

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 910**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 31/455 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2010 PCT/IL2010/001091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11080740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2010 E 10807391 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2519239**

54 Título: **Métodos para potenciar la proliferación y la actividad de células destructoras naturales**

30 Prioridad:

29.12.2009 US 282196 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**GAMIDA-CELL LTD. (100.0%)
5 Nahum Hafzadi Street, Ofer Building Givat
Shaul
95 484 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**PELED, TONY y
FREI, GABI M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 627 910 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

Métodos para potenciar la proliferación y la actividad de células destructoras naturales

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere al cultivo *ex vivo* de células destructoras naturales (NK, *natural killer*) y, más particularmente, aunque no exclusivamente, a composiciones y a métodos para potenciar la propagación y/o funcionalidad de células NK por tratamiento de las células con nicotinamida en combinación con citocinas lo que conduce a la proliferación de células NK.

Las células destructoras naturales (en lo sucesivo en el presente documento, indicadas también con la abreviatura "NK") son células linfoides que participan en reacciones inmunitarias. Estas células tienen diversas funciones, específicamente la destrucción de células tumorales, células que sufren transformación oncogénica y otras células anómalas en un organismo vivo, y son componentes importantes de mecanismos de vigilancia inmunológicos innatos. La experiencia clínica con inmunoterapia adoptiva con células NK ha destacado la necesidad de mejores métodos para expandir de un modo eficaz y eficiente poblaciones de células NK manteniendo al mismo tiempo, e incluso potenciando, su funcionalidad *in vivo* (destruyendo la capacidad de trans migración, localización, persistencia y proliferación).

Las células NK representan una población singular de linfocitos en términos tanto de fenotipo como de función. Las células NK tienen una morfología linfocítica granular grande y expresan receptores de superficie celular característicos de NK y carecen tanto de reordenamiento del TCR (receptor de células T) como de marcadores de superficie celular de células T, B monocitos y/o macrófagos. Las células destruyen liberando pequeños gránulos citoplasmáticos de proteínas (perforina y granzima) que hacen que la célula diana muera por apoptosis. Las células NK poseen mecanismos que diferencian entre posibles células "diana" y células sanas, mediante una multitud de receptores inhibidores y activadores que involucran a moléculas similares al MHC de clase I y a moléculas no relacionadas con el MHC (Caligiuri Blood 2008 112: 461-69). Los receptores inhibidores de células NK incluyen HLA-E (CD94/NKG2A); HLA-C (grupo 1 o 2), KIR2DL; KIR3DL (HLA-B Bw4) y HLA-A3 o péptido A4+. Los receptores activadores de células NK incluyen HLA-E (CD94/NKG2C); KIR2DS (HLA-C) y KIR3DS (HLA-Bw4). Otros receptores incluyen la proteína-1 receptora de células NK (denominada NK1.1 en ratones) y el receptor de baja afinidad por la parte Fc de la IgG (FcγRIII; CD16). Los activadores de células NK específicos, las proteínas de unión a UL (ULBP) y su posible uso terapéutico, se describen con detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos US20090234699 de Cosman *et al.* "Activating" and "inhibitory" surface receptors control the NK cell's cytotoxic activity. Cabe destacar en cuestiones terapéuticas que para prevenir la destrucción de tejidos hospedadores normales mediante células NK "activadas" se requiere la inhibición de células NK, aunque la señalización inhibitoria en las células NK parece ser más fuerte que las señales activadoras.

La médula ósea intacta es necesaria para la generación de células NK. Las células NK procedentes de médula ósea humana son linfocitos granulares grandes (LGL "large granular lymphocytes") del fenotipo CD2+CD16+CD56+, que carece de CD3 aunque contiene la cadena zeta del receptor de células T [zeta(ζ)-TCR]. Las células NK pueden encontrarse en diversos tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo sangre, bazo, hígado, pulmones, intestinos y decidua. Las células NK se han encontrado en cantidades significativas en tumores, donde pueden ejercer actividad antitumoral.

Las células NK presentan actividad citotóxica espontánea no restringida al MHC frente a células tumorales e infectadas con virus, y actúan como mediadores en la resistencia a infecciones víricas y en el desarrollo del cáncer *in vivo*. Por tanto, las células NK representan células efectoras principales de inmunidad innata. Además, las células NK poseen diversas funciones distintas, incluyendo la capacidad de secretar citocinas y de regular la respuesta inmunitaria adaptativa y la hematopoyesis. Las células NK proporcionan interferón gamma (IFN-gamma) necesario durante las fases iniciales de infección en diversos modelos animales experimentales.

La mayoría de los cánceres carecen de antígenos, específicos de tumor, identificables en el contexto de HLA, y por tanto no pueden sucumbir a los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno. Dado que una gran variedad de células cancerosas son sensibles a citotoxicidad NK, puede emplearse el trasplante de células destructoras naturales (NK) contra células cancerosas en un entorno alogénico, sin riesgo de enfermedad injerto contra huésped (EICH)

Recientes estudios han destacado este potencial de terapia con células NK. En modelos animales de trasplante, células NK donantes producen la lisis de células leucémicas y de células linfohematopoyéticas hospedadoras sin afectar a tejidos no hematopoyéticos. Dado que las células NK están inhibidas por las propias moléculas HLA, que se unen a receptores destructores similares a inmunoglobulina (KIR, *killer immunoglobulin-like receptors*), estos hallazgos han conducido a la práctica clínica de seleccionar donantes de trasplante de células madre hematopoyéticas con un tipo HLA y KIR que favorece la activación de células NK (incompatibilidad con HLA y KIR) y por tanto puede esperarse que promueva un efecto antileucémico. Sin embargo, la selección del "mejor" donante está limitada a pacientes que tienen más de un posible donante y la capacidad de las células NK para producir la

lisis de células linfoides es generalmente baja y difícil de predecir. Una vigilancia de la distribución y función de NK en afecciones autoinmunes, ha indicado números reducidos y funcionalidad de la población de células NK en muchas enfermedades autoinmunes (por ejemplo, LES, síndrome de Sjogren, esclerosis, psoriasis, AR, colitis ulcerosa, etc.). Por tanto, el tratamiento con células NK puede suprimir células T autoinmunes posiblemente patógenas que pueden actuar como mediadores de las respuestas inflamatorias después de un trasplante de médula ósea, regulando la activación de células T de memoria autoinmunes de una manera no específica de antígeno, para mantener la remisión clínica y prevenir el efecto de ICH (injerto contra huésped).

Para su uso clínico, las células NK se extraen normalmente de un paciente o de un donante mediante leucocitaféresis. Sin embargo, la dosis máxima de células NK está limitada y solo pueden obtenerse dosis altas de células NK de pacientes con un peso corporal bajo, haciendo que los niños sean los mejores candidatos para la terapia con células NK. De manera significativa, el número total y la actividad de las células NK pueden disminuir sustancialmente en infección vírica y/o cáncer, haciendo que la inmunoterapia basada en la activación de células NK endógenas sea ineficaz. Adicionalmente, las recidivas refractarias son una complicación importante en las transfusiones celulares, y muchos protocolos clínicos requieren infusiones repetidas de poblaciones de linfocitos.

En este sentido, Verneris *et al.* (Brit J Hematol 2009; 147: 185-91), revisando las expectativas del uso clínico de células NK de sangre de cordón umbilical, han indicado recientemente que las poblaciones de células NK de sangre de cordón umbilical reciente, pueden requerir una manipulación adicional para expresar su potencial funcional completo (citotóxico, motilidad). Después del tratamiento sistémico con diversos modificadores de respuesta biológica, particularmente IL-2, se ha descubierto que el número de células NK activadas y sus actividades antivíricas y antimetastásicas, aumenta drásticamente en diversos tejidos. Basándose en esta prueba, se han hecho ensayos sobre estrategias terapéuticas que implican la activación y expansión de células NK junto con IL-2 (e IL-15), así como la coadministración de IL-2 al receptor de la transfusión. Sin embargo, hasta ahora, los resultados no han sido afortunados, indicando solo un asentamiento limitado y una implantación transitoria de las células NK infundidas. Además, la IL-2 es tóxica, y debe utilizarse con extrema precaución en el entorno clínico.

En un intento de desarrollar un protocolo clínico factible para el enriquecimiento y proliferación de células NK *ex vivo*, se ha utilizado tecnología de selección celular magnética, utilizando microperlas paramagnéticas para CD56 y columnas de selección celular, para aislar una población de CD56+ que contiene células T tanto NK CD3⁺/56⁺ (60,6 ± 10,8 %) como CD3⁺/56⁺ (30,46 ± 8,6 %) para iniciar los estudios de proliferación. Con la adición de IL-2 humana o de IL-15 humana recombinante más IL-2, se observó una variabilidad de expansión celular sustancial, dependiendo del donante, e incluso cuando se analizó el mismo donante en diferentes ocasiones. La citotoxicidad de las células CD56⁺ seleccionadas y propagadas a una proporción de E:D fue significativamente más alta que la de la población de partida, pero fue comparable a la de las CMNSP no separadas cultivadas durante 2 semanas en las mismas condiciones. En cultivos recientes, no seleccionados, de CMSP, la IL-15 (en combinación con la IL-2) indujo una destrucción más alta a la proporción de E:D de 1:1, en comparación solo con IL-2. En especial, dado que antes del cultivo no había empobrecimiento de células CD3⁺, la proliferación de células NKT CD3⁺CD56⁺ fue 2-3 veces la de las células NK CD3⁺CD56⁺. Únicamente se produjo una proliferación moderada de células CD56⁺/CD3⁺, siendo la mayoría de las células resultantes células NKT CD56⁺/CD3⁺.

En una estrategia diferente, se cultivaron células NK CD3-CD56+ a partir de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+ procedentes de MO en presencia de diversas citocinas producidas por células estromales de médula ósea y/o células inmunitarias (tales como ligando *c-kit*, IL-2 e IL-15). La adición del factor de células madre a estos cultivos no tuvo efecto sobre la diferenciación de las células efectoras citotóxicas CD3-CD56+, pero potenció enormemente su proliferación en cultivo. La mayoría de estas células carecen de CD2 y CD16, pero expresan la cadena zeta del receptor de células T (zeta-TCR). Similar a las células NK encontradas en sangre periférica, se descubrió que las células NK CD2-CD16-CD56+ procedentes de médula ósea cultivadas en presencia de IL-15, que eran fuertes productoras de IFN-gamma en respuesta a citocinas procedentes de monocitos. IL-15 puede inducir células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+ para diferenciarse en células NK CD3-CD56+ y KL puede amplificar sus números. Sin embargo, las producciones de células NK están limitadas por los bajos números de posibles progenitores de NK entre la población de células CD34+.

Se han descrito otros métodos de propagación de células NK. Frias *et al.* (Exp Hematol 2008; 36: 61-68), desarrollaron progenitores de NK (CD7⁺CD34⁺Lin⁻CD56⁺) seleccionados de sangre de cordón umbilical en capas de células estromales con un medio asérico, que induce la diferenciación de NK con SCF, IL-7, IL-15, FL e IL-2, produciendo números aumentados de células NK cultivadas citotóxicas. Harada *et al.* (Exp Hematol., 2004; 32: 614-21) desarrollaron células NK en células de una línea de células de tumor de Wilm. Waldmann *et al.* (US20070160578) describen la proliferación potenciada de células NK y células T CD8- de células de sangre entera, médula ósea o bazo en cultivo utilizando complejos de IL-15/activador de ligando R, para reducir la producción no deseable de citocinas. Campana *et al.* (US20090011498) describen el cultivo *ex vivo* y la activación de células NK para trasplante, en presencia de células de leucemia que expresan IL-15 y 4-1BB y que tienen una expresión débil o ausente de MHC-I o II. Childs *et al.* (US20090104170) describen la proliferación *ex vivo* y la activación de células NK mediante cocultivo con células linfoblastoides transformadas con VEB irradiadas, en presencia de IL-2. Utilizando otra estrategia, Tsai (US20070048290) produjo líneas de células NK continuas procedentes de células madre

hematopoyéticas mediante cultivo *ex vivo* de progenitores NK inmortalizados con células OP-9S procedentes de 3T3 irradiadas, para investigación y posibles aplicaciones terapéuticas.

5 Sin embargo, métodos establecidos para el cultivo de células NK también confirman la proliferación de células T e incluso después del empobrecimiento de células T, las células T residuales típicamente aumentan en número después de estimulación, imposibilitando el uso clínico de poblaciones de células expandidas debido a posible enfermedad injerto contra huésped. Esto requiere adicionalmente otra ronda de empobrecimiento de células T antes de la infusión, haciendo que se alargue el tiempo del procedimiento, que este sea costoso e invariable ocasionando una pérdida sustancial de células NK.

10 Para reducir la contaminación de células T después de la expansión, se utilizan protocolos de expansión de NK de células CD56+CD3- purificadas como población inicial para sembrar en cultivos en expansión. Para obtener una fracción muy purificada de células CD56+CD3-, se requiere un procedimiento de purificación de dos etapas: la selección positiva de células CD56 seguido del empobrecimiento de células CD3+ o primero el empobrecimiento de células CD3+ seguido de selección positiva de células CD56. Sin embargo, este procedimiento es costoso e implica una pérdida sustancial de células durante los dos ciclos de purificación. Incluso en cultivos iniciados con células CD56+CD3- sigue habiendo productos NK expandidos contaminados con células T.

20 Los protocolos que solo utilizan citocinas para la expansión de células NK indican un efecto bastante moderado y la necesidad de estímulos adicionales además de citocinas para obtener expansión sustancial (Korean J Lab Med 2009; 29: 89-96, Koehl U *et al.*, Klin Pädiatr 2005; 217: 345-350). Células alimentadoras irradiadas (por ejemplo células mononucleares de sangre periférica, líneas linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (ABV-LCL), la línea celular de leucemia mieloide K562, genéticamente modificada para expresar una forma unida a la membrana de interleucina-15 y el ligando para la molécula 4-1BB coestimuladora) y otras se utilizan habitualmente para la expansión de células NK como un estímulo adicional. Aunque la mayoría de los protocolos de expansión de NK utilizan células CD56+CD3- purificadas como población inicial, algunos protocolos utilizan células mononucleares como la población de siembra inicial en combinación con estroma irradiado o anticuerpos anti-CD3 (Blood, 15 de marzo de 2008, Vol. 111, n.º 6, págs. 3155-3162). Después de la expansión, estos cultivos se contaminan enormemente con células CD3+ y CD3+CD56+ y por lo tanto es preciso purificar las células CD56+CD3- antes de la infusión.

30 Miller y Al (Blood, 1992 80: 2221-2229) obtuvieron una expansión de 30 veces mayor de células NK a los 18 días de cultivo utilizando una fracción enriquecida de progenitores NK y monocitos que comprendía células CD56+CD3- en combinación con células CD14+ purificadas o MNC desprovistas de CD5 y CD8 por selección en matraces de plástico revestidos de anticuerpos. Ve'ronique Decot *et al.* (Experimental Hematology 2010; 38: 351-362) indicaron una expansión de aproximadamente 20 veces mayor de células NK en células B y T irradiadas por empobrecimiento de células mononucleares de T y B y descubrieron que la población contaminante después del empobrecimiento eran principalmente de monocitos. Sin embargo, en este modelo de cultivo, las células alimentadoras y las citocinas fueron necesarias para obtener la amplificación de células NK porque no se observaba expansión en presencia solo de citocinas o solo de células alimentadoras. Por lo tanto, a diferencia de Miller, incluso aunque los monocitos se enriqueciesen en la población de siembra, no se observó expansión de células NK en ausencia de células estromales T y B irradiadas (Decot *et al.*, Exper. Hematology 2010; 38: 351-362).

45 Incluso adicionalmente, aunque las células NK cultivadas *ex vivo* a menudo demuestran una actividad considerable (por ejemplo, citotoxicidad) contra células diana no relacionadas, la actividad contra células de cáncer y tumorales más clínicamente relevantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, a menudo ha sido decepcionante y se han propuesto métodos para potenciar la activación. Zitvogel *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 6.849.452) enseñan la activación *ex vivo* o *in vivo* de células NK por contacto con células dendríticas provocadas. Otros autores han sugerido la potenciación de la activación cultivando células NK con células que carecen de moléculas MHC-I y genéticamente modificadas para expresar IL-15 (Campana *et al.*, Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009011498) o pretratamiento de receptores de células NK con inhibidores de proteasoma (Berg *et al.* Cytotherapy 2009; 11: 341-55). Sin embargo, ninguno de los protocolos ha producido poblaciones de células NK significativamente expandidas capaces de sobrevivir y de expandirse en órganos diana hospedadores apropiados después de trasplante (proliferación homeostática) y la inmunoterapia con células NK proliferadas *ex vivo* está aún limitada por la incapacidad de obtener suficientes cantidades de células NK muy purificadas, funcionalmente competentes, para su uso en protocolos clínicos (véase Bachanova *et al.*, Canc Immunol. Immunother., 2010; 59: 739-44; Guven, Karolinska Institute, 2005; Schuster *et al.*, E. J. Immunology 2009; 34: 2981-90, Bernardini *et al.*, Blood, 2008; 111: 3626-34). Por tanto existe una necesidad de métodos que sean sencillos y rentables para propagar preferencialmente células NK *ex vivo*, como células NK aisladas, o de una población mixta de células mononucleares desprovista o no de células CD3+.

60 Se ha mostrado que la nicotinamida puede modular el destino y la función de las células (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2003/062369, WO 2005/007799, WO 2005/007073, WO 2006/030442, WO 2007/063545 y WO 2008/056368).

Sumario de la invención

En vista de la creciente necesidad de obtener mayor cantidad de células NK terapéuticamente competentes para aplicaciones clínicas, tales como terapia celular para leucemia y otros cánceres, existe una necesidad de métodos mejorados, sencillos y rentables para potenciar la proliferación *ex vivo* y la activación de células destructoras naturales para su uso en el entorno clínico

Por tanto, la expansión de células NK en cultivos *ex vivo* y la potenciación de su funcionalidad después de infusión es crítica para su aplicabilidad clínica en inmunoterapia adoptiva.

La presente invención satisface esta cuestión como se define en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de cultivo *ex vivo* de células destructoras naturales (NK), como se describe en las reivindicaciones, comprendiendo el método el cultivo de una población de células que comprende células NK, con al menos un factor de crecimiento y una concentración eficaz, un tiempo de exposición eficaz y una duración eficaz de exposición de nicotinamida, en el que el cultivo de las células NK con el al menos un factor de crecimiento y la concentración eficaz, un tiempo de exposición eficaz y una duración eficaz de la nicotinamida produce al menos uno de lo siguiente:

- (a) expresión elevada de CD62L en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (b) respuesta de migración elevada en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (c) asentamiento elevado y retención *in vivo* en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (d) mayor proliferación en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida; y
- (e) actividad citotóxica aumentada en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida.

De acuerdo con otro aspecto adicional de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células NK como se define en las reivindicaciones cultivadas de acuerdo con el método de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto adicional de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células NK caracterizada por al menos uno de lo siguiente:

- (a) expresión elevada de CD62L en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (b) respuesta de migración elevada en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (c) asentamiento elevado y retención *in vivo* en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (d) mayor proliferación en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (e) actividad citotóxica aumentada en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
- (f) una proporción reducida de células CD3+ con respecto a células CD56+/CD3- en comparación con una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida.

De acuerdo con otro aspecto adicional de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células NK caracterizada por un asentamiento, una implantación y una retención potenciados, cuando se trasplanta, en el que la infusión de al menos 15×10^6 de la población de células NK en un hospedador de ratón SCID irradiado, produce al menos un 25 % de células NK procedentes de donante en un tejido linfático hospedador, según se detecta por inmunodetección y citometría de flujo, 4 días después de la infusión

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células NK se caracteriza adicionalmente por la expresión de CD62L en al menos el 30 % de dicha población de células en el momento de la infusión, según se detecta por inmunodetección y citometría de flujo. De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, la población de células NK se caracteriza adicionalmente por una proporción de células CD3+ con respecto a células CD56+/CD3- igual o menor que 1:100 en el momento de la infusión.

De acuerdo con otro aspecto adicional de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células NK de la invención.

De acuerdo con otro aspecto adicional de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento o prevención de una infección vírica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células NK de la invención cultivada *ex vivo*.

5 De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento o prevención de la enfermedad injerto contra huésped en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células NK de la invención cultivada *ex vivo*.

10 De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección autoinmune en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células NK de la invención cultivada *ex vivo*.

15 De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección leucémica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células NK de la invención cultivada *ex vivo*.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células NK es autóloga o alogénica para el sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la administración es por infusión sencilla o infusiones repetidas de la población de células NK.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el sujeto va a tratarse con un factor de crecimiento simultáneamente con la administración de la población de células NK.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un factor de crecimiento es IL-2 o IL-2 e IL-15.

De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de transducción de células NK cultivadas *ex vivo* con un exógeno, comprendiendo el método:

35 (a) cultivar *ex vivo* una población de células NK de acuerdo con el método de la invención; y
(b) transducir la población cultivada de células NK con el exógeno.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un factor de crecimiento es IL-2, el tiempo de exposición es desde la siembra de la población de células que comprende células NK, la duración de la exposición es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 semanas y la concentración de la nicotinamida es de 5 mM.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la concentración eficaz de la nicotinamida es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 5,0 mM o de aproximadamente 7,5 mM.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el tiempo de exposición es desde la siembra a aproximadamente 5 semanas después del cultivo, o de aproximadamente 1 hora después de la siembra a aproximadamente 3 semanas después del cultivo, o de aproximadamente 24 horas después de la siembra a aproximadamente 3 semanas después del cultivo, o de aproximadamente 2 días después de la siembra a aproximadamente 2 semanas después del cultivo, o desde la siembra de la población de las células que comprende dichas células NK en dicho cultivo.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la duración de exposición es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 semanas, o de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 4 semanas, o de aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 semanas, o de aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente un día, de aproximadamente dos días, de aproximadamente tres días, de aproximadamente cinco días, de aproximadamente 10 días, de aproximadamente 12 días, de aproximadamente 15 días, d aproximadamente 17 días o de aproximadamente 20 días.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células que comprende dichas células NK se obtiene de una fuente seleccionada del grupo que consiste en sangre de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica.

