sangre entera humana. Las PBMC se cultivaron en el medio CellGenix CellGro SCGM suplementado con 1000 unidades de Interleuquina-2 (IL-2) y suero AB humano al 5% de lotes de suero preseleccionados a 1E6 células/ml. Se añadieron perlas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (relación 1:2 para MACSiBeads) o en volúmenes de 1, 5, 25 o 50  $\mu\text{l}$  de un conjugado de nanomatrix CD2/CD335 concentrada de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (relación 1: 1) por ml de medio. La expansión a dosis óptimas (100 ng/ml) fue similar o mejor que el reactivo estándar (MACSi-Beads). La expansión a dosis óptimas (100 ng/ml) fue similar o mejor que el reactivo estándar (MACSi-Beads). A dosis más altas, la expansión se redujo debido a la sobreestimulación de las células NK (muerte celular inducida por activación).

El número de células NK se incrementó 3800 veces y 900 veces. El contenido de células NK aumentó de <10% a 60-90%. En conjunto, estos resultados muestran que las nanomatrices recubiertas con CD2/CD335 pueden inducir eficazmente la proliferación de células NK dentro de PBMC a concentraciones de anticuerpo muy bajas y sin necesidad de entrecruzamiento adicional.

Ejemplo 3: Expansión de células NK a partir de células NK purificadas usando nanomatrices en diversas

concentraciones de CD2/CD335 frente a MACSiBeads de CD2/CD335.

5 Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de preparaciones de capa leucocítica a partir de sangre entera humana. Las células NK se aislaron usando el kit de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec). Se cultivaron células NK aisladas en el medio CellGenix CellGro SCGM suplementado con 1000 unidades de Interleuquina-2 (IL-2) y suero AB humano al 5% de lotes de suero preseleccionados a 1E6 células NK/mL. Se añadieron perlas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (relación 1: 2 para MACSiBeads) o en volúmenes de 1, 5, 25 o 50 µl de un conjugado de nanomatriz CD2/CD335 concentrado de 100 µg/ml (relación 1:1) por ml de medio. Las nanomatrices expanden eficientemente las células NK. La expansión a dosis óptimas (100 ng/ml) fue similar o mejor que el reactivo estándar (MACSiBeads). A dosis más altas, la expansión se redujo debido a la sobreestimulación de las células NK (muerte celular inducida por la activación).

10 El número de células NK se incrementó 400 veces, 35 veces y 50 veces. En conjunto, estos resultados muestran que las nanomatrices recubiertas con CD2/CD335 pueden inducir eficazmente la proliferación de células NK, de células NK purificadas a concentraciones anticuerpos muy bajas y sin necesidad de entrecruzamiento adicional.

15 Ejemplo 4: Expansión de células NK a partir de células NK purificadas usando nanomatrices en diversas relaciones de CD2/CD335

20 Los anticuerpos CD2 (clon LT2) y CD335 (clon 9E2) se conjugaron a nanomatriz en relaciones de 1:2, 1:1 y 2:1. Las células NK purificadas se cultivaron a 1E6/mL en el medio CellGenix CellGro SCGM suplementado con 1000 unidades de IL-2 y 5% de suero AB humano preseleccionado y la nanomatriz. Las células NK se cultivaron con las diferentes variantes de la nanomatriz durante 14 días. Los cultivos se dividieron cuando se alcanzó una concentración celular de células > 5E5. Las velocidades de expansión fueron 11/21, 18/14 y 13/11 para relaciones 1:1, 1:2 y 2:1 (CD2: CD335) a concentraciones de 100 y 250 ng/ml. Para tres donantes adicionales las tasas de expansión fueron 14/8, 11/8, 13/14 veces y 9/34, 12/18 10/10 veces y 32/25, 23/17, 21/20 veces respectivamente. Los valores de referencia para el uso de perlas de tamaño celular (kit de activación y expansión de células NK, Miltenyi Biotec) fueron 17/16 (a 100/250 ng/ml), 17/15 y 33/37 y 23/18 veces para los mismos donantes.