65

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células que comprende las células NK es una población de células heterogénea que comprende una fracción de células NK y una fracción de células CD3+.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la fracción de células CD3+ es mayor que dicha fracción de células NK.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la fracción de células NK es mayor que dicha fracción de células CD3+.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células que comprende las células NK es una población de células mononucleares o nucleares totales desprovista de células CD3+.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células que comprende las células NK es una población de células mononucleares o nucleares desprovista de células CD3+ y CD19+.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la población de células que comprende las células NK es una población de células NK no seleccionada.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las células NK comprenden células CD56+CD3-.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las células NK comprenden células CD56+CD16+CD3-.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo de la población de células que comprende las células NK se efectúa sin una capa alimentadora o células alimentadoras.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un factor de crecimiento comprende un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en SCF, FLT3, IL-2, IL-7, IL-15, IL-12 e IL-21.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un factor de crecimiento es IL-2 o IL-2 e IL-15.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un factor de crecimiento es solamente IL-2.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la expresión de CD62L se determina mediante un método seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo, inmunodetección, amplificación cuantitativa de ADNc e hibridación.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la expresión de CD62L se determina por separación de células activadas por fluorescencia (FACS, acrónimo de *fluorescent activated cell sorting*).

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la expresión de CD62L se determina utilizando anticuerpos monoclonales fluorescentes anti CD62L humanos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la respuesta de migración elevada se determina mediante un ensayo de trans migración o de cierre de huecos.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la respuesta de migración elevada se determina mediante un ensayo de transmigración.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la transmigración se ensaya en respuesta a estimulación con SDF1.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el asentamiento elevado y la retención *in vivo* se determinan por FACS, expresados como porcentaje de células NK implantadas en órganos diana después de la infusión.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el órgano diana se selecciona del grupo que consiste en bazo, médula ósea y ganglios linfáticos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el asentamiento y la implantación se determinan aproximadamente de 1 día a aproximadamente 2 semanas después de infusión de células NK.

65

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el índice de proliferación se determina por ensayos clonogénicos, ensayos mecánicos, ensayos metabólicos y ensayos de proliferación directa.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el índice de proliferación se determina por análisis FACS de porcentaje de células CD56+CD3- y se expresa como un factor de aumento a lo largo del tiempo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la actividad citotóxica se ensaya utilizando un ensayo de destrucción celular.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las células diana del ensayo de destrucción celular son una línea de células de cáncer, células de cáncer primario, células de tumor sólido, células leucémicas o células infectadas por virus.

Breve descripción de los dibujos

15 En el presente documento se describen algunas realizaciones de la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos acompañantes. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, cabe destacar que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y con fines de un análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción junto con los dibujos pone de manifiesto a los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

20

En los dibujos:

25 las FIGs. 1A y 1B son histogramas que muestran la proliferación dependiente de la dosis de una fracción de células NK purificada, procedente de sangre cordón umbilical, después de cultivo en ausencia (citocinas) o en presencia de concentraciones crecientes de nicotinamida ("NAM" de 0,5 a 5 mM, como se indica). Los cultivos se iniciaron con células NK de sangre de cordón umbilical purificadas en perlas inmunomagnéticas para fenotipo CD56+ y mantenidas con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) durante hasta 3 semanas. La FIG. 1ª muestra la proliferación (factor de aumento o "expansión celular" con respecto al día 0, inicio de los cultivos) de las células NK CD56+ al cabo de 14 días de cultivo. La FIG. 1B muestra el factor de aumento de células NK CD56+ después de 3 semanas de cultivo. Obsérvese el aumento drástico dependiente de la dosis en el componente de células CD56+ de los cultivos tratados con nicotinamida, que continua durante todo el periodo de cultivo, en comparación con los controles (citocinas).

30

35 las FIGs. 2A-2C son histogramas que muestran la proporción de diferentes subconjuntos de linfocitos, agrupados según los marcadores de superficie celular (CD56, CD45, CD3) en cultivos iniciados con la fracción completa de células mononucleares procedentes de sangre de cordón umbilical mantenida en ausencia (citocinas) o en presencia de nicotinamida. Los cultivos se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15), con o sin concentraciones crecientes (de 0,5 a 5 nM) de nicotinamida ("NAM") durante 3 semanas, reaccionaron con anticuerpos específicos para marcadores de superficie y después se analizaron por FACS para fenotipos específicos. FIG. 2A = células CD56+/CD45+; (células NK y NK-T); FIG. 2B = células (NK) CD56+/CD3- ; FIG. 2C = células (T) CD3+/CD56-. Obsérvese el aumento dependiente de la dosis en la población de células NK (fenotipo CD56+/CD45+ y CD56+/CD3-), y la disminución concomitante en la población de linfocitos T (fenotipo CD3+/CD56-) en los cultivos tratados con nicotinamida;

40

45 la FIG. 3 es un histograma que muestra la proliferación de la fracción de células CD56+ purificadas, procedente de médula ósea purificada después de cultivo en ausencia (citocinas) o en presencia de nicotinamida 2,5 mM. Los cultivos se iniciaron con células (NK y NK-T) CD56+ purificadas de médula ósea en perlas inmunomagnéticas y mantenidas con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15), durante hasta 3 semanas con (sombreado oscuro) o sin (citocinas, sombreado claro) nicotinamida 2,5 mM. Obsérvese el aumento drástico en el componente de células NK CD56+CD3- de los cultivos tratados con nicotinamida, que continúa durante todo el periodo de cultivo, en comparación con los controles (citocinas, sombreado claro);

50

55 las FIGs. 4A y 4B son histogramas que muestran la proliferación de células NK frente a NKT de médula ósea a partir de células CD56+ de médula ósea purificadas después de cultivo en ausencia (citocinas) o en presencia de nicotinamida. Los cultivos se iniciaron con células CD56+ procedentes de médula ósea purificadas en perlas inmunomagnéticas, y se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) durante 3 semanas, con o sin nicotinamida 2,5 mM. Las FIGs. 4A y 4B representan los resultados de dos experimentos ejemplares independientes. Obsérvese el aumento drástico en la proporción de células NK CD56+CD3- (sombreado oscuro) y la reducción del componente de células NKT CD56+CD3- (sombreado claro) de los cultivos tratados con nicotinamida en comparación con controles (citocinas), independientemente de la proporción inicial de células NK frente a NKT en las células sembradas;

60

65 la FIG. 5 es un histograma que muestra el porcentaje aumentado de células que presentan el fenotipo de células NK CD56+CD16+ a partir de células CD56+ de médula ósea purificadas después de cultivar en ausencia (citocinas) o en presencia de nicotinamida. Los cultivos se iniciaron con células CD56+ purificadas en perlas inmunomagnéticas procedentes de médula ósea como se describe en las FIGs. 4A y 4B y mantenidas con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) con o sin nicotinamida 2,5 mM durante hasta 3 semanas. Obsérvese el aumento en la proporción de NK CD56+CD16+ a los 14 días (sombreado claro), continuando incluso hasta el día

21 (sombreado oscuro) en los cultivos tratados con nicotinamida en comparación con la reducción de la fracción de células CD45+CD16+ en los controles (citocinas);

las FIGs. 6A-6C son histogramas que muestran el efecto del cultivo a corto plazo con nicotinamida sobre la proliferación de subconjuntos de células NK y NKT de médula ósea. Los cultivos se iniciaron con células CD56+ purificadas con perlas inmunomagnéticas procedentes de médula ósea y mantenidas con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) durante 7 días en ausencia (citocinas) o en presencia de concentraciones crecientes de nicotinamida ("NAM", 1 mM, 2,5 mM y 5 mM) y reaccionaron con anticuerpos específicos para marcadores de superficie y se analizaron por FACS para determinar fenotipos específicos. La FIG. 6A representa el porcentaje de la población de células NK CD56+CD3- en función de la nicotinamida; la FIG. 6B representa la reducción en la población de células NKT CD56+CD3+ en función de la nicotinamida en cultivo, y la FIG. 6C representa la proliferación del subconjunto de células NK CD56+CD16+ en función de la nicotinamida, en comparación con controles (citocinas);

la FIG. 7 es un histograma que muestra la reducción en el subconjunto de células NK inhibitoras CD56+/NKG2A+ de células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas cultivadas durante tres semanas en presencia de concentraciones crecientes (de 1,0 a 5 mM) de nicotinamida. Las células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas con perlas inmunomagnéticas se cultivaron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) en presencia o en ausencia (citocinas) de concentraciones crecientes de nicotinamida ("NAM") (de 1,0 a 5 mM). Después de tres semanas, las células reaccionaron con anticuerpos específicos para marcadores de superficie y se analizaron por FACS para determinar los fenotipos CD56+/NKG2A+. La reducción drástica de células CD56+NKG2A+ en los cultivos tratados con nicotinamida, en comparación con los controles (citocinas), sugiere una activación potenciada de células NK con exposición a nicotinamida;

la FIG. 8A es un histograma que muestra el potencial de migración potenciado de células NK purificadas procedentes de sangre de cordón umbilical, cultivadas con concentraciones crecientes de nicotinamida. Las células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas con perlas inmunomagnéticas se cultivaron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) en ausencia (citocinas) o en presencia de nicotinamida 2,5 mM o 5 mM. Después de dos semanas las células se ensayaron con respecto a la migración *ex vivo* en respuesta a SDF 250 ng/ml en un ensayo de transmigración (*Transwell*). Las células en la cámara inferior se contaron por FACS. La migración potenciada, en presencia (sombreado oscuro) y en ausencia (sombreado claro) de SDF (250 ng/ml) en comparación con los controles (citocinas), sugiere motilidad potenciada y migración dirigida de células NK por la nicotinamida;

la FIG. 8B es una tabla que muestra el aumento en la expresión de receptores migratorios (CXCR4), de adhesión (CD49e) y transporte (CD62L) en células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical cultivadas durante tres semanas en presencia de nicotinamida 2,5 o 5 mM. Los cultivos se iniciaron con células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas con perlas inmunomagnéticas y se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) o citocinas más nicotinamida (2,5 y 5 mM). Después de 3 semanas, las células cultivadas reaccionaron con anticuerpos específicos para detectar marcadores de superficie específicos y después se monitorizaron por FACS. Obsérvese la expresión drásticamente potenciada de CXCR4 y CD62L, y la expresión elevada de CD49e en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con controles (únicamente citocinas);

la FIG. 9 es un histograma que muestra el potencial de destrucción potenciado de células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical cultivadas con concentraciones crecientes de nicotinamida. Las células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas con perlas inmunomagnéticas se cultivaron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15), con (sombreado oscuro) o sin (sombreado claro) nicotinamida 2,5 mM. Después de 2 semanas, el análisis FACScalibur indicó que todas las células tenían un fenotipo CD56+/CD3-. Las células NK de sangre de cordón umbilical se ensayaron para determinar el potencial de destrucción *ex vivo* con 5×10^3 células diana K562 por ensayo, a una proporción de 5:1, 10:1 y 20:1 de células NK por célula diana (E:D). La muerte de células K562 se monitorizó por FACS como un porcentaje de células marcadas con CFSE positivas a PI. La destrucción potenciada de células diana en comparación con controles (citocinas) y con células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical no cultivadas, recientes (sin sombreado), sugiere contundentemente la activación potenciada del potencial destructor de las células NK mediante nicotinamida;

la FIG. 10 es un histograma que ilustra la expansión de células NK de sangre periférica humana en un cultivo con nicotinamida de más de tres semanas. Las células NK de sangre periférica preparadas por empobrecimiento de células T (CD3+ o CD3+CD19+) de la fracción de células mononucleares de unidades recientes [aislamiento Midi-MACS (columna de separación MACS, Cat. N.º 130-042-901) o cóctel de empobrecimiento de células CD3+ Humanas RosetteSep (Tecnologías Stem Cell RosetteSep, Cat. N.º 155661)] se caracterizaron por análisis FACS y se cultivaron en Bolsas VueLife en presencia de las concentraciones de nicotinamida indicadas (sombreado claro NAM 2,5 y sombreado oscuro NAM 5 mM). Control = solo citocinas (NAM 0, sin sombreado). El medio de cultivo contenía MEM, Suero Humano (10 % v/v) y citocinas (IL-15 20 ng/ml e IL-2 50 ng/ml o solo IL-2 50 ng/ml). El volumen del cultivo se duplicó después de 1 y 2 semanas y las células se contaron y tiñeron por análisis FACS después de 7, 14 y 21 días. Obsérvese la enorme expansión aumentada (factor de aumento con respecto al día 0) en presencia de nicotinamida, mientras que los controles solo con citocinas (NAM 0) mostraron tendencia a perder capacidad de auto-renovación a lo largo del tiempo;

la FIG. 11 es un histograma que muestra el efecto de la nicotinamida y la densidad de siembra en células NK de sangre periférica humana en un cultivo de más de tres semanas. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de células T (CD3+ o CD3+CD19+) de las células mononucleares como se

detalla en la FIG. 10, y sembrando a 2, 5 o 10×10^5 células/ml con 10 ml en cada bolsa de cultivo. Después, las células se expandieron en presencia de concentraciones (NAM 2,5, sombreado claro y NAM 5 mM, sombreado oscuro) de nicotinamida indicadas, o solo de citocinas (citocinas, sin sombreado). La potenciación de la proliferación de células NK por nicotinamida es evidente a todas las densidades de siembra;

la FIG. 12 es un histograma que muestra los porcentajes de células NK CD56+CD3- en cultivos de 21 días de células NK de sangre periférica humana. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de células T (CD3+ o CD3+CD19+) de las células mononucleares como se detalla en la FIG. 10, y sembrando a 5×10^5 células/ml con 10 ml en cada bolsa de cultivo. Después, las células se cultivaron en presencia de concentraciones (NAM 2,5 y NAM 5 mM) indicadas de nicotinamida, o solo de citocinas (citocinas). Obsérvese que aunque los porcentajes de células NK eran mayores en todos los grupos después de 21 días en cultivo, en los cultivos expuestos a nicotinamida los porcentajes de NK son incluso mayores que en los cultivos de control;

las FIGs. 13A-13B son histogramas que muestran la expresión aumentada del receptor migratorio CD62L en cultivos de células NK de sangre periférica humana expuestas a nicotinamida. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de células T (CD3+ o CD3+CD10+) de las células mononucleares como se detalla en la FIG. 10 y expandidas en presencia de concentraciones (NAM 2,5 y NAM 5 mM) indicadas de nicotinamida, o solo de citocinas (citocinas). Después de 7 (13A), 15 (13B) y 21 (13C) días, las células cultivadas se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos para los marcadores de superficie especificados, y después se monitorizaron por FACS. Obsérvese la expresión drásticamente potenciada de CD62L, aumentando con la duración de la exposición, en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con controles (solo con citocinas);

las FIGs. 14A-14B son histogramas que muestran la inhibición de la proliferación de monocitos y granulocitos en cultivos de células NK de sangre periférica humana expuestas a nicotinamida. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de células T (CD3+ o CD3+CD19+) de las células mononucleares como se detalla en la FIG. 10, y se expandieron en presencia de concentraciones (NAM 2,5 y NAM 5 mM) de nicotinamida indicadas, o solo de citocinas (citocinas). Después de 2 semanas, las células cultivadas se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos para el marcador de monocitos CD14 (FIG. 14A) o para el marcador de granulocitos CD15 (FIG. 14) y después se monitorizaron por FACS. Obsérvese la reducción drásticamente potenciada en células CD14+ o CD15+ en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con controles (solo citocinas);

las FIGs. 15A-15D son histogramas que ilustran el potencial de destrucción potenciado de células NK cultivadas con nicotinamida de células NK de sangre periférica humana expuestas a nicotinamida. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de CD3+ o CD3+CD19+ de las células mononucleares como se detalla en la FIG. 10, y se expandieron en presencia de concentraciones de nicotinamida (NAM 2,5, sombreado claro y NAM 5 mM, sombreado oscuro) indicadas, o solo de citocinas (citocinas, sin sombreado). El potencial destructor de las células NK de sangre periférica se ensayó *ex vivo* con células diana K562 o BL2(15A), de leucemia bifenotípica primaria (15B y 15C) y de cáncer de colon Colo205 (15D) a una proporción de E:D de 1:1, 2,5:1, 5:1 o 10:1 células NK por célula diana, como se indica. La muerte de células diana de las líneas celulares se monitorizó por FACS como un porcentaje de células doblemente marcadas positivas a CFSE y positivas a PI. La muerte de células diana de leucemia primaria se monitorizó por FACS como reducción en los porcentajes de células diana marcadas con CFSE. La destrucción potenciada de células diana en comparación con controles cultivados (solo citocinas, NAM 0, sin sombreado) y células NK no cultivadas, recientes (control, entramado) sugiere contundentemente la activación del potencial de destrucción de células NK por nicotinamida;

la FIG. 16 es un histograma que muestra funcionalidad *in vivo* aumentada (asentamiento e implantación) de células NK expandidas en presencia de nicotinamida. Las células NK de sangre periférica se prepararon por empobrecimiento de las células mononucleares CD3+ o CD3+CD19+ como se detalla en la FIG. 10 y se expandieron en presencia de concentraciones de nicotinamida (NAM 2,5 nM, sombreado claro; NAM 5 nM, sombreado oscuro) indicadas, o solo de citocinas (NAM 0, sin sombreado). Después de 2-3 semanas en cultivo, 15×10^6 células NK de cada grupo experimental se infundieron en ratones NOD/SCID irradiados (350 Rad). Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infusión y las muestras de bazo, médula ósea y sangre periférica se analizaron con respecto a la implantación de células NK (CD45+CD56+) humanas. Obsérvese el asentamiento/retención/implantación *in vivo* significativamente elevado de células NK cultivadas con nicotinamida en comparación con lo observado en células NK cultivadas sin nicotinamida;

la FIG. 17 es un histograma que muestra la proliferación dependiente de la dosis de la fracción purificada de células NK CD56+/-, procedentes de sangre de cordón umbilical cuando se cultivan en ausencia (citocinas) o en presencia de concentraciones crecientes de nicotinamida (NAM, 1 a 7,5 mM). Los cultivos se iniciaron con células NK de sangre de cordón umbilical purificadas en perlas inmunomagnéticas para fenotipo CD56+ y se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) durante hasta 3 semanas. La FIG. 17 muestra la proliferación (factor de aumento, con respecto al día 0, inicio de los cultivos) de las células NK CD56+ el día 7 (sombreado), 14 (sombreado claro) y 21 (sombreado oscuro) en cultivo. Obsérvese el aumento drástico dependiente de la dosis en la expansión de los cultivos tratados con nicotinamida, continuando durante todo el periodo de cultivo, en comparación con los controles (citocinas);

las FIGs. 18A y 18B muestran la inhibición de la proliferación de células T (CD3+) y NKT (CD3+CD56+) en cultivos iniciados con sangre periférica parcialmente desprovista de CD3- y mantenidos en ausencia (citocinas, 0 NAM, sin sombreado) o en presencia de nicotinamida. Los cultivos se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15), con o sin concentraciones crecientes (2,5, sombreado oscuro; 5 mM, sombreado claro y 7,5 mM, sombreado muy claro) de nicotinamida durante 3 semanas, reaccionaron con anticuerpos específicos para

marcadores de superficie (56FITC y 3APC) y se analizaron por FACS (18B) para fenotipos específicos. Obsérvese la reducción drástica de células T CD3+ y de células NKT CD3+CD56+ en cultivos NK expuestos a nicotinamida;

las FIGs. 19A y 19B muestran la potenciación de la expresión del receptor de transporte CD62L con nicotinamida.

la FIG. 19A es un histograma que muestra los niveles de expresión del receptor de transporte CD62L en células CD56+ purificadas de sangre periférica antes (sombreado muy claro) y después de la activación en cultivo con IL-2, expuestas durante 3 semanas de cultivo a una concentración de 2,5 (sombreado claro) y 5 (sombreado oscuro) mM de nicotinamida, en comparación con controles solo con citocinas (0 "NAM", sin sombreado). La FIG. 19B es un análisis FACS de la expresión de CD62L, en células CD56+ de sangre periférica purificada, cultivadas en nicotinamida (2,5-7,5 mM), o controles (NAM 0), durante 3 semanas. Obsérvese la expresión drásticamente potenciada de CD62L en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con controles (solo citocinas);

la FIG. 20 es un histograma que muestra el efecto de la nicotinamida sobre la proliferación (factor de aumento) de células CD56+ purificadas de fracciones de células mononucleares procedentes de sangre periférica por empobrecimiento de CD3 seguido por selección de células CD56+. Las células CD56+ purificadas se sembraron en cultivo (IL-2, IL-15 y Fit-3 sin o con nicotinamida 2,5 y 5 mM) y con estroma irradiado procedente de células mononucleares de sangre periférica de la misma unidad de sangre (Cit+Irr, NAM 2,5+Irr y NAM 5+Irr). La proporción entre las células de sangre periférica irradiadas y las células CD56+ seleccionadas fue de 10:1. Obsérvese la proliferación drásticamente potenciada en las tratadas con nicotinamida en comparación con los controles (solo citocinas);

la FIG. 21 es un histograma que muestra el efecto de la nicotinamida sobre la expresión de CXCR4 en células CD56+ en cultivos tratados con citocinas y células de estroma irradiadas, como se describe en la FIG. 20;

la FIG. 22 es un histograma que muestra el efecto del cultivo con nicotinamida sobre la expresión de CD62L en células CD56+ en cultivos tratados con citocinas y células de estroma irradiadas como se describe en la FIG. 20;

la FIG. 23 es un histograma que muestra el efecto del cultivo con nicotinamida sobre el potencial destructor ex vivo de células CD56+ de células diana K562 a las proporciones E:D de 1:1, 2,5:1 y 5:1 de células CD56+ por célula diana. La muerte de la célula diana se monitorizó por FACS como un porcentaje de células K562 marcadas con CFSE positivas a PI. La destrucción potenciada de células diana, con células cultivadas en las concentraciones de nicotinamida (NAM 2,5+Irr, sombreado claro; y NAM 5+Irr, sombreado oscuro) indicadas, en comparación con el control (solo citocinas, NAM 0+Irr, sin sombreado) sugiere contundentemente activación potenciada del potencial destructor de células NK por nicotinamida, no relacionada con los efectos de las células irradiadas.

Descripción de realizaciones de la invención

La presente invención se refiere a métodos de propagación de una población de células destructoras naturales (NK), aunque al mismo tiempo, mantenimiento o potenciando la función de las células *ex vivo* y/o *in vivo*. En una realización, el cultivo *ex vivo* de células NK con nicotinamida y factores de crecimiento de células NK, facilita la producción de poblaciones de células NK para su uso como una preparación terapéutica de células cultivadas *ex vivo*, que incluye una población propagada de células NK funciones, en la que la proliferación de células CD3+ está inhibida mientras que la proliferación de células NK está preferentemente potenciada. Específicamente en este sentido, la presente invención puede utilizarse para proporcionar fuertes poblaciones de células NK funcionales, que pueden utilizarse para aplicaciones en trasplantes de células para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades y en la generación de células NK adecuadas para manipulaciones genéticas, que pueden utilizarse para terapia génica celular. Adicionalmente, como aplicaciones no limitantes pueden incluirse el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (por ejemplo, en reconstitución de médula ósea), inmunoterapia adoptiva en trasplante alogénico y autólogo, tratamiento de enfermedades autoinmunes, terapia de combinación con agentes sensibilizantes y transferencia de genes en células NK. La presente invención también se refiere a preparaciones de células NK útiles para la transfusión y a artículos de fabricación para la preparación de las mismas.

Los principios y funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los ejemplos y a las descripciones acompañantes.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles o a los ejemplos expuestos en la siguiente descripción. La invención puede tener otras realizaciones o llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras.

Las células destructoras (en lo sucesivo el presente documento indicadas con la abreviatura "NK"), son células linfoides que participan en reacciones inmunitarias. Estas células tienen diversas funciones, especialmente la destrucción de células tumorales, células que sufren transformación oncogénica y otras células anómalas en un organismo vivo, y son componentes importantes de los mecanismos de vigilancia inmunológicos innatos. Las células NK exhiben actividad citotóxica no HMC restringida, espontánea contra células tumorales e infectadas por virus, y actúan como mediadoras en la resistencia a infecciones víricas y al desarrollo de cáncer *in vivo*. Por tanto, los métodos para aumentar de un modo eficaz el número de células NK pueden ser útiles para el tratamiento de

tumores y para la eliminación de células infectadas con virus que se considera que son posibles fuentes de generación de tumores.

5 Por tanto, el desarrollo de protocolos de calidad clínica (por ejemplo, citocinas mínimas, de capa no estromal) para expandir de un modo eficaz el número de células NK viables y potenciar de un modo eficaz su función y probabilidad de asentamiento en ganglios linfáticos y su proliferación homeostática *in vivo* después de infusión, podría mejorar el éxito de la inmunoterapia adoptiva con células NK para el tratamiento de tumores sólidos, neoplásicas hematopoyéticas, trastornos víricos y autoinmunes y similares.

10 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la exposición *ex vivo* de células NK a la nicotinamida por encima de una determinada concentración, como se detalla más adelante en el presente documento, durante el cultivo, potencia de un modo eficaz la proliferación y/o funcionalidad de células NK funcionalmente competentes, y da como resultado una reducción significativa en la fracción de células T del cultivo. Como tal, en una realización de la misma, la presente invención proporciona condiciones de cultivo clínicamente apropiadas, que tienen la capacidad de inducir de un modo eficaz la proliferación y/o función de células NK funcionalmente maduras *ex vivo* e *in vitro*, sin inducción concomitante de proliferación de células no NK (por ejemplo CD3+).

20 Por tanto, de acuerdo con un aspecto de una realización de la presente invención, se proporciona un método de cultivo *ex vivo* de células destructoras naturales (NK), comprendiendo el método el cultivo de una población de células que comprende células NK, con al menos un factor de crecimiento y una concentración eficaz, un tiempo de exposición eficaz y una duración de exposición de nicotinamida eficaz, en el que el cultivo de las células NK con el al menos un factor de crecimiento y la concentración eficaz, tiempo de exposición eficaz y duración de la nicotinamida eficaz, produce al menos uno de lo siguiente:

- 25 (a) expresión elevada de CD62L en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
 (b) respuesta de migración elevada en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
 (c) asentamiento elevado y retención *in vivo* en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida;
 30 (d) mayor proliferación en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida; y
 (e) actividad citotóxica aumentada en comparación con células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otro modo idénticas con menos de 0,1 mM de nicotinamida.

35 Como se utiliza en el presente documento, la expresión destructoras naturales (NK) se refiere a linfocitos granulares grandes implicados en la respuesta inmunitaria innata. Funcionalmente, las células NK exhiben actividad citolítica contra diversas dianas mediante exocitosis de gránulos citoplasmáticos que contienen diversas proteínas, incluyendo las proteasas perforina y granzima. La destrucción se desencadena mediante un proceso no fagocítico, dependiente de contacto, que no requiere una sensibilización previa a un antígeno. Las células NK humanas se caracterizan por la presencia de marcadores de superficie celular CD16 y CD56 y por la ausencia del receptor de células T (CD3). Las células NK procedentes de médula ósea humana se caracterizan adicionalmente por el fenotipo CD2+CD16+CD56+CD3-, que contiene adicionalmente la cadena zeta del receptor de células T [zeta(ζ)-TCR], y a menudo se caracterizan por NKp46, NKp30 o NKp44. Las células no NK, tales como las células NKT o CD8NKT, poseen características y marcadores de superficie celular tanto de células T como de células NK. En una realización, el método de la presente invención se emplea para la propagación *ex vivo* de células NK maduras a partir de una población de células. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula NK madura" se define como una célula NK comprometida, que tiene marcadores de superficie y función de células NK característicos y que carece del potencial de diferenciarse adicionalmente. Como se utiliza en el presente documento, las células NK maduras incluyen, pero sin limitación, células CD56^{bright} que pueden proliferar y producir abundantes citocinas, células CD56^{dim}, que presentan una fuerte citotoxicidad, células CD56^{bright}CD94^{high} y CD56^{dim}CD94^{high}. En otra realización se propagan células progenitoras NK, o poblaciones mixtas de células progenitoras NK y células NK maduras. La expresión en la superficie celular de CD56, CD3, CD16, CD94 y de otros marcadores puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis FACS o mediante técnicas de tinción inmunohistoquímica.

55 Como se utiliza en el presente documento, el término "progenitor" se refiere a una célula inmadura capaz de dividirse y/o diferenciarse en una o más células efectoras maduras. Los progenitores de linfocitos incluyen, por ejemplo, células madre hematopoyéticas pluripotentes capaces de originar células maduras de los linajes de célula B, célula T y NK. En el linaje de célula B (es decir, en la ruta de desarrollo que origina las células B maduras), las células progenitoras también incluyen células pro-B y células pre-B, caracterizadas por una reordenación y expresión de genes de inmunoglobulina. En los linajes de células T y NK, las células progenitoras también incluyen progenitores de células T/NK bipotenciales procedentes de médula ósea [por ejemplo, células D34(+)/CD45RA(hi)CD7(+)] y CD34(+)/CD45RA(hi)Lin(-)CD10(+)], así como células progenitoras intratímicas, incluyendo timocitos doble negativos (con respecto a CD4 y CD8) y doble positivos (linaje de células T) y progenitores de células NK comprometidas. Los progenitores hematopoyéticos incluyen CD34+ y progenitores tempranos tales como células CD133+, CD34+CD38- y CD3+Lin-.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “*ex vivo*” se refiere a un proceso en el que las células se retiran de un organismo vivo y se propagan fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Como se utiliza en el presente documento, la expresión “*in vitro*” se refiere a un proceso mediante el cual se cultivan células que se sabe que se propagan solamente *in vitro*, tal como diversas líneas celulares.

La expansión *ex vivo* de células NK puede efectuarse, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, proporcionando células NK *ex vivo* con condiciones para que se produzca la proliferación celular y el cultivo *ex vivo* de las células NK con una fracción de nicotinamida, mediante lo cual se propaga *ex vivo* la población de células NK.

Como se utiliza en el presente documento “cultivo” incluye proporcionar las condiciones químicas y físicas (por ejemplo, temperatura, gas) que se requieren para el mantenimiento de células NK, y factores de crecimiento. En una realización, el cultivo de las células NK incluye proporcionar las células NK en condiciones para que se produzca proliferación. Como ejemplos de condiciones químicas que pueden soportar la proliferación de células NK, se incluyen, pero sin limitación, tampones, nutrientes, suero, vitaminas y antibióticos, así como citocinas y otros factores de crecimiento que se proporcionan típicamente en el medio de crecimiento (es decir, cultivo). En una realización, el medio de cultivo NK incluye MEM α , que comprende FCS al 10 % o CellGro SCGM (Cell Genix) que comprende suero humano al 5 %/Reemplazo de FBs LiferCell[®] (Lifeblood Products). Otros medios adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, medio de Glasgow (Gibco Carlsbad CA), medio RPMI (Sigma-Aldrich, St Louis MO) o DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Se observará que muchos de los medios de cultivo contienen nicotinamida como un complemento de vitamina, por ejemplo, MEM α (nicotinamida 8,19 μ M), RPMI (nicotinamida 8,19 μ M), DMEM (nicotinamida 32,78 μ M) y medio de Glasgow (nicotinamida 16,39 μ M), sin embargo, los métodos de la presente invención se refieren a nicotinamida añadida de manera exógena que complementa cualquier nicotinamida incluida en la fórmula del medio, o que resulta de un ajuste global de las concentraciones de los componentes del medio.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el cultivo de células NK con factores de crecimiento comprende proporcionar a las células nutrientes y al menos un factor de crecimiento. En algunas realizaciones el al menos un factor de crecimiento incluye citocinas y/o quimiocinas, tales como, pero sin limitación, factor de células madre (SCF, *stem cell factor*), ligando FLT3, interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-21 (IL-21). Se contempla el uso de otras citocinas y factores de crecimiento, por ejemplo, la adición de IL-1, TNF- α , etc. Las citocinas y otros factores de crecimiento se proporcionan típicamente en concentraciones que varían de 0,5-100 ng/ml o 1,0-80 ng/ml, más típicamente 5-750 ng/ml, incluso más típicamente 5,0-50 ng/ml (pudiendo contemplarse hasta 10X dichas concentraciones), y se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, en Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA. En una realización, el al menos un factor de crecimiento es IL-2. En otra realización, el factor de crecimiento es IL-15. En otra realización más, las células NK se cultivan con IL-2 e IL-15.

Además, se apreciará en este sentido que continuamente se descubren nuevas citocinas, algunas de las cuales pueden encontrar usos en los métodos de la proliferación de células NK de la presente invención. Para aplicaciones en las que se introducen (o reintroducen) células en un sujeto humano, a menudo se prefiere utilizar formulaciones asépticas, tales como el medio aséptico AIM V.^{RTM} para el cultivo de linfocitos o el medio MARROWMAX.^{RTM} para médula ósea. Dichas formulaciones de medios y complementos se encuentran disponibles en fuentes comerciales tales como Invitrogen (GIBCO) (Carlsbad, Calif). Los cultivos pueden complementarse con aminoácidos, antibióticos y/o con citocinas para promover la viabilidad, proliferación, funcionalidad y/o supervivencia óptimas.

De acuerdo con una realización, las células se cultivan con factores de crecimiento y nicotinamida. Como se usa en el presente documento, la expresión “fracción de nicotinamida” se refiere a nicotinamida. Los derivados, análogos y metabolitos de nicotinamida pueden explorarse y evaluarse con respecto a sus efectos sobre la proliferación de NK *ex vivo* en cultivo, mediante la adición de NK a los cultivos mantenidos como se describe a continuación en el presente documento, adición a ensayos funcionales tales como ensayos de destrucción y motilidad (véase la sección Ejemplos) o en protocolos de exploración automatizados diseñados para ensayos de alto rendimiento bien conocidos en la materia.

Como se utiliza en el presente documento, la frase “análogo de nicotinamida” se refiere a cualquier molécula que se sabe que actúa de manera similar a la nicotinamida en los ensayos anteriormente mencionados o similares. Como ejemplos representativos de análogos de nicotinamida pueden incluirse, sin limitación, benzamida, nicotinatioamida (el análogo tiol de la nicotinamida), ácido nicotínico y ácido α -amino-3-indolpropiónico.

La frase “derivado de nicotinamida” se refiere adicionalmente a cualquier derivado estructural de la propia nicotinamida o de un análogo de nicotinamida. Los ejemplos de dichos derivados incluyen, sin limitación, benzamidas sustituidas, nicotinamidas y nicotintioamidas sustituidas y nicotinamidas y nicotintioamidas N sustituidas, 3-acetilpiridina y nicotinato de sodio.

La fracción de nicotinamida de la invención es la nicotinamida.

Como se utiliza en el presente documento, la frase “concentración eficaz” de nicotinamida se define como aquella concentración de nicotinamida que, cuando se proporciona a la población de células NK en cultivo, durante un tiempo de exposición eficaz a la nicotinamida y a un tiempo de exposición eficaz a la nicotinamida en cultivo, da como resultado uno o más de expresión elevada de CD62L, migración elevada de respuesta, asentamiento elevado y retención *in vivo*, mayor proliferación y actividad citotóxica aumentada de las células NK, en comparación con las células NK cultivadas en idénticas condiciones pero con menos de 0,1 mM de la nicotinamida. Las concentraciones de nicotinamida adecuadas para su uso en algunas realizaciones de la presente invención están típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 10 mM. Los ejemplos I-VII indicados más adelante, demuestran concentraciones eficaces ejemplares de la fracción de nicotinamida (nicotinamida) de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mM, típicamente de 2,5 o 5,0 mM, basándose en el efecto de estas concentraciones de nicotinamida sobre la proliferación y la función de las células NK. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se contemplan concentraciones de nicotinamida en el intervalo (mM) de aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,75, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,25, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,75, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,25, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0, aproximadamente 3,25, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,75, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,25, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,75, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,25, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,75, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,25, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,75, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,25, aproximadamente 7.5, aproximadamente 7,75, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,25, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,75, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,25, aproximadamente 9,5, aproximadamente 9.75, aproximadamente 10,0, aproximadamente 11,0, aproximadamente 12,0, aproximadamente 13,0, aproximadamente 14,0, aproximadamente 15,0, aproximadamente 16,0, aproximadamente 17,0, aproximadamente 18,0 y aproximadamente 20,0 mM, y todas las concentraciones intermedias eficaces.

Las concentraciones eficaces de la nicotinamida pueden determinarse de acuerdo con cualquier ensayo de proliferación y/o actividad de NK, por ejemplo, protocolos de cultivo de células o de función como se detalla en los Ejemplos I-VI a continuación. De acuerdo con una realización, una concentración eficaz de nicotinamida es una concentración que se utiliza en la misma en los propios cultivos para potenciar o dar como resultado un aumento neto de proliferación y/o función de células NK en cultivo, en comparación con cultivos “control” que tienen menos de 0,1 mM de la nicotinamida y ensayarse a partir de la misma sangre de cordón umbilical, médula ósea o preparación de sangre periférica en el mismo ensayo y en condiciones de cultivo similares (durante de exposición a la nicotinamida, tiempo de exposición a la nicotinamida).

Como se utiliza en el presente documento, la frase “duración de tiempo eficaz” de exposición de las células NK a la nicotinamida se define como aquella duración de exposición a la nicotinamida durante la cual, cuando la nicotinamida y/u otra nicotinamida se proporciona a la población de células NK en cultivo en una concentración eficaz y a un tiempo de exposición eficaz, produce uno o más de expresión elevada de CD62L, respuesta de migración elevada, asentamiento elevado y retención *in vivo*, mayor proliferación y actividad citotóxica aumentada en las células NK, en comparación con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de nicotinamida. La duración de la exposición de las poblaciones de células NK a la nicotinamida adecuada para su uso en algunas realizaciones de la presente invención está típicamente en el intervalo de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 semanas, de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas. Los Ejemplos I-VI a continuación demuestran duraciones eficaces ejemplares de exposición a nicotinamida de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 3 semanas, basándose en el efecto de la exposición a la nicotinamida sobre la proliferación y función de células NK. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la duración de exposición a la nicotinamida es de aproximadamente 1,0, de aproximadamente 2,0, de aproximadamente 2,5, de aproximadamente 3,0, de aproximadamente 3,5, de aproximadamente 4,0, de aproximadamente 4,5, de aproximadamente 5,0, de aproximadamente 6,0, de aproximadamente 7,0, de aproximadamente 8,0, de aproximadamente 9,0, de aproximadamente 10,0, de aproximadamente 11,0, de aproximadamente 12,0, de aproximadamente 13,0, de aproximadamente 14,0, de aproximadamente 15,0, de aproximadamente 16,0, de aproximadamente 17,0, de aproximadamente 18,0, de aproximadamente 19,0, de aproximadamente 20,0, de aproximadamente 21,0 días, de aproximadamente 25 días, de aproximadamente 30 días, de aproximadamente 35 días y se contemplan todas las duraciones intermedias eficaces. Las duraciones efectivas del tiempo de exposición a la nicotinamida pueden determinarse de acuerdo con cualquier ensayo de proliferación y/o actividad de NK, por ejemplo, protocolos de cultivo celular o de función como se detalla en los Ejemplos I-VI a continuación.

Se apreciará que la exposición de las poblaciones de células NK a la nicotinamida puede iniciarse con el establecimiento del cultivo celular, o en cualquier momento durante el cultivo celular, incluso durante una pequeña duración justo antes de su uso (por ejemplo, infusión) de células NK. Como se utiliza en el presente documento, la frase “tiempo de exposición eficaz” de la población de células NK a la nicotinamida se define como el tiempo al cual, durante el cultivo de la población NK, la nicotinamida se proporciona a la población de células NK en una

concentración eficaz de la nicotinamida y durante una duración de tiempo eficaz, dando como resultado uno o más de expresión elevada de CD62L, respuesta de migración elevada, asentamiento elevado y retención *in vivo*, mayor proliferación y actividad citotóxica aumentada de las células NK, en comparación con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida. El tiempo de exposición de las poblaciones de células NK a la nicotinamida, adecuado para algunas realizaciones la presente invención, es típicamente desde la siembra de las células NK a aproximadamente 5 semanas después del cultivo, de aproximadamente 1 hora después de la siembra a aproximadamente 3 semanas después del cultivo, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 3 semanas después del cultivo, y desde el tiempo de siembra de la población de células NK en cultivo. De acuerdo con algunas realizaciones la invención, el tiempo de exposición de las células NK a la nicotinamida es en el momento de la siembra, aproximadamente 2 horas después de la siembra de las células, aproximadamente 12 horas después de la siembra de las células, aproximadamente 24 horas después de la siembra de las células, aproximadamente 2 días después de la siembra de las células, aproximadamente 4 días después de la siembra de las células, aproximadamente 7 días después de la siembra de las células, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21 días, aproximadamente 25 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 35 días después de la siembra de las células y se contemplan todos los tiempos intermedios eficaces. Los tiempos de exposición a la nicotinamida eficaces pueden determinarse de acuerdo con cualquier ensayo de actividad y/o proliferación de NK, por ejemplo, protocolos de cultivo celular o de función como se detalla en el presente documento, por ejemplo, en los Ejemplos I-VI a continuación en el presente documento.

Como se detalla en la sección de Ejemplos más adelante, el cultivo de poblaciones de células NK con al menos un factor de crecimiento y concentraciones eficaces de nicotinamida, proporcionadas a un tiempo de exposición eficaz durante un tiempo de duración de cultivo eficaz, da como resultado al menos uno de proliferación potenciada y/o función de células NK potenciada de las células cultivadas, en comparación con células NK cultivadas en idénticas condiciones en menos de 0,1 mM de nicotinamida.

Como se utiliza en el presente documento, el término "propagación" o "proliferación" se refiere a crecimiento, por ejemplo, crecimiento celular y multiplicación del número de células. La propagación y proliferación, como se utiliza en el presente documento, se refiere a números aumentados de células NK acumulados durante el periodo de incubación. La propagación *in vitro* o *in vivo* de células que presentan el fenotipo de células NK es un fenómeno conocido después de su estimulación, por ejemplo con IL-2, con líneas linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr y otros.

Los ensayos de proliferación celular bien conocidos en la técnica incluyen, sin limitación, ensayos clonogénicos, en los cuales las células se siembran y crecen en bajas densidades y se cuentan las colonias, ensayos mecánicos [citometría de flujo (por ejemplo, FACSTM), yoduro de propidio], que miden mecánicamente el número de células, ensayos metabólicos (tales como incorporación de sales de tetrazolio, por ejemplo, XTT, MTT, etc.), que miden números de células viables, ensayos de proliferación directa (tales como BudR, incorporación de timidina y similares), que miden la síntesis de ADN de poblaciones en crecimiento. En una realización, la proliferación celular de poblaciones de células NK cultivadas con una concentración eficaz de nicotinamida de acuerdo con la presente invención, se mide a un tiempo determinado después de la siembra de las células NK en cultivo (por ejemplo, aproximadamente 10 horas, 12 horas, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 2 meses o más) determinada por análisis FACS, utilizando marcadores anti-CD56 y anti-CD3 para identificar y cuantificar la fracción de células NK CD56+CD3- de la población. La proliferación de células NK puede expresarse como el factor de aumento (por ejemplo, expansión o factor de expansión) de células NK en comparación la fracción de células NK original antes del cultivo. En algunas realizaciones, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con la presente invención, tienen un factor de aumento de la población de células NK de al menos 2X, al menos 10X, al menos 20X, al menos 40X, al menos 50X, al menos 75X, al menos 100X, al menos 150X, al menos 250X y al menos 500X o más, después de aproximadamente 5, aproximadamente 7, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 18, aproximadamente 21, aproximadamente 25, aproximadamente 30 o más días de cultivo. En otra realización, el factor de expansión de las poblaciones de células NK, como se determina por FACSTM, expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida es de al menos aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,75X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,25X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 2,75X, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, más en comparación con las células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 nM de nicotinamida.

Como se utiliza en el presente documento, el término "función" o la expresión "función de células NK", se refieren a cualquier función biológica atribuida a células NK. Una lista no limitante de funciones de células NK incluye, por ejemplo, citotoxicidad, inducción de apoptosis, motilidad celular, migración dirigida, citocinas y otra respuesta de señalización celular, producción y secreción de citocinas/quimiocinas, expresión de moléculas de superficie celular activadoras e inhibitoras *in vitro*, asentamiento e implantación de células (retención *in vivo*) en un hospedador trasplantado, y alteración de enfermedades o de procesos de enfermedades *in vivo*. En algunas realizaciones, las

funciones de las células NK potenciadas por la exposición a nicotinamida, incluyen al menos una de expresión elevada del marcador de superficie CD62L, respuesta de migración elevada y una mayor actividad citotóxica de las células NK, así como asentamiento elevado y retención *in vivo* de las células NK infundidas.