25 Ejemplo 5 Expansión de células NK de células mononucleares de sangre periférica usando combinaciones de nanomatrices conjugadas con anticuerpos CD2 y CD335 (nanomatrices separadas)

30 Los anticuerpos CD2 (clon LT2) y CD335 (clon 9E2) se conjugaron individualmente a nanomatrices (véase el ejemplo 1). Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de preparaciones de capa leucocitaria a partir de sangre entera humana. Se cultivaron PBMCs a 1E6/mL en medio CellGenix SCGM de Cell-Genix suplementado con 1000 unidades de IL-2 y 5% de suero AB humano preseleccionado y mezcla 1:1 de la nanomatriz CD2 y la nanomatriz CD335. Se cultivaron células NK durante 14 y 19 días. Los cultivos se dividieron cuando se alcanzó una concentración celular de células > 5E6. Las tasas de expansión fueron 420/350/290 y 250 veces a 100/500/2500/5000 ng/mL después de 14 días y 910/750/410 y 670 veces después de 19 días. Las células NK en PBMC cultivadas con perlas de tamaño celular (kit de activación y expansión de células NK, Miltenyi Biotec) se expandieron 380 (d14) y 530 veces (d19). Si es similarmente eficaz a gran escala, se puede obtener una posible dosis de 2E10 células diana con un número de células NK inicial de células NK <3E7, un número de células que está contenido en 100 a 300 ml de sangre entera (se supone una expansión de 750 veces).

Reivindicaciones

1. El uso de una nanomatriz para inducir in vitro la proliferación de células NK, comprendiendo la nanomatriz
- a) una matriz de cadenas poliméricas móviles, y
- 5 b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes estimuladores que proporcionan señales de activación a las células NK;
- en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato.
- 10 2. Un método in vitro para inducir la proliferación de células NK, comprendiendo el método el contacto de una población de células NK con una nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz
- a) una matriz de cadenas poliméricas móviles; y
- b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes estimuladores que proporcionan señales de activación a las células NK;
- 15 en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que al menos un primer y un segundo agentes estimuladores están unidos a la misma matriz de cadenas poliméricas móviles.
- 20 4. El método según la reivindicación 2, en el que al menos un primer y un segundo agentes estimuladores están unidos a matrices separadas de cadenas poliméricas móviles.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la relación de nanomatrices a células es mayor que 100:1 permitiendo el ajuste fino de la proliferación de células NK.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que un agente estimulador es un anticuerpo anti-CD2 o fragmento del mismo.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el segundo agente estimulador es un anticuerpo anti-CD335 o fragmento del mismo.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la matriz de cadenas poliméricas móviles consiste en un polímero de dextrano.
- 30 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la nanomatriz lleva nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en la matriz de cadenas poliméricas móviles.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el agente estimulador está unido a alta densidad con más de 25 µg por mg de nanomatriz.
- 35 11. Un método para inducir la proliferación de células NK en un sistema de cultivo de células cerrado, comprendiendo el método poner en contacto un cultivo de células que comprende una población de células NK dentro de dicho sistema de cultivo de células cerrado con una dosificación de nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz
- a) una matriz de cadenas poliméricas móviles; y
- b) unidos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes estimuladores que proporcionan señales de activación a las células NK;
- 40 en el que la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y en el que dichas cadenas poliméricas móviles son de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en éteres de celulosa, almidón, goma arábica, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar y alginato y en el que dicha dosificación de nanomatriz se

aplica estéril a dicho sistema de cultivo de células cerrado, y en el que dicha dosificación depende del volumen del cultivo celular en dicho sistema de cultivo de células cerrado.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho volumen del cultivo celular puede determinarse mediante una balanza o un sistema de cámara sin afectar a la barrera de esterilidad.

5 13. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 11 y 12, en el que la determinación y aplicación de dicha dosificación se realizan automáticamente.