5 En la técnica se conocen bien ensayos de adhesión y migración de moléculas, tales como CD62L, CXCR-4, CD49e y similares, importantes para el asentamiento/implantación y retención de células en trasplante. La expresión de CD62L en una célula puede ensayarse, por ejemplo, por citometría de flujo, inmunodetección, amplificación cuantitativa de ADNc, hibridación y similares. En una realización, la expresión de CD62L se detecta en diferentes poblaciones de células NK por exposición de las células a un anticuerpo monoclonal anti-CD62L humano específico
10 marcado con fluorescencia [por ejemplo, CD62L PE, Cat. N.º 304806 de BioLegend (San Diego, CA, USA)], y separación de las células por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). En algunas realizaciones, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida tienen al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 % o más de las células detectadas que expresan CD62L, como se determina por FACS™. En otra realización, las poblaciones de células NK expuestas a nicotinamida de acuerdo con la presente
15 invención, tienen al menos aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,75X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,25X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 2,75X, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X o más expresión de CD62L, como se determina por FACS™, cuando se comparan con
20 células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

En la técnica se conocen bien ensayos de migración celular. La migración de las células puede ensayarse, por ejemplo, mediante ensayos de transmigración o ensayos de cierre con hueco. En los ensayos de transmigración, tales como la técnica de dos cámaras, las células se separan a partir de un estímulo mediante una barrera (por
25 ejemplo, un filtro) y la migración de las células se detecta contando la pérdida de células desde el origen, la acumulación de células a través de la barrera, o ambas, a intervalos específicos. En el ensayo de cierre con hueco, las células se colocan en la periferia de un hueco visible (placa de agar puntuada, alrededor de un círculo, etc.) y se incuban con un estímulo. El cierre del espacio entre las células aplicado por la motilidad celular en respuesta a un estímulo, se visualiza utilizando citometría, inmunodetección, microscopía/morfométrica, etc. En una realización, el
30 potencial de migración de diferentes poblaciones de células NK se determina mediante el ensayo de transmigración "Transwell"™, en respuesta a SDF (250 ng/ml). En algunas realizaciones, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de la nicotinamida de acuerdo con la presente invención tienen una migración de al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % y al menos 80 % o más medida con el ensayo Transwell descrito en el presente documento. En otra realización, las poblaciones de células NK expuestas a
35 concentraciones eficaces de la nicotinamida tienen una migración de al menos aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,75X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,25X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 2,75X, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X o más, determinada mediante el ensayo
40 transwell, cuando se compara con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

En la técnica se conocen bien ensayos para el asentamiento y retención *in vivo* de células transfundidas o trasplantadas. Como se utiliza en el presente documento, el término "asentamiento" se refiere a la capacidad de una
45 célula transfundida o trasplantada para alcanzar, y sobrevivir en, un órgano hospedador diana. Por ejemplo, un órgano diana de células NK puede ser el tejido linfoide, un órgano diana de hepatocitos puede ser el parénquima hepático, un órgano diana de células alveolares puede ser el parénquima pulmonar, etc. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "retención *in vivo*" (también conocida como "implantación") se refiere a la capacidad de las células transfundidas o trasplantadas para proliferar y permanecer viables en los órganos diana.
50 Los modelos animales para ensayar el asentamiento y la retención *in vivo* de células NK trasplantadas incluyen, pero sin limitación, mamíferos pequeños inmunodeficientes (tales como ratones SCID e IL2R γ^{null} y similares). El modelo de ratón SCID-Hu emplea ratones scid/scid (SCID) C.B-17 trasplantados con timo fetal humano y tejido de hígado o tejido de MO fetal y proporciona un modelo apropiado para la evaluación de la retención de células NK humanas trasplantadas y potencial terapéutico. El asentamiento y la retención *in vivo* de células trasplantadas
55 también pueden ensayarse en sujetos hospedadores humanos. En una realización, el asentamiento y la retención *in vivo* se ensaya en ratones NOD/SCID irradiados (véase el Ejemplo VI del presente documento), transfundidos, por ejemplo, con aproximadamente 15×10^4 , aproximadamente 15×10^5 , aproximadamente 15×10^6 , aproximadamente 15×10^7 o más células NK humanas cultivadas con concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con la presente invención y sacrificados a un tiempo postransfusión determinado (por ejemplo, aproximadamente 5 horas,
60 10 horas, 12 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, semanas, 2, 3, 4 meses o más postransfusión). Después del sacrificio de los ratones, las muestras de bazo, médula ósea, sangre periférica y otros órganos se evaluaron con FACS para determinar la presencia de células NK (CD56+CD45+) humanas utilizando anticuerpos (Ab) específicos humanos. El porcentaje de retención *in vivo* se expresa como el porcentaje de células del órgano que presenta el fenotipo donante (por ejemplo, CD45 para células humanas). En algunas realizaciones, los órganos diana (por
65 ejemplo, tejido linfoide, tal como médula ósea, bazo, timo, ganglios linfáticos, GALT) de ratones hospedadores transfundidos con poblaciones de células NK expuestos a concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con

la presente invención, tienen un asentamiento y una retención *in vivo* de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % y al menos 80 % o más. En una realización específica, 15×10^6 células NK cultivadas con una concentración eficaz de nicotinamida de acuerdo con la presente, invención se transfundieron a ratones SCID irradiados, y al menos un 25 % de las células NK que tenían linaje específico de donante (por ejemplo, CD45+) se detectó en el bazo del hospedador, 4 días después de la transfusión. En otra realización, poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida tienen un asentamiento y una retención *in vivo* de al menos aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,75X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,25X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 2,75X, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X, determinado por FACS™, cuando se compara con el asentamiento y la retención *in vivo* de células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de nicotinamida.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “proliferación homeostática” se refiere a la proliferación dentro del órgano o tejido diana capaz de mantener números estables de las células NK infundidas a lo largo del tiempo, preferentemente meses a años.

Actualmente se están realizando muchos ensayos clínicos que implican el trasplante de células NK en pacientes, para afecciones que incluyen, por ejemplo, pero no exclusivamente, leucemia (NCT 00799799 y NCT 00303667), neoplasias hematológicas (NCT 00697671, NCT 00354172 y 00640796), pos-ASCT (NCT 00586703), neuroblastoma (NCT 00698009), melanoma neoplásico (NCT 00846833), terapia de combinación con quimioterapia (NCT 00625729), tumores sólidos (NCT 00640796) y carcinoma nasofaríngeo (NCT 00717184) y para diversas neoplasias (NCT01105650). Una lista completa, actualizada y detallada de ensayos clínicos actuales y protocolos detallados para la terapia con células NK se encuentra disponible en la página web del National Institutes of Health Clinical Trial de Estados Unidos.

Los ensayos de citotoxicidad (“destrucción celular”) son muy conocidos en la técnica. Como ejemplos de células diana adecuadas para su uso en ensayos de destrucción redirigidos son las líneas celulares de cáncer, células de cáncer primario, células de tumores sólidos, células de leucemia, o células infectadas por virus. Particularmente, pueden utilizarse células K562, BL-2, colo250 y células leucémicas primarias, pero puede utilizarse cualquiera de los diversos otros tipos de células y son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sivori et al. (1997) J. Exp. Med. 186: 1129-1136; Vitale et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 2065-2072; Pessino et al. (1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; Neri et al. (2001) Clin. Diag. Lab. Immun. 8:1131-1135). La destrucción celular se ensaya mediante ensayos de viabilidad celular (por ejemplo, exclusión con colorantes, liberación de cromo, CFSE), ensayos metabólicos (por ejemplo, sales de tetrazolio) y observación directa. En una realización, el potencial de citotoxicidad de diferentes poblaciones de células NK se determina mediante retención de CFSE y captación de PI en células expuestas a células NK a una proporción E:D de 1:1, 2,5:1, 5:1, o 10:1, y poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con la presente invención destruyen al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % y al menos 80 % o más de las células diana, medido con el ensayo de exclusión con colorantes descrito en el presente documento. En otra realización, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida tienen un potencial destructor de al menos aproximadamente 1,2X, aproximadamente 1,3X, aproximadamente 1,5X, aproximadamente 1,75X, aproximadamente 2X, aproximadamente 2,25X, aproximadamente 2,5X, aproximadamente 2,75X, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5X, aproximadamente 4X, aproximadamente 4,5X, aproximadamente 5X, aproximadamente 6X, aproximadamente 7X, aproximadamente 8X, aproximadamente 9X, aproximadamente 10X o más, determinado con el ensayo de exclusión con colorantes, cuando se compara con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

El cultivo de células NK puede efectuarse con o sin células alimentadoras o con una capa de células alimentadoras. El cultivo *ex vivo* sin capa alimentadora es muy ventajoso para aplicaciones clínicas de células cultivadas, incluyendo células NK. Como se detalla en la sección de Ejemplos más adelante, la potenciación eficaz de la proliferación *ex vivo* y función celular de células NK se observó en cultivos de células NK de larga y corta duración sin células alimentadoras y capa alimentadora procedentes de células de médula ósea y de sangre de cordón umbilical no seleccionadas y seleccionadas. Por tanto, de acuerdo con una realización, el cultivo de la población de células NK se efectúa sin capa alimentadora o células alimentadoras.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, y como se detalla en la sección de Ejemplos a continuación, la población de células NK se cultiva con IL-2 y nicotinamida 5 mM, el tiempo de exposición a nicotinamida es desde la siembra de la población de células que comprende células NK y la duración de la exposición es de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, opcionalmente 2 semanas y opcionalmente 3 semanas.

En algunas realizaciones de la presente invención, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con la presente invención, puede tener al menos cualquiera de dos, opcionalmente cualquiera de tres, opcionalmente cualquiera de cuatro y opcionalmente cualquiera de cinco de

expresión elevada del marcador de superficie CD62L, respuesta de migración elevada y mayor actividad citotóxica de las células NK, así como asentamiento y retención *in vivo* elevados de las células NK infundidas, en comparación con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida. En una realización particular, las poblaciones de células NK expuestas a concentraciones eficaces de nicotinamida de acuerdo con la invención tienen mayor proliferación, expresión elevada de CD62L y asentamiento elevado y retención *in vivo* de células NK infundidas, en comparación con células NK cultivadas en idénticas condiciones con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

Como se detalla en el presente documento, la potenciación de la proliferación y función celular de células NK por exposición a nicotinamida se observa también en presencia de células alimentadoras. Por tanto, en otra realización, las células NK se cultivan en presencia de células alimentadoras o de una capa alimentadora. Típicamente, las capas alimentadoras comprenden células estromales irradiadas, células de líneas celulares inmortalizadas y similares. Se describen con detalle métodos para cultivar células NK en capas alimentadoras o con células alimentadoras, por ejemplo, en Frias et al. (Exp Hematol 2008; 36: 61-68), Harada et al. (Exp Hematol 2004; 32: 614-21), Campana et al. (US20090011498) Childs et al. (US20090104170) y Tsai (US20070048290).

Las células NK de la presente invención pueden proceder de cualquier fuente que comprenda dichas células. Las células NK se encuentran en muchos tejidos, y pueden obtenerse, por ejemplo, de ganglios linfáticos, bazo, hígado, pulmón, intestino, decidua y también pueden obtenerse de células madre pluripotentes inducidas (iPS, del inglés *induced Pluripotent Stem*) o células madre embrionarias (CME). Típicamente, se utiliza sangre de cordón umbilical, sangre periférica, sangre periférica movilizada y médula ósea, que contiene poblaciones de células de linfocitos heterogéneos, para proporcionar grandes cantidades de células NK para la investigación y uso clínico. Por tanto, de acuerdo con un aspecto de una realización de la presente invención, el método comprende cultivar una población de células NK procedente de uno de sangre de cordón umbilical, sangre periférica o médula ósea. Como se detalla en el presente documento, se reveló que se han descubierto diferencias significativas en las proporciones de tipos de células de linfocitos entre preparaciones de células NK de diferentes fuentes. Por ejemplo, las células CD56+ aisladas (por aislamiento inmunomagnético) de sangre de cordón umbilical incluyen típicamente una mayor proporción de células NK CD56+CD3- y menos células NKT que coexpresan el marcador de NK CD56 y el marcador de células T CD3 (CD56+CD3+) en comparación con la fracción CD56+ de médula ósea o sangre periférica (véanse los Ejemplos I-VI en el presente documento). Por tanto, en determinadas realizaciones, las células NK se cultivan a partir de una población de células heterogénea que comprende células NK, células CD3- y células CD3+. En una realización, la fracción de células NK CD3+ es mayor que la fracción de células NK CD3-, como es típico de médula ósea, sangre de cordón umbilical o sangre periférica. En otra realización más, la población de células NK se selecciona o enriquece con células NK. En algunas realizaciones las células NK pueden propagarse a partir de poblaciones de células recientes, aunque en otras realizaciones las células NK se propagan a partir de poblaciones de células conservadas (tales como células crioconservadas o descongeladas) o de poblaciones de células previamente cultivadas.

Las células NK se asocian con la fracción celular mononuclear de sangre de cordón umbilical o sangre periférica o médula ósea. En una realización, la población de células que comprende dichas células NK es una población de células mononucleares o nucleares totales desprovista de células CD3+, o de células CD3+ y CD19+. En otra realización, la población de células que comprende las células NK es una población de células NK no seleccionada. En otra realización más, las células se seleccionan adicionalmente y las células NK comprenden células CD56+CD16+CD3- y/o CD56+CD16-CD3-. En el presente documento se detallan métodos para seleccionar células NK según el fenotipo (por ejemplo, inmunodetección y análisis FACS), por ejemplo, en la sección de Métodos a continuación.

Más habitualmente, muestras de sangre entera o de médula ósea se procesan adicionalmente para obtener poblaciones de células antes de colocar los linfocitos en el medio de cultivo (o tampón). Por ejemplo, la muestra de sangre o de médula ósea puede procesarse para enriquecer o purificar o aislar poblaciones de células definidas específicas. Los términos "purificar" y "aislar" no precisan pureza absoluta; más bien pretenden ser términos relativos. Por tanto, por ejemplo, una población de linfocitos purificada es una en la que las células especificadas están más enriquecidas de lo que lo están dichas células en su tejido de procedencia. Una preparación de linfocitos sustancialmente pura puede enriquecerse de tal manera que las células deseadas representen al menos el 50 % de las células totales presentes en la preparación. En determinadas realizaciones, una población de células sustancialmente pura representa al menos el 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % o más de las células totales en la preparación.

En la técnica se conocen bien métodos para enriquecer y aislar linfocitos, y pueden seleccionarse métodos apropiados basándose en la población deseada. Por ejemplo, en una estrategia, el material de procedencia se enriquece de linfocitos retirando glóbulos rojos. En su forma más simple, la retirada de glóbulos rojos puede implicar la centrifugación de sangre entera no coagulada o médula ósea. Basándose en la densidad, los glóbulos rojos se separan de los linfocitos y de otras células. Las fracciones ricas en linfocitos pueden después recuperarse de un modo selectivo. Los linfocitos y sus progenitores también pueden enriquecerse por centrifugación utilizando medios de separación tales como el Medio de Separación de Linfocitos (MSL) convencional disponible en diversas fuentes comerciales. Como alternativa, los linfocitos/progenitores pueden enriquecerse utilizando diversos procedimientos

5 basados en afinidad. En la técnica se conocen numerosos métodos de preparación de anticuerpos mediados por afinidad tales como perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos. El enriquecimiento de linfocitos también puede realizarse utilizando preparaciones disponibles en el comercio para seleccionar negativamente células no deseadas, tales como FICOLL-HYPAQUE™ y otros medios de separación por gradiente de densidad formulados para el enriquecimiento de linfocitos enteros, células T o células NK.

10 En la técnica se conocen bien métodos de selección de células NK de muestras de sangre, médula ósea o tejido (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.770.387 de Litwin et al). Más comúnmente se utilizan protocolos basados en aislamiento y purificación de células CD56+, normalmente después del fraccionamiento de células mononucleares, y el empobrecimiento de células no NK tales como CD3+, CD34+, CD133+ y similares. Pueden emplearse combinaciones de dos o más protocolos para proporcionar poblaciones de células NK que tengan una mayor pureza de contaminantes no NK. La pureza de la preparación de células NK es de gran importancia para aplicaciones clínicas, ya que las células no NK, tales como las células T y las células NKT, contribuyen a reacciones específicas de antígeno, tales como EICH, comprometiendo los posibles beneficios del trasplante de células NK. Los kits disponibles en el comercio para el aislamiento de células NK incluyen procedimientos de una etapa (por ejemplo, kit de aislamiento con microperlas de CD56 y CD56+, CD56+CD16+ de Miltenyi Biotec, Auburn CA), y procedimientos de etapas múltiples, que incluyen empobrecimiento, o empobrecimiento parcial, de CD3+ o empobrecimiento con anticuerpos contra células no NK que reconocen y retiran células T (por ejemplo, OKT-3), células B, células madre, células dendríticas, monocitos, granulocitos y células eritroides. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células NK se seleccionan de CD56+CD3-, CD56+CD16+CD3-, CD56+CD16-CD3- o de otras poblaciones de células NK purificadas. Sin embargo, debe observarse, que las aplicaciones clínicas típicamente favorecen pocas manipulaciones de la población de células candidatas.

25 En una realización, las células NK se propagan *ex vivo* mediante cultivos a corto y largo plazo. Como se detalla en el Ejemplo I, el cultivo de células NK con factores de crecimiento y nicotinamida, de acuerdo con los métodos de la presente invención, durante tan solo 7 días, o hasta 3 semanas, da como resultado una proliferación y/o funcionalidad potenciada, preferencial, de las células NK cultivadas, en comparación con células cultivadas con citocinas pero con menos de 0,1 mM de nicotinamida. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la duración del cultivo de la población de células NK es de al menos 3, al menos 5, al menos 7, opcionalmente 10, 30 opcionalmente 12, opcionalmente 14, opcionalmente 16, opcionalmente 18, opcionalmente 20 y opcionalmente 21 días, o de 1, 2 o tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas o más. La duración de los cultivos ejemplares, no limitantes, como se detalla en los Ejemplos I a VI, es de 7 días (1 semana) y de 21 días (3 semanas).

35 Las poblaciones de células NK pueden cultivarse utilizando diversos métodos y dispositivos. La selección de los aparatos de cultivo normalmente se basa en la escala y finalidad del cultivo. El aumento paulatino del cultivo celular preferentemente implica el uso de dispositivos especializados. Se detallan aparatos para la producción a gran escala de células NK de calidad clínica, por ejemplo, en Spanholtz et al. (PLoS ONE 2010;5:e9221) y en Sutlu et al. (Cytotherapy 2010, Early Online 1-12).

40 Peled et al. (documento WO 03/062369) han desvelado recientemente un efecto drástico del tratamiento con nicotinamida sobre el potencial de implantación de células CD34+. Este efecto de la nicotinamida se ha observado tanto con células que proliferan en cultivo, como para duraciones de incubación cortas, suficiente para que se produzca una división mínima o no se produzca división. Por tanto, al mismo tiempo que se potencia la proliferación de células NK en cultivos *ex vivo* es un objetivo importante de la presente invención que se contemple una exposición *ex vivo* de corta duración de células NK a la nicotinamida, durante periodos de minutos, horas, 1 día, y 45 similar. Dicha exposición de corta duración de células NK a la nicotinamida, durante periodos de tiempo no suficientes para que se produzca la proliferación, puede posiblemente potenciar, por ejemplo, la funcionalidad de células NK (citotoxicidad, potencial de migración, expresión de moléculas de superficie celular, potencial de implantación y similares). El tratamiento corto con nicotinamida puede proporcionarse a células recientes, a células crioconservadas y descongeladas, a células en cultivo, a células purificadas, a poblaciones de células mixtas y similares. En una realización, dicho tratamiento corto con nicotinamida se proporciona inmediatamente antes del uso (trasplante, infusión, etc.) de las células NK.

55 Los inventores han observado sorprendentemente que el cultivo de una población de células mixta que comprende células NK (CD56+) y células no NK (por ejemplo, células T (CD3+), células NKT (CD56+CD3+) y similar) en presencia de una concentración eficaz de nicotinamida en el medio de cultivo, no solo potencia la proliferación, el crecimiento y la funcionalidad de las células NK, sino que también inhibe la proliferación y el crecimiento de las células no NK (por ejemplo, células T y NK) en el mismo cultivo (véase el Ejemplo V del presente documento). Por tanto, en una realización de la invención el cultivo de una población heterogénea de células NK y CD3+ con una concentración eficaz de nicotinamida, produce una población de células NK que tiene una proporción reducida de células CD3+ con respecto a CD56+CD3- en comparación con una población de células NK cultivada en condiciones de cultivo de otra manera idénticas con menos de 0,1 mM de la nicotinamida. En otra realización adicional, el cultivo de una población heterogénea de células NK y CD3+ con una concentración eficaz de nicotinamida de acuerdo con el método de la invención produce una población de células NK que tiene números 60 reducidos de células CD14+ y CD15+, en comparación con una población de células NK cultivada en condiciones de cultivo de otra manera idénticas con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

Los métodos descritos anteriormente en el presente documento para el cultivo *ex vivo* de poblaciones de células NK pueden producir, entre otras cosas, una población cultivada de células NK.

5 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una población de células NK caracterizada por al menos uno de expresión elevada de CD62L, respuesta de migración elevada, asentamiento elevado y retención *in vivo*, mayor proliferación, actividad citotóxica aumentada y una proporción reducida de células CD3+ con respecto a CD56+/CD3-, en comparación con una población de células NK cultivada en condiciones de cultivo de otra manera idénticas con menos de 0,1 mM de la nicotinamida. En algunas realizaciones, la población de células NK se caracteriza por al menos cualquiera de dos, al menos cualquiera de tres, al menos cualquiera de cuatro, al menos cualquiera de cinco o las seis de expresión elevada de CD62L, respuesta de migración elevada, asentamiento elevado y retención *in vivo*, mayor proliferación, actividad citotóxica aumentada y una proporción reducida de células CD3+ con respecto a CD56+/CD3-, en comparación con una población de células NK cultivada en condiciones de cultivo de otra manera idénticas con menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

15 En el Ejemplo VI los inventores han mostrado que las poblaciones de NK preparadas de acuerdo con los métodos de la invención, tienen potencial funcional *in vivo* aumentado, demostrado por localización y retención *in vivo* en los órganos diana (por ejemplo, bazo, médula ósea y sangre periférica). Por tanto, en un aspecto particular de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una población de células NK caracterizada por asentamiento, implantación y retención *in vivo* potenciados cuando se trasplantan, en el que la infusión de al menos 15×10^6 células de la población de células NK en un hospedador irradiado (por ejemplo, un ratón SCID) da como resultado al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % y al menos un 90 % o más, de células NK procedentes de donante en el tejido linfoide hospedador, como se detecta por inmunodetección y citometría de flujo, 4 días después de la infusión. En una realización, la infusión de al menos 15×10^6 células de la población de células NK da como resultado al menos un 25 % de células NK procedentes de donante en el tejido linfoide hospedador, como se detecta por inmunodetección y citometría de flujo, 4 días después de la infusión.

30 Para caracterizar la población NK pueden aplicarse otros criterios relevantes. Por tanto, en otra realización más, la población de células NK de la invención se caracteriza además por la expresión de CD62L en al menos un 30 % de la población de células en el momento de la infusión en el hospedador, como se detecta por citometría de flujo e inmunodetección. En otra realización más, la población de células NK puede caracterizarse también de acuerdo con el grado de pureza a partir de la contaminación de células CD3+, por ejemplo, una población de células NK que tiene una proporción de células CD3+ con respecto a CD56+/CD3- igual a o menor que 1:100 en el momento de la infusión.

40 Se apreciará, en el contexto de la presente invención, que junto con el medio de cultivo que contiene nicotinamida puede proporcionarse una población de células NK terapéutica, aislada del medio de cultivo y combinada con un transportador farmacéuticamente aceptable. Por tanto, las poblaciones de células de la invención pueden administrarse en un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina estéril y soluciones de tampón acuosas. El uso de dichos transportadores y diluyentes es muy conocido en la técnica.

45 En una realización particular de este aspecto de la presente invención, la población de células NK comprende una población de células NK cultivada *ex vivo* en presencia de una cantidad eficaz de nicotinamida; y un transportador farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la población cultivada *ex vivo* comprende células NK que están activadas y que tienen capacidad citotóxica aumentada contra una célula diana, cuando se compara con poblaciones de células NK cultivadas con factores de crecimiento en menos de 0,1 mM de la nicotinamida.

50 La capacidad de la nicotinamida para mantener la proliferación y funcionalidad de células NK puede utilizarse adicionalmente en diversas aplicaciones técnicas:

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método de preservación de células NK. En una realización, el método se efectúa manipulando las células NK en al menos una de las siguientes etapas: recogida, aislamiento y/o conservación, en presencia de una cantidad eficaz de nicotinamida.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención, se proporciona una colección/bolsa de cultivo de células NK. La colección/bolsa de cultivo de células de la presente invención se complementa con una cantidad eficaz de nicotinamida.

60 De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un tampón de separación y/o lavado de células NK. El tampón de separación y/o lavado se complementa con una cantidad eficaz de nicotinamida.

Como también se detalla más adelante, las células NK pueden modificarse genéticamente.

65 En terapia génica *ex vivo* las células se extraen de un paciente, y al mismo tiempo que se cultivan se tratan *in vitro*. Generalmente, se introduce un gen de reemplazo funcional en las células mediante un vehículo/método apropiado

de suministro de genes (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según se requiera y después las células modificadas se cultivan y retornan al hospedador/paciente. Se ha mostrado que estas células genéticamente reimplantadas expresan el material genético transfectado *in situ*.

5 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de transducción de células NK cultivadas *ex vivo* con un exógeno. El método, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se efectúa mediante: (a) el cultivo *ex vivo* de una población de células NK cultivando la población de células NK de acuerdo con los métodos de cultivo de células NK de la presente invención, y (b) la transducción de células de la población cultivada de células NK con el exógeno. Se apreciará que el orden de las etapas (a) y (b) puede invertirse.
10 En la técnica se conocen métodos para la transducción de células NK cultivadas, por ejemplo, el uso de células NK modificadas *ex vivo* lo han desvelado Campana et al. (documento US20090011498).

15 Por consiguiente, las células cultivadas de la presente invención pueden modificarse para expresar un producto génico. Como se utiliza en el presente documento, la frase "producto génico" se refiere a proteínas, péptidos y moléculas de ARN funcionales. Generalmente, el producto génico codificado por la molécula de ácido nucleico es el producto génico que se desea proporcionar al sujeto. Los ejemplos de dichos productos génicos incluyen proteínas, péptidos, glucoproteínas y lipoproteínas normalmente producidos por una célula del sujeto receptor. Como alternativa, el producto génico codificado es uno, que induce la expresión del producto génico deseado por la célula (por ejemplo, el material genético introducido codifica un factor de transcripción, que induce la transcripción del producto génico a proporcionar al sujeto). Por ejemplo, las células NK pueden modificarse para que expresen moléculas de superficie celular, o productos génicos intracelulares que pueden potenciar o modular la función de células NK, tales como citocinas, moléculas de adhesión, receptores activadores y/o inhibidores y similares.

20 La descripción de vectores, construcciones y protocolos adecuados para la transfección de células eucariotas puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al (eds.) Greene Publishing Associates (1989), Sección 9.2 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), por ejemplo en las Secciones 16.41-16.55, 9 u otros manuales de laboratorio convencionales.

25 Como se analiza con detalle anteriormente en el presente documento, la propagación *ex vivo* de células NK puede utilizarse ventajosamente en trasplante o implante de células NK. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de trasplante o implante de células NK en un receptor. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se efectúa mediante (a) cultivo *ex vivo* de una población de células NK con factores de crecimiento y con una concentración eficaz de nicotinamida de acuerdo con los métodos de la invención y administrando a dicho sujeto una cantidad terapéutica de dichas células NK cultivadas.
30

35 El donante y el receptor pueden ser el mismo individuo o individuo diferentes, por ejemplo, individuos alogénicos. Por tanto, la población de células NK puede ser autóloga o alogénica para el sujeto. Cuando se realiza un trasplante alogénico, pueden llevarse a cabo regímenes para la reducción del rechazo del implante y/o la enfermedad injerto contra hospedador, como se conoce en la técnica. Dichos regímenes pueden realizarse en terapia humana. La mayoría de los regímenes avanzados se desvela en las publicaciones de Slavin S. et al., por ejemplo, J Clin Immunol (2002) 22: 64, y J Hematother Stem Cell Res (2002) 11: 265), Gur H. et al. (Blood (2002) 99: 4174), y Martelli MF et al., (Semin Hematol (2002) 39: 48).

40 De acuerdo con una realización, el trasplante de la población de células NK es para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en el sujeto.

45 De acuerdo con otro aspecto adicional de una realización de la presente invención, se proporciona un método de inhibición de crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se efectúa administrando a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células NK de la invención.
50

55 La expresión "tratando" o "tratamiento" incluye, pero sin limitación, la administración de una composición de células NK enriquecida, activada o cultivada o una población de la presente invención para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviar los síntomas o detener o inhibir el desarrollo posterior de la enfermedad, afección o trastorno (por ejemplo, cáncer, cáncer metastásico o tumores sólidos metastásicos). El tratamiento puede ser profiláctico, es decir, adyuvante (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de síntomas después de que se manifieste la enfermedad.
60

65 En una realización, la población de células NK se administra en una cantidad eficaz para reducir o eliminar un cáncer, tal como un tumor sólido o una neoplasia, o para prevenir su aparición o recurrencia. "Una cantidad eficaz para reducir o eliminar el tumor sólido o para prevenir su aparición o recurrencia" o "una cantidad eficaz para reducir o eliminar el trastorno hiperproliferativo o para prevenir su aparición o recurrencia" se refiere a una cantidad de una composición terapéutica que mejora un desenlace o la supervivencia del paciente después del tratamiento de la patología tumoral o trastorno hiperproliferativo, medido por datos de ensayos con pacientes, datos de supervivencia,

elevación o supresión de niveles de marcadores tumorales, susceptibilidad reducida basándose en el perfil genético o exposición a factores ambientales. La frase "inhibición del crecimiento tumoral" se refiere a la reducción del tamaño o viabilidad o número de células de un tumor. "Cáncer", "neoplasia", "tumor sólido" o "trastorno hiperproliferativo" se utilizan como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de las diversas enfermedades que se caracterizan por la proliferación incontrolada, anómala, de células, la capacidad de células afectadas para propagarse localmente o a través de la corriente sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, metastatizar) así como cualquiera de las diversas características estructurales y/o moleculares. Una célula "cancerosa" o "neoplásica" o "una célula de tumor sólido" se entienden como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y que es capaz de invadir y metastatizar. "Cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasma o tumores neoplásicos encontrados en mamíferos, incluyendo carcinomas y sarcomas. Son ejemplos los cánceres de mama, de pulmón, de pulmón no microcítico, de estómago, cerebro, cabeza y cuello, meduloblastoma, de hueso, hígado, colon, genitourinario, de vejiga, urinario, riñón, testículos, útero, ovario, cuello uterino, próstata, melanoma, mesotelioma, sarcoma (véase DeVita, et al., (eds.), 2001, Cancer Principles and Practice of Oncology, 6ª. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa.).

"Asociado a cáncer" se refiere a la relación de un ácido nucleico y su expresión, o a su ausencia, o a una proteína y su nivel o actividad, o a su ausencia, a la aparición de neoplasia en una célula de un sujeto. Por ejemplo, el cáncer puede asociarse con expresión de un gen particular que no se expresa, o que se expresa un nivel más bajo, en una célula normal, sana. A la inversa, un gen asociado a cáncer puede ser uno que no se exprese en una célula neoplásica (o en una célula que sufre transformación), o que se expresa a un nivel más bajo en la célula neoplásica en comparación con lo que se expresa en una célula normal, sana.

Una "enfermedad hiperproliferativa" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el que las células proliferan más rápidamente en comparación con el crecimiento de tejido normal. Por tanto, una célula hiperproliferativa es una célula que prolifera más rápidamente que las células normales.

"Cáncer avanzado" significa cáncer que ya no se localiza en el lugar del tumor primario, o un cáncer que está en un Estadio III o IV de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer (AJCC).

"Bien tolerado" se refiere a la ausencia de cambios adversos en el estado de salud que se produce como resultado del tratamiento y que afectaría a decisiones del tratamiento.

"Metastásico" se refiere a células tumorales, por ejemplo, tumor sólido humano o neoplasia genitourinaria, que puede establecer lesiones tumorales secundarias en los pulmones, hígado, hueso o cerebro de ratones inmunodeficientes después de una inyección en el panículo adiposo mamario y/o en la circulación del ratón inmunodeficiente.

Un "tumor sólido" incluye, pero sin limitación, sarcoma, melanoma, carcinoma u otro cáncer de tumor sólido. "Sarcoma" se refiere a un tumor que está constituido por una sustancia similar al tejido conectivo embrionario y está generalmente compuesto por células fuertemente empaquetadas embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma amieloblástico, sarcoma botriode, sarcoma cloroma, coriosarcoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado idiopático múltiple, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

"Melanoma" se refiere a un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma acral lentiginoso, melanoma amelanocítico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma lentigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de propagación superficial.

"Carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento neoplásico constituido por células epiteliales que tienden a infiltrar los tejidos circundantes y que dan lugar a metástasis. Los ejemplos de carcinomas incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma quístico adenoideo, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza adrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloideo, comedocarcinoma, carcinoma corpus, carcinoma cribiforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma durum, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epidermoide, carcinoma adenoide epitelial, carcinoma exofítico, carcinoma ex ulcerá, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células granulares, carcinoma de la

matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipermerfoide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma *in situ*, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticulare, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial carcinoma medular, carcinoma bulbar, carcinoma melanocítico, carcinoma mole, carcinoma mucinoso, carcinoma muciparum, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, mucocarcinoma, carcinoma myxomatodes, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma microcítico, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma espinocelular, carcinoma pultáceo, carcinoma de riñón de células renales, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma schneideriano, carcinoma cirroso, carcinoma de escroto, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solenoide, carcinoma de células esferoidales, carcinoma fusocelular, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma en collar, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectodes, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso y carcinoma villosum.

“Leucemia” se refiere a enfermedades progresivas, neoplásicas de órganos formadores de sangre y generalmente se caracteriza por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente basándose en (1) la duración y carácter de la enfermedad aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mielóide (mielógena), linfoide (linfocítica) o monocítica; y (3) el aumento o el no aumento del número de células anómalas en la sangre leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia aguda no linfocítica, leucemia crónica linfocítica, leucemia aguda granulocítica, leucemia crónica granulocítica, leucemia aguda promielocítica, leucemia de células T en adultos, leucemia aleucémica, leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia blástica, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, tricoleucemia, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia mastocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia mielóide granulocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas. Otros cánceres incluyen, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores pulmonares microcíticos, tumores de cerebro primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer tiroideo, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer de tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer adrenocortical y cáncer de próstata.

En otra realización particular de este aspecto de la presente invención, el método está simultáneamente afectado con, después o antes del trasplante de una célula hematopoyética o progenitora hematopoyética o célula madre hematopoyética en dicho sujeto. En otras realizaciones adicionales, el sujeto se está tratando simultáneamente con un agente sensibilizante o potenciador (por ejemplo, un inhibidor de proteasoma, IL-2, IL-15, etc.) que adicionalmente potencia la función *in vivo* de las células NK transfundidas (para detalles véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20090104170 de Childs et al).

Se ha observado una disminución en cuanto al número y funcionalidad de las células NK en pacientes autoinmunes, lo que indica la posibilidad de la terapia con células NK en una diversidad enfermedades y afecciones autoinmunes (véase, Schleinitz, et al., Immunology 2010; 131: 451-58, y French y Yokohama, Arthrit Res Ther 2004; 6: 8-14). Por tanto, en otra realización adicional de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección autoinmune en un sujeto que lo necesite. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se efectúa administrando a dicho sujeto una cantidad terapéutica de una población de células NK de la invención.

Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con el método de la invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Como ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes se incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis, infarto de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad autoinmune anti-factor VIII, vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante y crescéntica focal paucimmune, síndrome antifosfolípido, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas y autoinmunidad anti linfocitos T auxiliares.

Los ejemplos de enfermedades reumáticas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

5 Como ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes se incluyen, pero sin limitación, enfermedad pancreática, diabetes de Tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmune antiespermatozoides, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de Tipo I. Las enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes de Tipo I, enfermedades tiroideas autoinmunes, enfermedad de Graves, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmune antiespermatozoides, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de Tipo I.

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes, incluyen pero sin limitación, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, enfermedad celiaca, colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

15 Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedades cutáneas ampollas autoinmunes, tales como, pero sin limitación, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y penfigoide foliáceo.

Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune.

20 Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia grave, neuropatías, neuropatías motoras; síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton; enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelar paraneoplásica y síndrome del hombre rígido; síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia cerebrales progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis amiotrófica lateral, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes; neuropatías disímunes; neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita, neuritis, neuritis óptica y enfermedades neurodegenerativas.

30 Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, pero sin limitación, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjogren primario y enfermedad autoinmune de la musculatura lisa.

Los ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, nefritis y nefritis intersticial autoinmune.

35 Los ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, pero sin limitación, pérdida fetal repetida.

40 Los ejemplos de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo incluyen, pero sin limitación, enfermedades óticas, enfermedades óticas autoinmunes y enfermedades autoinmunes del oído interno.

Los ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica.

45 En otra realización adicional de la presente invención, se proporciona un método de inhibición de una infección vírica en un sujeto que lo necesite. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención se efectúa (a) cultivando *ex vivo* una población de células NK con factores de crecimiento de células NK y una concentración eficaz de nicotinamida, en el que dicha concentración eficaz de nicotinamida potencia la proliferación de dichas células NK en comparación con dicha población de células cultivadas con factores de crecimiento sin dicha concentración de nicotinamida; y (b) administrando a dicho sujeto una cantidad terapéutica de dichas células NK cultivadas. Las infecciones víricas adecuadas para el tratamiento con células NK o con composiciones de células NK de la invención incluyen, pero sin limitación, HIV, virus de la coriomeningitis linfática (VCML), citomegalovirus (CMV), virus variolovacunal (*vaccinia*), virus gripal y paragripal, virus de la hepatitis (incluyendo hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, no A no B, etc.), virus del herpes simple, virus del herpes zóster, virus de Theiler y VSH-1. Otras enfermedades infecciones adecuadas para el tratamiento con células NK o con preparaciones de células NK de la presente invención, incluyen pero sin limitación, infecciones parasitarias tales como infecciones por *Plasmodium*, *Leishmania* y *Toxiplasma* e infecciones bacterianas tales como *Mycobacteria* y *Listeria* (para una revisión de células NK en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por virus, bacterias y protozoos véase Zucchini et al., Exp Rev Anti-Infect Ther 2008; 6: 867-85).

60 El trasplante de células hematopoyéticas se ha convertido en el tratamiento de elección para diversas enfermedades hereditarias o neoplásicas. Sin embargo, las composiciones de células hematopoyéticas son a menudo ricas en linfocitos T, lo que produce enfermedad de injerto contra huésped. Dado que estos pacientes que padecen neoplasias hematológicas, a menudo son deficientes en cuanto a números y función de células NK, la administración exógena de células NK junto con el trasplante de células hematopoyéticas está actualmente investigándose para potenciar la implantación prolongada y la prevención de enfermedad injerto contra huésped. Por tanto, en otra

realización adicional de la presente invención se proporciona un método de tratamiento o prevención de la enfermedad injerto contra huésped en un sujeto que lo necesite. Por tanto, en otra realización adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección autoinmune en un sujeto que lo necesite. El método de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se efectúa administrando a dicho sujeto una cantidad terapéutica de una población de células NK de la invención.

En la técnica se conocen protocolos clínicos para el tratamiento con células NK y tratamientos de combinaciones con poblaciones de células NK y CMH (células madre hematopoyéticas). Por ejemplo, recientes informes han establecido que las infusiones de células NK son inocuas y no causan EICH en el receptor. Un protocolo de este tipo implica la mieloablación, infusión de sangre incompatible con HLA (no desprovista de NK) enriquecida con NK, activada con IL-2, seguido de una doble infusión de sangre de cordón umbilical para la repoblación de CMH [véase Miller et al., Blood 2006; 108: 3111 (resumen)]. Los autores describieron que el trasplante de células NK, junto con CMH de sangre de cordón umbilical dio como resultado una implantación prolongada de las CMH.

Regímenes de tratamiento

De acuerdo con algunos aspectos de algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una población de células NK para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer metastásico, tumores sólidos, enfermedades autoinmunes, trastornos hiperproliferativos o una infección vírica, formuladas junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) poblaciones de células NK de la invención.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible de padecer, o de otra manera, en riesgo de padecer, una enfermedad o afección (es decir, una enfermedad hiperproliferativa o un tumor sólido) en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad hiperproliferativa o tumor sólido, disminuyendo la gravedad, o retrasando la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o los medicamentos se administran a un paciente susceptible de padecer, o que ya padece, dicha enfermedad, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas (bioquímicos, histológicos y/o conductuales) de la enfermedad, incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz. En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, normalmente los agentes se administran en varias dosis hasta que se consigue una respuesta antiproliferativa suficiente. Típicamente, la respuesta antiproliferativa se monitoriza y si la respuesta antiproliferativa comienza a desaparecer se dan dosis repetidas.

Dosificaciones eficaces

Las dosificaciones eficaces de una composición de una población de células NK para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, cáncer metastásico, tumores sólidos o un trastorno hiperproliferativo, descritos en el presente documento, varía dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, de si el paciente es un ser humano o un animal, de otras medicaciones administradas y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano aunque también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento requieren valorarse para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la administración con una población de células NK terapéutica, la dosificación varía de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 células NK por paciente. Para la administración con una población de células NK, la dosificación varía de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^9 células NK por kilogramo de peso del receptor, o la dosificación varía de aproximadamente 5×10^5 a aproximadamente 1×10^8 células NK por kilogramo de peso del receptor. Un régimen de tratamiento ejemplar conlleva la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran dos o más poblaciones de células NK simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada una de las poblaciones de células NK administradas se encuentra dentro de los intervalos indicados. Pueden producirse administraciones múltiples de poblaciones de células NK. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo los niveles en sangre de la población de células NK en el paciente. Como alternativa, las poblaciones de células NK pueden administrarse con una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso, se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varía dependiendo de la semivida de las poblaciones de células NK en un paciente. La dosificación y frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente aislados durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza, y preferentemente hasta que el paciente

muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de esto, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Vías de administración

5 Las composiciones de una población de células NK terapéutica para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer metastásico, tumores sólidos o un trastorno hiperproliferativo, pueden administrarse por vía intravenosa, intravesicular, intratecal, parenteral, tópica, subcutánea, oral, intranasal, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal o intramuscular. Como un profiláctico/adyuvante o para el tratamiento de una enfermedad, las poblaciones de células
10 NK terapéuticas se dirigen a un trastorno hiperproliferativo o a un tumor sólido, por ejemplo, una neoplasia genitourinario y/o un tratamiento terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es la vía subcutánea aunque pueden ser igualmente eficaces otras vías. La siguiente vía más habitual es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos del brazo o de la pierna. En
15 algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. La inyección intramuscular sobre infusión intravenosa se prefiere para la administración de una población de células NK. En algunos métodos, se inyecta una población de células NK particular, terapéutica, directamente en la vejiga urinaria.

Formulación

20 Las composiciones de una población de células NK para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer metastásico, tumores sólidos, infección vírica o un trastorno hiperproliferativo.

25 Las composiciones de una población de células NK terapéutica para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, cáncer metastásico, tumores sólidos o un trastorno hiperproliferativo se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, en diversos otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase, por ejemplo, Alfonso R Gennaro (ed), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Formerly Remington's Pharmaceutical Sciences) 20^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2003. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica que se desee. Las
30 composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que están definidos como vehículos, normalmente utilizados para formular las composiciones farmacéuticas para la administración en animales o en seres humanos. El diluyente se selecciona de tal manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Un ejemplo de un diluyente de este tipo es el medio X-vivo 20 (Cambrex Bio Science, Walkersville, Md,) que contiene suero AB humano
35 termoinactivado al 10 % o suero autólogo al 10 %. Otros ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros transportadores, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

40 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos tal como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como Seharose™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos transportadores pueden actuar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

45 Para la administración parenteral, las composiciones de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un transportador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal, como aceite en agua, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, en las composiciones puede haber sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los que se originan del petróleo, de animales, vegetales o sintéticos, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son transportadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Las poblaciones de células NK
50 terapéuticas pueden administrarse en forma de una inyección para depósito o una preparación para implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición ejemplar comprende una población de células NK terapéutica a 5 mg/ml, formulada en un tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH de 6,0 con HCl.

60 Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones líquidas o como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede estar emulsionada o encapsulada en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para potenciar el efecto adyuvante, como se ha indicado anteriormente. Langer, Science, 249: 1527, 1990; Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews, 28: 97-119, 1997. Los agentes de la presente invención pueden administrarse en forma de una preparación de inyección para depósito o
65 para implante que puede formularse de tal manera que se permita una liberación sostenida o pulsátil del principio

activo. Otras formulaciones adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y transportadores incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente del 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones adquieren la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 %-95 % del principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden una composición de la población de células NK terapéutica en una forma adecuada para la administración a un paciente. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en cumplimiento con todas las normativas de la buena práctica de fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practice*) de la administración de alimentos de medicamentos de Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*).

Toxicidad

Preferentemente, una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de la población de células NK descrita en el presente documento, proporcionará un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial.

La toxicidad de la población de células NK terapéutica descrita en el presente documento puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal al 50 % de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal al 100 % de la población). La proporción de la dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos en cultivos celulares y estudios con animales, pueden utilizarse en la formulación de un intervalo de dosificación que sea no tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación de la población de células NK terapéutica descrita en el presente documento se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la dosis eficaz con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración que se utilice. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarla el médico individual en función de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, Cap. 1, 1975).

Kits

En el alcance de la invención también se incluyen kits que comprenden las composiciones de la invención (por ejemplo, una población de células NK terapéutica) e instrucciones para su uso. Adicionalmente, el kit puede comprender al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno distinto del primer anticuerpo humano). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso al cual está destinado el contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado aplicado sobre o con el kit, o que de otra manera acompaña al kit.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significa "que incluye, pero sin limitación". Esta expresión incluye las expresiones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o el método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solamente si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición o método que se reivindica.

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una" y "el", "la" incluye las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo sus mezclas.

A lo largo de esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en el formato de intervalo es exclusivamente por comodidad y brevedad y no debe considerarse una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Sea cual sea el intervalo numérico que se indique en el presente documento, se entiende que incluye cualquier número citado (fracción o número integral) dentro del intervalo indicado. Las frases “que varía/varía entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que varía/varía de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se utilizan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen el primer y el

Como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada incluyendo, pero sin limitación, las maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos o ya desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los facultativos de los campos químico, farmacológico, biológico, bioquímico y médico.

Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” incluye la anulación, básicamente la inhibición, retraso o reversión de la progresión de una afección, básicamente la mejoría de los síntomas clínicos o estéticos de una afección o básicamente la prevención de la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Debe tenerse en cuenta que determinadas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, varias características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización se inoperativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención se han delineado anteriormente en el presente documento y, como se reivindica en la sección de reivindicaciones presentada más adelante, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención, incluye técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley y Sons, Nueva York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); en la bibliografía de patente y científica se describen ampliamente inmunoensayos disponibles, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) y “Methods in Enzymology” Vol. 1, 2, 317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se considera que los procedimientos indicados en el presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

Materiales y procedimientos experimentales

Muestras de sangre de cordón umbilical

Se obtuvieron células de sangre de cordón umbilical después de un parto a término (se dio un consentimiento informado). Se recogieron muestras y se congelaron en las 24 horas posteriores al parto. En resumen, se recogió sangre del cordón umbilical por gravedad de placentas expulsadas, la fracción rica en leucocitos se separó por centrifugación en gradiente de densidad, las células se mezclaron con DMSO (10 %) y después se congelaron a -80 °C. Antes de su uso, las células se descongelaron en tampón de Dextrano (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos)

que contenía albúmina de suero humano (HSA) al 2,5 % (Bayer Corp, Elkhart, IN, Estados Unidos) y se retiró el crioprotector.

Muestras de MO y sangre periférica

Se estratificaron células de médula ósea (MO) y de sangre periférica (SP) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml; Sigma) y se centrifugaron a 800 x g durante 30 min. Las células mononucleares en la capa de interfaz se recogieron y se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel) que contenía HSA al 0,5 %.

Enriquecimiento de células CD56+

Se estratificaron células de sangre de cordón umbilical (CU), médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml; Sigma) y se centrifugaron a 800 x g durante 30 minutos para la separación de las células mononucleares. Las células en la capa de interfaz se recogieron y se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel) que contenía HSA al 0,5 %. Para purificar las células CD56+, la fracción de células mononucleares se sometió a dos ciclos de separación con perlas inmunomagnéticas utilizando un kit de aislamiento de células progenitoras para CD56 CliniMACS o MiniMACS[®] (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, las células CD56+ se hicieron reaccionar con inmunoperlas magnéticas específicas de CD56+, se separaron con un separador magnético y se purificaron de las células no unidas por lavado. La pureza de la población de CD56+ obtenida de este modo es de aproximadamente un 92 %, evaluada por citometría de flujo.

Opcionalmente, las células no se separaron en el gradiente de Ficoll-Hypaque, sino que se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries) que contenía HSA al 0,5 % ("fracción mononuclear total"). En el último lavado, las células se incubaron con 50 µg/ml de rHu-DNAsa durante 10 minutos. Para purificar las células CD56+, las células se sometieron a dos ciclos de separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MidiMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza de la población CD56+ así obtenida es de aproximadamente un 92 %, evaluado por citometría de flujo.

Opcionalmente, las células de médula ósea se empobrecieron de células CD133+ o CD34+ por separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando "kit de aislamiento de células CD33 MidiMACS o CliniMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), y después la fracción negativa para CD133 o CD34 se enriqueció adicionalmente para las células NK sometiendo las células a dos ciclos de separación con perlas inmunomagnéticas utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MidiMACS o CliniMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Enriquecimiento de células CD56+CD3-

Se estratificaron células de sangre de cordón umbilical (CU), médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml; Sigma) y se centrifugaron a 800 x g durante 30 minutos para la separación de las células mononucleares. Las células en la capa de interfaz se recogieron y se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel) que contenía HSA al 0,5 %. Para purificar las células CD56+CD3-, la fracción de células mononucleares se sometió a separación con perlas inmunomagnéticas utilizando un kit de aislamiento de células progenitoras para CD56 CliniMACS o MiniMACS[®] (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas magnéticas específicas de CD56+, se separaron con un separador magnético y se purificaron de las células no unidas por lavado. La fracción de células CD56+ purificadas se sometió a una separación adicional con perlas inmunomagnéticas utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD3 MiniMACS o CliniMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas magnéticas específicas de CD3+, se separaron con un separador magnético, y las células CD56+CD3- se recuperaron en la fracción de células no unidas. La pureza de la población CD56+CD3- así obtenida es de aproximadamente un 85-97 %, evaluado por citometría de flujo.

Opcionalmente, las células no se separaron en el gradiente de Ficoll-Hypaque, sino que se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries) que contenía HSA al 0,5 % ("fracción mononuclear total"). En el último lavado, las células se incubaron con 50 µg/ml de rHu-DNAsa durante 10 minutos. Para purificar las células CD56+, las células se sometieron a dos ciclos de separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MidiMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza de la población CD56+ así obtenida es de aproximadamente un 92 %, evaluado por citometría de flujo. Para purificar las células CD56+CD3-, las células se sometieron a separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MiniMACS o CliniMACS[®]" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas

magnéticas específicas de CD56+, se separaron con un separador magnético y se purificaron de células no unidas por lavado. La fracción de células CD56+ purificadas se sometió a una separación adicional con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD3 MiniMACS o CliniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas magnéticas específicas de CD3, se separaron con un separador magnético y las células CD56+CD3- se recuperaron en la fracción de células no unidas. La pureza de la población CD56+CD3- obtenida de este modo es de aproximadamente un 85-97 %, evaluada por citometría de flujo.

Opcionalmente, las células de médula ósea se empobrecieron de células CD133+ o CD34+ por separación de perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células CD33 MidiMACS o CliniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), y después la fracción negativa para CD133 o CD34 se enriqueció adicionalmente de células NK sometiendo las células a dos ciclos de separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MidiMACS o CliniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para purificar las células CD56+CD3-, la fracción negativa para CD133 o CD34 se sometió a separación con perlas inmunomagnéticas, utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD56 MiniMACS o CliniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas magnéticas específicas de CD56+, se separaron con un separador magnético y se purificaron de las células no unidas mediante lavado. La fracción de células CD56+ purificadas se sometió a una separación adicional con perlas inmunomagnéticas utilizando un "kit de aislamiento de células progenitoras CD3 MiniMACS o CliniMACS" (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se hicieron reaccionar células CD56+ con inmunoperlas magnéticas específicas de CD3+, se separaron con un separador magnético y las células CD56+CD3- se recuperaron en la fracción de células no unidas. La pureza de la población CD56+CD3- así obtenida es de aproximadamente un 85-97 %, evaluada por citometría de flujo.

Empobrecimiento de células CD3+ o CD3+ CD19+ antes del cultivo

Para el procedimiento de empobrecimiento se estratificaron células nucleares totales de sangre de cordón umbilical (CU), de médula ósea (MO) o de sangre periférica (SP) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml; Sigma) y se centrifugaron a 800 x g durante 30 minutos para la separación de las células mononucleares. Se recogieron las células en la capa de interfaz y se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel), que contenía HSA al 0,5 %. Opcionalmente, las células no se separaron en gradiente de Ficoll-Hypaque, sino que se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Biological Industries, Israel), que contenía HSA al 0,5 % ("fracción mononuclear total"). Las células CD3 se empobrecieron utilizando el kit de aislamiento de células CD3 (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania) y se cultivó toda la fracción de células negativas para CD3. Opcionalmente, también se empobrecieron las células CD19 utilizando el kit de aislamiento de células CD19 (Miltenyi Biotec Bergisch, Gladbach, Alemania) y se cultivó la fracción de células negativas para CD3/CD19 (empobrecida en CD3/CD19). Opcionalmente, se utilizó el Cóctel de Empobrecimiento de Células CD3+ Humanas RosetteSep (Stem Cell Technologies, RosetteSep, Cat. N.º 15661) para el empobrecimiento de CD3 y se cultivó toda la fracción de células negativas para CD3. Después del empobrecimiento negativo, las células se contaron y se caracterizaron por análisis FACS.

Cultivos ex vivo:

1. La fracción total de células mononuclear se cultivó en bolsas de cultivo (American Fluoroseal Co. Gaithersburg, MD, Estados Unidos), en matraces de tipo T o en placas de 24 pocillos a una concentración de $0,5-2 \times 10^6$ células/ml en MEM α que comprendía FCS al 10 % FCS o SCGM CellGro (Cell Genix) que comprendía Suero Humano 5-10 %/Reemplazo FBS LiferCell® (Lifeblood Products) que contenía las siguientes citocinas recombinantes: interleucina-2 (IL-2) (5-50 ng/ml), interleucina-15 (IL-15), interleucina-7 (IL7), interleucina 21 (IL21), FLT-3 o SCF o FLT3 y SCF (Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, NJ, Estados Unidos), con o sin OKT-3 (10-50 ng/ml), con o sin nicotinamida (0,5-10 mM), y se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Cuando se utilizó OKT-3 en el cultivo, los cultivos se centrifugaron después de 5-7 días y las células se resuspendieron con el mismo medio excluyendo el OKT-3. Todos los cultivos se rellenaron semanalmente o dos veces a la semana con el mismo volumen de medio reciente que contenía los factores de crecimiento con o sin nicotinamida. Para el recuento, las células se tiñeron con azul de tripano. En diversos momentos, se tomaron muestras para ensayar las fracciones relativas de células NK, CD56+CD3-, CD56+CD3+, CD34+CD56+, CD56+CD16+ y/o células CD56+NKG2A. La morfología celular se determinó en frotis preparados con Cytospin (Shandon, Pittsburgh, PA, Estados Unidos) teñidos con soluciones de May-Grunwald/Giemsa.

2. Se cultivaron células CD56+ o CD56+CD3- purificadas de células mononucleares o nucleares totales o de la fracción empobrecida de células CD34+ o CD133+ en bolsas de cultivo, matraces de tipo T o placas de 24 pocillos a una concentración de $1-100 \times 10^4$ células/ml en MEM α /FCS al 10 % o SCGM CellGro (Cell Genix)/Suero Humano al 5 %/Reemplazo FBS LiferCell® (Lifeblood Products) que contenía las siguientes citocinas humanas recombinantes: interleucina-2 (IL-2) (5-50 ng/ml), interleucina-15 (IL-15), FLT-3 o SCF o FLT3 y SCF o IL-2 e IL-15 o IL-2 sola (Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, NJ, Estados Unidos), con o sin nicotinamida, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Los cultivos se rellenaron una o dos veces a la semana con el mismo volumen de medio reciente que contenía factores de crecimiento con o sin nicotinamida. Con el

tiempo, los cultivos se complementaron una o varias veces a la semana con IL-2 y/o IL-2 e IL-15. Para estimar el número de células en cultivo, se tiñeron muestras celulares con azul de tripano para el recuento. A diversos momentos, se tomaron muestras para análisis FACS para ensayar las fracciones relativas de células NK, CD56+CD3-, CD56+CD3+, CD34+CD56+, CD56+CD16+ y/o células CD56+NKG2A.

5 3. Se cultivó la fracción de células mononucleares empobrecida en CD3+ o empobrecida en CD3+/CD19+ de SP, MO y CU en bolsas de cultivo, matraces de tipo T o placas de 24 pocillos en una concentración de $1-1000 \times 10^4$ células/ml en MEM α /FCS al 10 % o SCGM CellGro (Cell Genix)/Suero Humano al 5 %/Reemplazo FBS LiferCell® (Lifeblood Products) que contenía las siguientes citocinas humanas recombinantes: interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-15 (IL-15), con o sin FLT-3 o SCF o FLT3 y SCF (5-50 ng/ml) (Perpo Tech, Inc., Rocky Hill, NJ, Estados Unidos), todas las combinaciones, con o sin nicotinamida y se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % en aire. Los cultivos se rellenaron semanalmente o dos veces por semana con el mismo volumen de medio reciente que contenía factores de crecimiento con o sin nicotinamida. Posteriormente, los cultivos se complementaron una o varias veces a la semana con IL-2 y/o IL-2 e IL-15. Para estimar el número de células en cultivo, se hizo un recuento de las muestras de células después de teñir con azul de tripano. A diversos momentos, se tomaron muestras para análisis FACS para ensayar las fracciones relativas de células NK, CD56+CD3-, CD56+CD3+, CD34+CD56+, CD56+CD16+ y/o células CD56+NKG2A.

10 4. La fracción total de células mononucleares, células purificadas CD56+ o CD56+CD3- procedentes de células mononucleares o nucleares totales o de la fracción empobrecida en CD34+ o CD133+ y empobrecida en CD3+, o la fracción de células mononucleares empobrecida en CD3+/CD19+ procedente de células SP, MO y CU también puede cultivarse en un biorreactor tal como una bolsa de biorreactor GE Wave o en matraces de cultivo permeables a gases (Wilson Wolf) a $1-10000 \times 10^4$ células/ml). El medio de cultivo contenía MEM α , Suero Humano (10 % v/v), IL-2 20 ng/ml, opcionalmente, IL-2 50 ng/ml y, opcionalmente, IL-15 con nicotinamida. Los cultivos se rellenaron semanalmente o dos veces a la semana con el mismo volumen de medio reciente que contenía factores de crecimiento con o sin nicotinamida. Posteriormente, los cultivos se complementaron una o varias veces a la semana con IL-2 y o IL-2 e IL-15 y las células se contaron y se tiñeron para análisis FACS después de 1, 2 y 3 semanas.

Cultivo de células NK con estroma irradiado

30 Las células NK de la fracción celular mononuclear total, células CD56+ o CD56+CD3- purificadas de células mononucleares o nucleares totales o de la fracción empobrecida en células CD34+ o CD133+, o de la fracción de células mononucleares empobrecida en CD3+, o empobrecida en CD3+/CD19+ de SP, MO y CU pueden cultivarse con estroma irradiado. Para la preparación del estroma irradiado (células alimentadoras), las células mononucleares se irradiaron con 3000 rad. Después de la selección de CD56+ o CD56+CD3- o del empobrecimiento de CD3, las células se contaron y se caracterizaron por análisis FACS como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las células se cultivaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento, con o sin nicotinamida, con y sin estroma irradiado a una concentración de células irradiadas de 20×10^5 células/ml.

Análisis FACS

40 Para el análisis FACS, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos fluorescentes: CD15 FITC, Cat. N.º 332778, CD14 FITC, Cat. N.º 345784, CD3 APC, Cat. N.º 345767, todas de Becton Dickinson (San José, CA, Estados Unidos), CD62L PE, Cat. N.º 304806 de BioLegend (San Diego, CA, Estados Unidos), CD56 FITC, Cat. N.º 11-0569-42 de eBioscience (San Diego, CA, Estados Unidos) y CD45 PE, Cat. N.º R7807 de Dako (Glostrup, Dinamarca).

45 Las células NK también se caracterizaron por CXCR4, KIR3, DL1/2, DL2/2, DL1, NKG2A, NKG2C, NKG2D, TRAIL, el receptor Fc-gamma IIIb, NKp44, NKp30, NKp46, Fas-L, L-Selectina, ficoeritrina, cadena γ del receptor de IL-2 (CD16), cadena VLA-5 α y CD8.

Cálculo del número de células NK sembradas el día 0

50 Para calcular el número de células NK el día 0, el número total de células sembradas el día 0 se multiplicó por el porcentaje de células CD56+/CD3- medido por FACS el día 0.

Cálculo del número de células NK en cultivo y aumento en veces 7, 14 y 21 días después de la siembra

60 Para determinar el número total de células el día 7, 14 y 21, el recuento celular/ml se multiplicó por el volumen del medio de cultivo. Para determinar el número de células NK en cultivo, el número total de células en cultivo se multiplicó por el porcentaje de células CD56+/CD3- medido con el FACS los días 7, 14 y 21. Para medir la expansión en veces, el número total de células NK los días 7, 14 y 21 se dividió entre el número total de células NK sembrado en cultivo el día 0.

Análisis de antígenos de superficie

Las células se lavaron con una solución de PBS que contenía BSA al 1 % y se tiñeron (a 4 °C durante 30 min) con anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o alofococianina (APC). Después, las células se lavaron en el tampón anterior y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos). Las células se pasaron a una velocidad de hasta 1000 células/segundo, utilizando un haz láser de argón de 488 nm o 661 nm como fuente de luz para la excitación. La emisión de 10⁴ células se midió utilizando amplificación logarítmica y se analizó utilizando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson). Las células teñidas con anticuerpos de control de isotipo conjugadas con FITC, PE y APC se utilizaron para determinar la fluorescencia de fondo.

Determinación de la funcionalidad de células NK

Ensayo de "destrucción": se combinaron células NK (células efectoras = E) con células K562 o BL2 (células diana = D), o con células de leucemia bifenotípica a una proporción E con respecto a D diferente (E:D). Las células diana de leucemia bifenotípica BL2 o K562 en PBS se marcaron con CFSE 1 ng/ml (Invitrogen) durante 15 min a 37 °C. Se añadió suero de ternero a las células durante 15 minutos, las células después se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI. Se colocaron 100 µl de células de leucemia bifenotípica, BL2 o K562 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 5X10³ células por pocillo. Se añadieron 100 µl de células NK no teñidas a las células de leucemia bifenotípica BL2 o K562 a una proporción E:D de 1:1, 2,5:1, 5:1, 10:1 o 20:1 (5X10³, 1,25X10⁴, 2,5X10⁴, 5X10⁴ y 1X10⁵ células/pocillo, respectivamente, según se indica). Entre 2-48 horas más tarde, se determinó la destrucción de las células diana en líneas celulares tales como K562 y BL-2 por FACS como un porcentaje de células marcadas con CFSE positivas para yoduro de propidio (PI) (muertas). La destrucción de las células de leucemia primarias se determinó contando con FACS el número de células teñidas con CFSE que permanecían en el cultivo después de su cultivo con las células NK. Un menor número de células CFSE+ es indicativo de un mayor nivel de destrucción.

Ensayo de quimiotaxis ("migración"): se ensayó la respuesta de migración (quimiotaxis) de células NK humanas por el ensayo de migración Transwell (Costar, Cambridge, MA; diámetro 6,5 mm, tamaño de poro 5 µm). En resumen, se añadieron 100 µl de tampón de quimiotaxis (RPMI 1640, FCS al 1 %) que contenía 2 x 10⁵ células NK a la cámara superior y 0,5 ml de tampón de quimiotaxis con o sin 250 ng/ml de factor derivado de estroma CXCL12 ("SDF-1") (R&D Systems) a la cámara superior. Se contaron las células que migraban dentro de un periodo de 4 horas a la cámara inferior del "transpocillo" durante 60 segundos utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Asentamiento (homing) e implantación "in vivo":

Se expandieron células NK con o sin nicotinamida 2,5 mM o 5,0 mM como se ha descrito anteriormente. Después de 2-3 semanas de cultivo, números similares (14x10⁶) de células se infundieron en ratones NOD/SCID irradiados (350 Rad). Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infusión. En el bazo, la médula ósea y la sangre periférica se analizó el asentamiento y la implantación de células NK humanas (CD45+CD56+) utilizando perlas inmunomagnéticas para diferenciarlas de las células endógenas. La implantación se expresó como % de células NK que tenía el linaje trasplantado (CD45+CD56+) utilizando anticuerpos específicos anti-humano del número total de células endógenas de ratón identificadas en el tejido.

Ensayo de expresión de CD62L sobre la superficie de células NK

Se iniciaron cultivos con células CD56+ procedentes de sangre periférica purificadas con perlas inmunomagnéticas y activadas con citocinas (incluyendo IL-2 e IL-15) con o sin nicotinamida (2,5, 5 y 7,5 mM). Las células NK se tiñeron con anticuerpos específicos para marcadores de superficie específicos (por ejemplo, CD62L) antes de la activación en cultivo y después de 3 semanas de incubación con nicotinamida, y después se monitorizaron por FACS.

ResultadosEJEMPLO I: La nicotinamida potencia la propagación ex vivo de células NK

Para evaluar el efecto de la nicotinamida añadida sobre el crecimiento *ex vivo* de células NK, se incubaron células de sangre de cordón umbilical o de médula ósea con factores de crecimiento (citocinas) y concentraciones crecientes de nicotinamida, sin células alimentadoras o capa alimentadora, y se midieron las fracciones de células NK y no NK (por ejemplo, CD3+) a diferentes momentos.

Se observó que las células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical eran ricas en la población de células NK CD56+CD3-, y contenían relativamente pocas células NKT CD56+CD3+. Cuando se incubaron células NK de sangre de cordón umbilical purificadas (CD56+) con nicotinamida en presencia de IL-2 e IL-15, fue evidente una proliferación significativamente aumentada de células NK ya a los 14 días de cultivo y a todas las concentraciones

ensayadas. La FIG. 1A muestra que la proliferación de células NK con nicotinamida 2,5 mM a los 14 días fue más de 4 veces mayor que la de las células incubadas con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo IL-2 e IL-15) solas, e incluso mayor con nicotinamida 5 mM. Cuando se ensayó un intervalo de concentraciones de nicotinamida más amplio (FIG. 1B), se descubrió que el cultivo de tres semanas con todas las concentraciones de nicotinamida de 0,5 mM a 5 mM potenciaba la proliferación de células NK, hasta 2,5 veces la de las mismas células incubadas con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo IL-2 e IL-15) solas.

La nicotinamida también pudo potenciar la proliferación de células NK de una población de células mononucleares de sangre de cordón umbilical mixta, no seleccionada. Los cultivos de células mononucleares de sangre de cordón umbilical no seleccionadas se complementaron con Flt-3 10 ng/ml, interleucina-15 (IL-15) 20 ng/ml, interleucina-2 (IL-2) 5 ng/ml, con o sin nicotinamida 0,5, 1, 2,5 y 5 mM. Para evaluar adicionalmente el efecto específico de la nicotinamida sobre la proliferación de células NK *ex vivo*, se realizó un análisis de las células propagadas después de tres semanas en cultivo, con y sin concentraciones crecientes de nicotinamida. Las FIG. 2A y 2B muestran la potenciación inducida por nicotinamida dependiente de la dosis claramente de la proliferación en cultivo de células CD56+/CD45+ y de células NK CD56+/CD3- procedentes de la fracción mononuclear. La FIG. 2C indica claramente la inhibición del crecimiento de células T CD3+/CD56- en cultivos tratados con nicotinamida, también de una manera dependiente de la dosis, mientras que las células CD3+ que crecieron en cultivos de control sin nicotinamida predominaron sobre las células NK. Por tanto, el cultivo de una población celular mixta de NK y CD3+ (por ejemplo, T y NKT) con nicotinamida da como resultado un mayor enriquecimiento del compartimento de células NK, mientras que el cultivo con citocinas solo, sin nicotinamida, confirma fuertemente la proliferación de células NK pero potencia la proliferación de células CD3+.

Se observó que las células de sangre periférica y de médula ósea contenían poblaciones heterogéneas de células CD56+ que contenían poblaciones tanto de células NKT CD56+/CD3+ como de células NK CD56+/CD3-. La proliferación de células NK derivadas de médula ósea se potenció de forma similar por incubación con nicotinamida. La caracterización de las células CD56+ purificadas de médula ósea inoculada muestra que aproximadamente el 20-60 % de las células muestra el fenotipo de células NKT (CD56+/CD3+) y el 40-80 % presenta el fenotipo de células NK (CD56+/CD3-) (variable entre diferentes muestras de MO). Por lo tanto, las células CD56+ derivadas de MO comprenden una población mixta de células NK y NKT. Aunque la proliferación de células NK en células CD56+ procedentes de médula ósea incubadas con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo FLT3, IL-2 e IL-15) solo apenas aumentó después de 14 días en cultivo, la proliferación de células NK en células CD56+ incubadas con factores de crecimiento y nicotinamida 2,5 mM aumentó un 50 % entre 14 días (factor de aumento = 8) y 21 días de cultivo (factor de aumento = 12) (FIG. 3). Un análisis adicional de subconjuntos CD56+/CD3- y CD56+/CD3- de las células cultivadas a los 21 días reveló una dominancia aplastante (mayor del 80 %) de células NK CD56+/CD3- con respecto a las células NKT CD56+/CD3+ en los cultivos tratados con nicotinamida, mientras que las células CD56+ de médula ósea incubada con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo FLT3, IL-2 e IL-15) solos eran predominantemente células NKT (CD56+/CD3+) y no NK (CD56+/CD3-) (FIG. 4A y 4B). Por tanto, el cultivo de poblaciones de células NK + NKT heterogéneas con nicotinamida produce una mayor propagación y enriquecimiento del compartimento de células NK, con una proliferación mínima de células NKT, mientras que el cultivo con citocinas solo sin nicotinamida no confirma una proliferación preferente de células NK.

La población de células NK citotóxicas CD56+/CD16+ ha demostrado ser capaz de mostrar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). El análisis de células CD56+/CD16+ procedentes de células CD56+ de médula ósea cultivadas con factores de crecimiento, con y sin nicotinamida 2,5 mM después de 14 y 21 días en cultivo, reveló un aumento significativo en la fracción de células NK que presentan el fenotipo CD56+/CD16+ sobre las células CD56+ procedentes de médula ósea incubadas con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo FLT3, IL-2 e IL-15) solo (véase la FIG. 5).

Cuando las células CD56+ procedentes de médula ósea se cultivaron *ex vivo* con factores de crecimiento ("citocinas") (incluyendo FLT3, IL-2 e IL15) y nicotinamida durante 7 días, fue evidente una potenciación de la proliferación del subconjunto de células NK CD56+/CD3- (FIG. 6A) y una disminución de la proliferación de células NKT CD56+/CD3+ (FIG. 6B) a una concentración de nicotinamida 1 mM, 2,5 mM y 5 mM. La proliferación de células NK CD56+/CD16+ a los 7 días fue la más potenciada con nicotinamida a una concentración de nicotinamida 2,5 mM y 5 mM (FIG. 6C).

La nicotinamida y la capacidad autorregeneradora de células NK de sangre periférica cultivadas

Cuando las células mononucleares de sangre periférica se empobrecieron de poblaciones CD3+ o CD3+/CD19+, se obtuvo una población enriquecida en células NK que comprendía 2-10 % de células NK, perteneciendo la mayoría de las células sembradas a los linajes de células mieloides. Después de 2-3 semanas en cultivo con nicotinamida, sin embargo, más del 90 % de las células en cultivo eran células NK (CD56+/CD3-).

La Figura 10 ilustra la expansión de células NK de sangre periférica (empobrecidas de células T) durante un periodo de cultivo de tres semanas, en presencia de citocinas (IL-2 o IL-2+IL-15), en cultivos aumentados (volúmenes de 10 ml en bolsas de cultivo). La expansión se ralentizó en todos los grupos durante los primeros 7 días de cultivo. Después de 14 y 21 días, la expansión de NK fue significativamente superior en cultivos tratados con nicotinamida

tanto 2,5 mM como 5 mM con respecto a los cultivos de control que crecían sin nicotinamida (NAM 0). Curiosamente, las células NK cultivadas con nicotinamida continuaron proliferando del día 14 al día 21, mientras que las células NK tratadas sin NAM dejaron de proliferar.

5 Cuando se iniciaron cultivos con un intervalo de densidades de siembra (2×10^5 , 5×10^5 y 10×10^5 células sembradas), se observó una intensa potenciación de la proliferación de células NK CD56+CD3- tanto a 2,5 mM como a 5 mM después de 21 días (Figura 11). El análisis FACS de los cultivos de células NK a los 21 días después de la siembra muestra una clara ventaja para la población de NK (CD56+/CD3-), del cultivo con nicotinamida tanto a 2,5 como a 5 mM. Obsérvese que incluso aunque el porcentaje de células NK aumentó en todos los grupos, la fracción de células no NK en cultivos tratados con nicotinamida es más pequeño en comparación con los cultivos de control sin nicotinamida (Figura 12).

Concentración de nicotinamida y expansión de células NK CD56+ purificadas procedentes de sangre de cordón umbilical

15 Cuando una fracción de células NK procedentes de sangre de cordón umbilical que se había purificado sobre perlas inmunomagnéticas para el fenotipo CD56+ se cultivó con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-2 e IL-15) solo (citocinas) o en presencia de concentraciones crecientes (NAM de 1 a 7,5 mM) de nicotinamida durante hasta 3 semanas, se observó que todas las concentraciones de nicotinamida ensayadas eran eficaces en la potenciación de la proliferación de NK en las células NK procedentes de sangre de cordón umbilical (véase la Figura 17), en comparación con los controles solo con citocina. Obsérvese el aumento dependiente de la dosis en la expansión de los cultivos expuestos a nicotinamida que continúa durante todo el periodo de cultivo, en comparación con los controles (citocinas). Por tanto, la potenciación con nicotinamida de la proliferación de células NK es eficaz para el cultivo NK *ex vivo* tanto a corto plazo como a largo plazo, no requiere una capa alimentadora o células alimentadoras, es evidente a lo largo de un intervalo de concentraciones de nicotinamida y puede utilizar células ricas en NK, una mezcla de células NK y células no NK (células T, CD3+, células NKT, etc.) o poblaciones de células mononucleares altamente heterogéneas como fuente, a partir de una diversidad de poblaciones de células de partida (por ejemplo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical), todas ellas importantes para proporcionar grandes cantidades de células NK para su uso terapéutico.

EJEMPLO II – La exposición *ex vivo* a nicotinamida potencia la función de células NK

35 Las células NK se caracterizan por la respuesta tanto a estímulos inhibidores como a estímulos activadores y la producción de células NK funcionales con citotoxicidad específica aunque eficaz es crítica para cualquier consideración de cultivo de células NK *ex vivo*. El efecto de la nicotinamida sobre la función de células NK se evaluó por su efecto sobre marcadores celulares y se ensayó utilizando la migración quimiotáctica "Transwell" y ensayos de "destrucción" de células diana. Para detectar cambios en la prevalencia de fracciones de células NK inhibitoras y activadoras, se cultivaron células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas en pocillos con factores de crecimiento [Flt-3 10 ng/ml, interleucina-15 (IL-15) 20 ng/ml, e interleucina-2 (IL-2) 5 ng/ml], con o sin 1, 2,5 y 5 mM de nicotinamida. Después de 3 semanas de cultivo, se detectó una reducción significativa y dependiente de la dosis en la prevalencia de la fracción celular CD56+NKG2A inhibitora entre las células NK en todas las concentraciones de nicotinamida, en comparación con células NK procedentes de sangre de cordón umbilical incubadas con factores de crecimiento (incluyendo FLT3, IL-2 e IL-15) solo (FIG. 7), lo que sugiere activación potenciada de las células NK con nicotinamida.

45 Las células NK funcionalmente competentes pueden caracterizarse por su quimiotaxis y potencial de citotoxicidad. Para evaluar el efecto de la nicotinamida sobre la función de las células NK, se realizaron ensayos de migración *in vitro* (quimiotaxis) y de destrucción (citotoxicidad).

50 La migración de las células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical purificadas con perlas inmunomagnéticas cultivadas con factores de crecimiento y 2,5 o 5 mM de nicotinamida, en respuesta a estímulos de SDF 250 ng/ml, se potenció enormemente en comparación con la migración de células CD56+ cultivadas con factores de crecimiento solos (FIG. 8A). Además, las células CD56+ cultivadas con nicotinamida presentaron una mayor motilidad en ausencia de estímulos SDF.

55 Se investigó el efecto de la nicotinamida sobre los receptores de la superficie celular funcionalmente relacionados. Cuando la expresión de receptores migratorios (CXCR4), de adhesión (CD49e) y de tránsito (CD62L) en las células NK procedentes de sangre de cordón umbilical cultivadas se analizó utilizando anticuerpos específicos y análisis FACS, la expresión potenciada fuertemente de CXCR4 y CD62L y la expresión elevada de CD49e (FIG. 8B) en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con los controles (solo citocinas) sugiere fuertemente una capacidad aumentada de las células tratadas con nicotinamida para migrar y asentarse en la médula ósea, órganos linfoides y otros órganos, y podría predecir un proceso de migración específico de sitio superior *in vivo* y actividad de células NK cultivadas con nicotinamida.

65 Cuando se analizó la expresión del receptor de tránsito (CD62L) sobre la superficie de poblaciones de células NK de sangre periférica empobrecidas en células T (empobrecidas en CD3 o CD3/CD19) cultivadas en presencia de

nicotinamida, se observó la expresión elevada de este receptor en comparación con las células de control (citocinas). Tanto a una concentración 2,5 mM como a 5 mM de nicotinamida, se observó un mayor porcentaje de células CD62L-positivas entre las células NK después de 7 (Figura 13A), 14 (Figura 13B) y 21 (Figura 13C) días en cultivo, mientras que el porcentaje de células NK que expresaban CD62L en los controles solo con citocinas se redujo del 20 % después de 7 días a menos del 10 % después de 21 días de cultivo.

La Figura 20 muestra el nivel de expresión del receptor de tránsito CD62L sobre células CD56+ purificadas en inmunoperlas, procedentes de sangre periférica, antes de la activación en cultivo con IL-2, el descenso drástico en el nivel de expresión de CD62L seguido de la activación con IL-2 y el notable aumento en la expresión de CD62L después de la activación en cultivo con IL-2 y concentraciones crecientes de nicotinamida (2,5 - 7,5 mM). Los cultivos se iniciaron con células CD56+ procedentes de sangre periférica purificadas con perlas inmunomagnéticas y se mantuvieron en presencia de citocinas solo (incluyendo IL-2 e IL-15) (véase la Figura 20, columna "0") o citocinas más nicotinamida (2,5, 5 y 7,5 mM). Antes del cultivo, y después de 3 semanas en cultivo, las células NK se tiñeron con anticuerpos de CD62L específicos, y después se monitorizaron por FACS. Obsérvese la expresión drásticamente potenciada de CD62L en células cultivadas en presencia de nicotinamida en comparación con los controles (solo citocinas, "0"). El recuadro indica los datos del análisis FACS, que muestran la distribución de CD62L representada frente a la de CD56.

Se evaluó el potencial destructor de las células NK, ensayado utilizando células diana K562 marcadas con CFSE, para células CD56+ procedentes de sangre de cordón umbilical con factores de crecimiento con y sin nicotinamida. A proporciones E:D de 1:5, 1:10 y 1:20 células NK por diana, el potencial destructor (citotóxico) de las células NK procedentes de sangre de cordón cultivadas con factores de crecimiento y nicotinamida fue bastante superior que el del mismo número de células cultivado en factores de crecimiento solo (FIG. 9). Células recientes no cultivadas apenas presentaron potencial destructor.

El potencial destructor de las células NK de sangre periférica se evaluó utilizando células diana BL2 y K562 marcadas con CFSE para células CD56+ procedentes de sangre periférica cultivadas con factores de crecimiento con y sin nicotinamida 2,5 mM o 5,0 mM durante 3 semanas. La muerte de las células diana se monitorizó por FACS como un porcentaje de células marcadas con CFSE positivas a PI. A proporciones E:D de 1:1 a 10:1 células NK por diana, el potencial destructor (citotóxico) de las células NK procedentes de sangre periférica expandidas cultivadas con factores de crecimiento y con nicotinamida fue bastante mayor que el del mismo número de células cultivadas solo en factores de crecimiento (Figura 15A).

El potencial citotóxico de células NK expandidas de sangre periférica también se demostró utilizando células de leucemia bifenotípica primaria humana (en la que >90 % de las células son células T CD3+) como células diana. Las Figuras 15B y 15C muestran los resultados, después de 24 horas, utilizando células NK de 2 donantes distintos (Donante A y Donante B), indicando una activación aumentada del potencial de destrucción de las células NK mediante cultivo con nicotinamida. La ausencia de cualquier potencial destructor en las células de control NK cultivadas del Donante A es una indicación adicional del fuerte efecto activador de la nicotinamida sobre las células NK.

El potencial citotóxico de células NK procedentes de sangre periférica expandida con nicotinamida hacia células de tumores sólidos, una importante diana terapéutica, se demostró utilizando células de adenocarcinoma colorrectal colo205 como células diana. La Figura 15D muestra el potencial destructor aumentado mediante el cultivo de células NK con nicotinamida 5 mM a todas las proporciones E:D ensayadas (1:1 a 10:1).

Considerados en conjunto, estos resultados indican que la exposición de células CD56+ a nicotinamida no solo aumenta la proliferación de las células NK y específicamente la proliferación de la población de células CD56+CD62L, sino que las células propagadas en presencia de nicotinamida tienen una mayor motilidad, una mayor migración dirigida y un mayor potencial citotóxico que células similares cultivadas solo con factores de crecimiento, sin nicotinamida. Adicionalmente, los resultados mostrados en el presente documento indican que la nicotinamida es eficaz para potenciar la proliferación y la funcionalidad de células NK bien purificadas o bien de una fracción de células mononucleares total, y de diversas fuentes tales como sangre periférica, médula ósea o sangre de cordón umbilical.

Ejemplo III – Efecto de la nicotinamida sobre la proliferación de células NK cultivadas con células alimentadoras

Las células NK también pueden cultivarse con células alimentadoras. El efecto de la nicotinamida sobre la proliferación y funcionalidad de las células NK se evaluó en co-cultivo con células alimentadoras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

En general, el cultivo con células alimentadoras se realiza de la siguiente manera: las poblaciones de células que contenían NK (por ejemplo, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea) se cultivaron en presencia de células alimentadoras de CMSP irradiadas alogénicas o autólogas a una proporción de 10:1-100:1 células alimentadoras:cultivadas, con una combinación de citocinas que incluían FLT3, IL-2 y/o IL-17 y concentraciones crecientes de nicotinamida (0,5-10 mM). Los cultivos se mantuvieron durante 2-5 semanas y el efecto de la

nicotinamida en cultivos de células alimentadoras se evaluó basándose en la distribución de células NK y no NK y subconjuntos (por ejemplo, CD56+, CD3+, CD56+CD3-, CD56+CD16+) y la función de las células NK (por ejemplo, quimiotaxis, citotoxicidad). La proliferación y funcionalidad aumentadas de las células NK cultivadas con nicotinamida en cultivos con células alimentadoras indica la utilidad adicional de la nicotinamida para la propagación de células NK en cultivo.

Para evaluar el efecto de la nicotinamida sobre el cultivo de células NK con células alimentadoras, se expandieron fracciones de células NK de sangre periférica en co-cultivo con células de estroma irradiado con y sin nicotinamida, y se ensayó la expansión en veces, los marcadores de superficie CD56 y CXCR4 y la caracterización funcional.

Las fracciones de células mononucleares procedentes de sangre periférica se empobrecieron en CD3 y después se seleccionaron las células CD56+ por purificación con inmunoperlas. Siempre se conservó una proporción de las células mononucleares de la misma unidad de sangre y se irradió a 3000 rad para proporcionar células mononucleares irradiadas. Las células NK CD56+ se sembraron con fracciones de células mononucleares procedentes de sangre periférica irradiada a una proporción de células mononucleares de sangre periférica irradiada con respecto a células seleccionadas CD56 de 10:1. Los cultivos se complementaron con IL-2, IL-15 y Flt-3 con y sin nicotinamida (2,5 y 5 mM).

Después de 21 días en cultivo con las células alimentadoras irradiadas, se apreció una clara ventaja sobre los cultivos complementados con nicotinamida. El factor de aumento el día 21 de las células NK cultivadas en presencia de nicotinamida tanto 2,5 mM como 5 mM fue de al menos 4 veces el del control (citocinas + células mononucleares irradiadas), con respecto al día 0 (véase la Figura 20). El co-cultivo de las células NK con células mononucleares irradiadas, en presencia de nicotinamida, también produjo un aumento notable en la expresión de marcadores de superficie CXCR4 (véase la Figura 21) y CD62L (véase la Figura 22). Por tanto, las células NK expandidas con nicotinamida, en presencia de células mononucleares irradiadas y citocinas demostraron un potencial migratorio (CXCR4) y de tránsito (CD62L) potenciado.

Cuando las células NK expandidas se ensayaron para determinar el potencial destructor *ex vivo* de células diana K562, se observó la capacidad citotóxica aumentada a una proporción de 5:1, 2,5:1 y 1:1 células NK por célula diana (véase la Figura 23). La muerte de células diana se monitorizó por FACS como un porcentaje de células marcadas con CFSE positivas a PI. El mayor potencial destructor de células diana en comparación con el control (solo citocinas), sugiere fuertemente una activación potenciada del potencial destructor de las células NK por cultivo con nicotinamida y células mononucleares irradiadas. Por tanto, se observaron la misma potenciación de la proliferación y funcionalidad cuando las células NK se cultivaron en presencia de nicotinamida, con o sin células alimentadoras adicionales.

En su conjunto, estos resultados indican que los efectos observados en cultivos de células NK tratados con nicotinamida son distintos y mayores que los efectos del cultivo de células NK con células alimentadoras. El cultivo de células NK con nicotinamida, con o sin células alimentadoras, no solo produce una proliferación *ex vivo* aumentada, sino también un potencial funcional potenciado (por ejemplo, expresión CD62L y CXCR4) de las células NK expandidas, importante para el trasplante y la eficacia clínica de un tratamiento de inmunoterapia adoptivo con células NK.

Ejemplo IV – Efecto de la nicotinamida sobre la proliferación de células no NK en cultivos de células NK iniciados con CMN empobrecidas en CD3 o CD3CD19

Los métodos para la expansión de células NK en cultivo para su uso en un entorno clínico, deben ser algo específicos para la población de células NK, para prevenir la contaminación por células no NK que también proliferan debido a las condiciones de cultivo celular. El efecto de la nicotinamida sobre las células no NK se evaluó monitorizando poblaciones de monocitos y granulocitos en cultivos de células NK expuestos a nicotinamida 2,5, 5 y 7,5 mM.

Las Figuras 14A y 14B ilustran el efecto de la nicotinamida en la reducción de los porcentajes de contaminación de células de monocitos (CD14+, Figura 14A) y granulocitos (CD15+, Figura 14B) en cultivos de células NK de 14 días tratados con nicotinamida en comparación con sus porcentajes en cultivos no tratados con NAM. Sorprendentemente, el cultivo de las células NK con nicotinamida dio como resultado una supresión mayor del 50 % de la proliferación de CD14 y CD16 en los cultivos de 14 días.

Cuando la proporción de diferentes subconjuntos de linfocitos, agrupados de acuerdo con los marcadores de superficie celular (CD56, CD3) presentes en cultivos se inició con células NK de sangre periférica purificadas CD56+ y mantenidos en ausencia (citocinas, "NAM 0") o presencia de nicotinamida (NAM 2,5, NAM 5,0) se ensayó tres semanas después del inicio, se observó una reducción en la fracción de células no NK, tales como células T CD3+ y células NKT CD3+CD56+, con una concentración de nicotinamida creciente (véase la Figura 18 y la Figura 18B, recuadro). Las células NK cultivadas con nicotinamida inhibieron las células CD3+ con una mayor eficacia que las células NK no expuestas a nicotinamida. Los cultivos se mantuvieron con citocinas (incluyendo Flt-3, IL-15 e IL-2)

con o sin concentraciones crecientes (2,5 a 7,5 mM) de nicotinamida durante 3 semanas, se hicieron reaccionar con anticuerpos específicos de marcadores de superficie, y después se analizaron por FACS para fenotipos específicos.

5 Esta reducción de contaminación de células CD14 y CD15, que a menudo se asocia con la enfermedad de injerto frente a huésped, NKT y células T, puede ser un importante aspecto de algún protocolo clínicamente útil para la expansión de células NK en cultivo, ya que puede reducir la necesidad de un extensivo empobrecimiento de células T, monocitos y granulocitos antes de la implantación, y adicionalmente reducir la enfermedad de injerto frente a huésped y complicaciones relacionadas en el hospedador.

10 Ejemplo V – Efecto de la nicotinamida sobre la proliferación y función de NK en cultivo iniciado con células progenitoras/madre hematopoyéticas purificadas

15 La potenciación por la nicotinamida de la proliferación y la funcionalidad de las células NK en células de linaje hematopoyético puede evaluarse por exposición adicional de poblaciones de células hematopoyéticas tratadas con nicotinamida a nicotinamida y factores de crecimiento apropiados en cultivo.

Los cultivos se iniciaron con células madre y/o progenitoras hematopoyéticas (por ejemplo, células CD34+ o CD133+), y se complementaron con una combinación de citocinas incluyendo TPO, FLT3, SCF y/o IL7 y/o IL15 durante una o dos semanas, con o sin concentraciones crecientes de nicotinamida (0,5-10 mM). Después de este periodo, los cultivos se complementaron durante un periodo adicional (por ejemplo, 2-3 semanas) con una combinación de citocinas incluyendo FLT3, IL7, IL15, IL21 y/o IL-2, con y sin concentraciones crecientes de nicotinamida (0,5-10 mM). Para evaluar el efecto de la nicotinamida sobre la proliferación y la funcionalidad de las células NK procedentes del linaje hematopoyético cultivadas, se monitorizó la distribución de células NK y no NK y subconjuntos (por ejemplo, CD56+, CD3+, CD56+CD3-, CD56+CD16+) y la función de células NK (por ejemplo, quimiotaxis, citotoxicidad) en las poblaciones de células cultivadas.

25 Ejemplo VI – Implantación y potencial terapéutico de células NK cultivadas con nicotinamida

30 Se ensayaron células NK expandidas en presencia de nicotinamida con respecto a la localización en órganos diana e implantación en los órganos *in vivo* después del trasplante de células NK en hospedadores vivos.

Ratones NOD/SCID irradiados (350 Rad) recibieron 15×10^6 células de cultivos NK de sangre periférica humana (con empobrecimiento de células T) mantenidas durante hasta 3 semanas con nicotinamida (NAM 2,5 mM y NAM 5 mM) o sin nicotinamida (NAM 0). Después del sacrificio de los ratones 4 días después de la infusión, se evaluaron las muestras de bazo, médula ósea y sangre periférica por FACS para la determinar la presencia de células NK humanas (CD56+CD45+) utilizando anticuerpos específicos humanos. La Figura 16 muestra la localización aumentada y la implantación en los tejidos diana apropiados de las células NK expandidas con nicotinamida, expresadas como porcentaje del total de células NK del órgano indicado, demostrando la mayor concentración de nicotinamida un fuerte efecto. Por tanto, el cultivo de células NK con nicotinamida no solo aumenta el número de células NK, sino que sirve para aumentar su potencial funcional *in vivo*, como se demuestra por la localización e implantación en los órganos diana (por ejemplo, bazo, médula ósea y sangre periférica).

45 En estudios adicionales, también puede realizarse la transfusión de células NK o CD56+ humanas recientes no cultivadas, así como cultivadas, sobre un intervalo de dosis que pretende conseguir un trasplante subóptimo y la posterior ausencia de implantación en una fracción de ratones o su descendencia. Pueden evaluarse el asentamiento y la retención de células NK humanas 4 horas y hasta 4 semanas después del trasplante, por ejemplo, de acuerdo con los antígenos CD45 o CD45CD56 humanos. Utilizando la dosis subóptima, pueden administrarse células NK cultivadas con nicotinamida y puede registrarse el efecto sobre el asentamiento y la retención en la SP, MO y órganos linfáticos de los receptores y compararse con el asentamiento y la retención de células NK cultivadas sin nicotinamida (solo citocinas) o células NK recientes.

50 El potencial antitumoral *in vivo* de células NK cultivadas con nicotinamida puede evaluarse utilizando diversos modelos tumorales animales tales como leucemia mielógena (K562), linfoma de Burkitt (BL2), cáncer pancreático humano (BxPC-3 y Panc-1), cáncer de mama humano y xenotrasplantes de cáncer colorrectal – se monitoriza el crecimiento de tumores sólidos xenotrasplantados a diferentes momentos después de infusión de la población de células NK de la invención. El potencial metastásico de los tumores xenotrasplantados también se evalúa después de la infusión de las células NK. El efecto de las células NK sobre los modelos de leucemia y síndrome mielodisplásico puede evaluarse directamente, utilizando la infusión de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 o más células NK cultivadas por kg de ratón, o evaluarse para mejorar la eficacia de la repoblación de médula ósea postablación cuando se infunden junto con progenitores hematopoyéticos, médula ósea, células madre y similares.

60 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es obvio que para los expertos en la materia serán evidentes muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Por consiguiente, se pretende incluir todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que se encuentran dentro de la esencia y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

65

Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe considerarse una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En el sentido en el que se utilizan los encabezamientos de las secciones, estos no deben considerarse como necesariamente limitantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de cultivo *ex vivo* de células destructoras naturales (NK), comprendiendo el método cultivar una población de células que comprende células NK con al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en SCF, Flt-3, IL-2, IL-15, IL-7, IL-12 e IL-21 y nicotinamida de 0,5 a 25 mM, durante 1 día a 35 días.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha concentración de dicha nicotinamida es de 1,0 a 10 mM.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en el que dicho cultivo dura 2 semanas después de la siembra.
4. El método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un factor de crecimiento es IL-2, la duración de dicho cultivo es de 2 a 3 semanas después de la siembra y dicha concentración de dicha nicotinamida es de 5 mM.
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la población de células que comprende dichas células NK se obtiene a partir de una fuente seleccionada del grupo que consiste en sangre de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica.
- 20 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha población de células que comprende dichas células NK es una población de células heterogénea que comprende una fracción de células NK y una fracción de células CD3+.
7. El método según la reivindicación 6, en el que dicha fracción de células CD3+ es mayor que dicha fracción de células NK.
- 25 8. El método según la reivindicación 6, en el que dicha fracción de células NK es mayor que dicha fracción de células CD3+.
9. El método según la reivindicación 8, en el que dicha población de células que comprende dichas células NK es una población de células mononucleares o nucleares totales desprovista de células CD3+.
- 30 10. El método según la reivindicación 7, en el que dicha población de células que comprende dichas células NK es una población de células mononucleares o nucleares totales desprovista de células CD3+ y CD19+.
- 35 11. El método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un factor de crecimiento es IL-2 o IL-15 o tanto IL-2 como IL-15.
12. El método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un factor de crecimiento comprende SCF, IL-15 e IL-12.
- 40 13. Una población de células NK cultivadas de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por un parámetro seleccionado del grupo que consiste en:
- 45 (a) expresión de CD62L en al menos 30 % de dicha población de células, detectada por inmunodetección y citometría de flujo;
- (b) una proporción de células CD3+ con respecto a CD56+/CD3- igual a o menor que 1:100; o
- (c) tanto (a) como (b).
- 50 14. La población de células NK cultivadas según la reivindicación 13, en la que la infusión de células de dicha población de células NK en un hospedador de ratón SCID irradiado da como resultado un asentamiento e implantación de al menos 50 % mayor en el bazo, detectado por inmunodetección y citometría de flujo, 4 días después de la infusión en comparación con la infusión de una población de células NK cultivadas en condiciones de cultivo de otra manera idénticas, con menos de 0,1 mM de nicotinamida.
- 55 15. La población de células NK cultivadas según la reivindicación 14, adicionalmente caracterizada por expresión de CD62L en al menos 30 % de dicha población de células en el momento de la infusión, detectada por inmunodetección y citometría de flujo.
- 60 16. La población de células NK cultivadas según la reivindicación 14, adicionalmente caracterizada por una proporción de células CD3+ con respecto a CD56+/CD3- igual a o menor que 1:100 en el momento de la infusión.
17. La población de células NK cultivadas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, para su uso en la inhibición de un crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite.
- 65 18. La población de células NK cultivadas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección vírica en un sujeto que lo necesite.

19. La población de células NK cultivadas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto que lo necesite.

5 20. La población de células NK cultivadas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección autoinmune en un sujeto que lo necesite.

21. La población de células NK cultivadas según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección leucémica en un sujeto que lo necesite.

10 22. Un método de transducción de células NK cultivadas *ex vivo* con un exógeno, comprendiendo el método:

(a) el cultivo *ex vivo* de una población de células NK de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7-12; y

(b) la transducción de dicha población de células NK cultivadas con el exógeno.

15

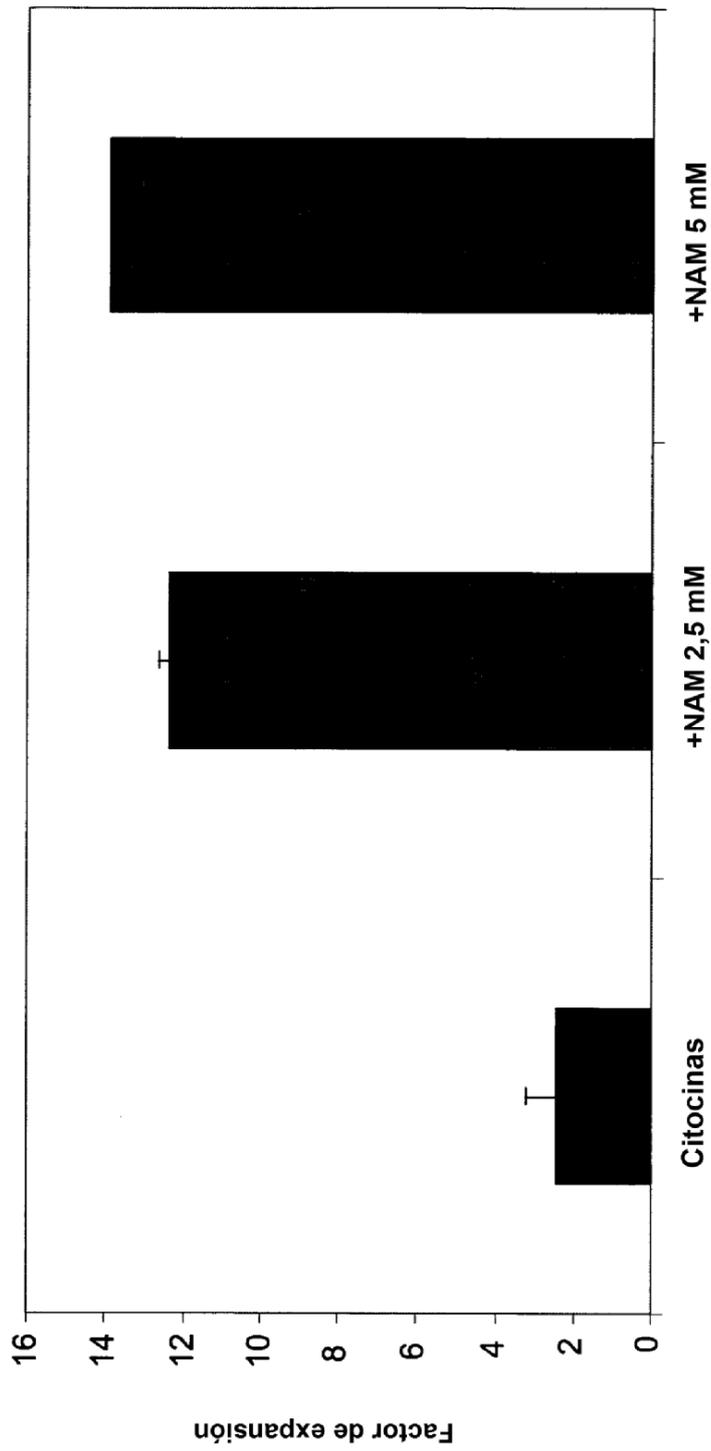


FIG. 1A

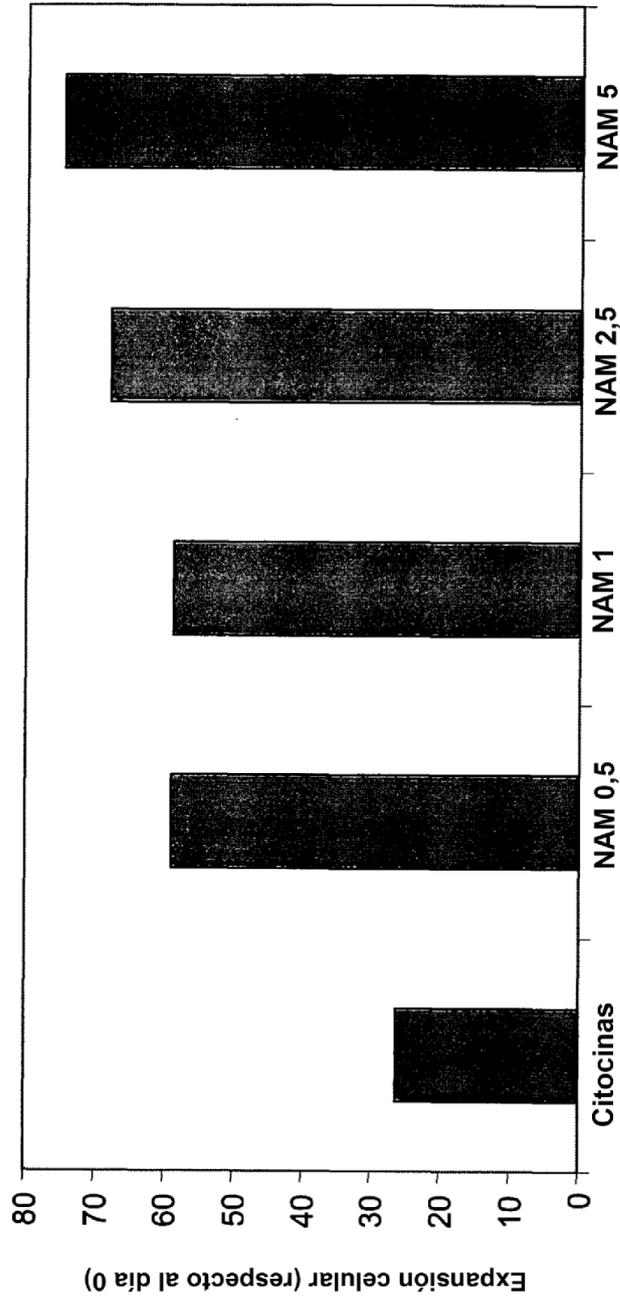


FIG. 1B

FIG. 2A

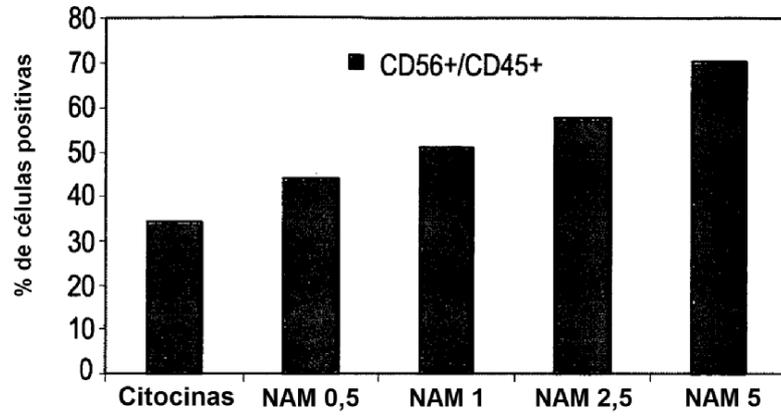


FIG. 2B

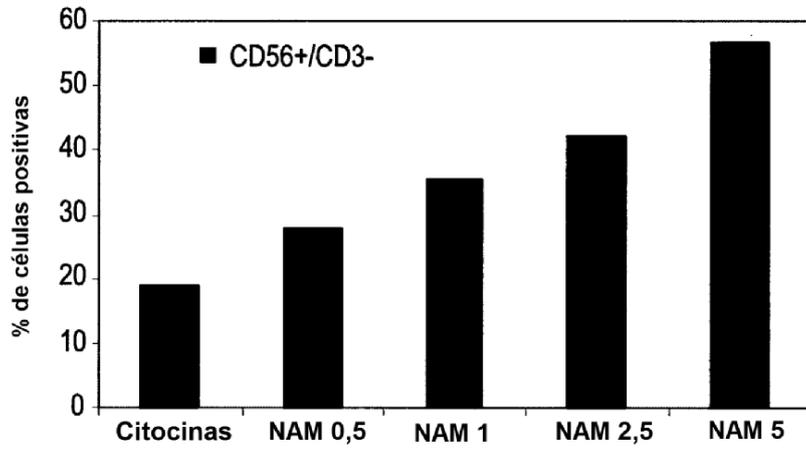
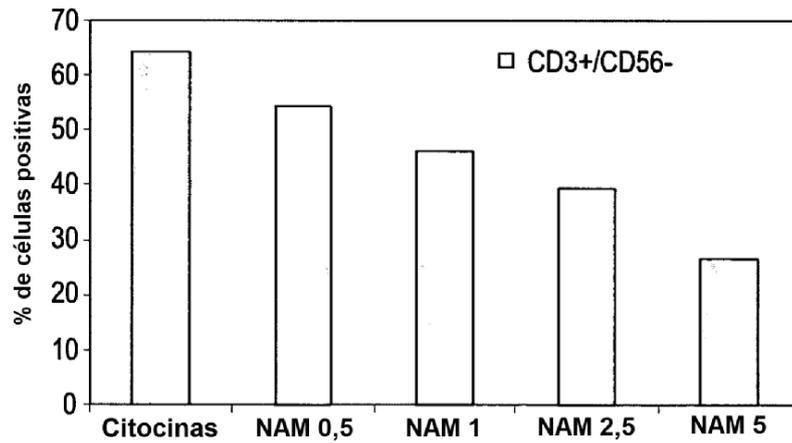


FIG. 2C



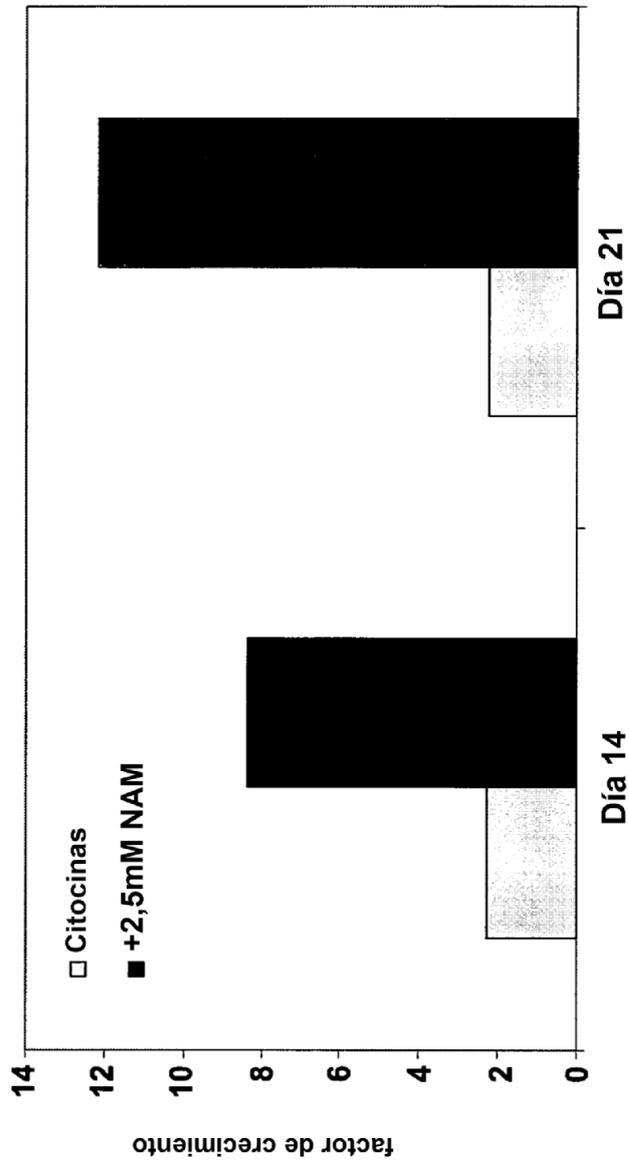


FIG. 3

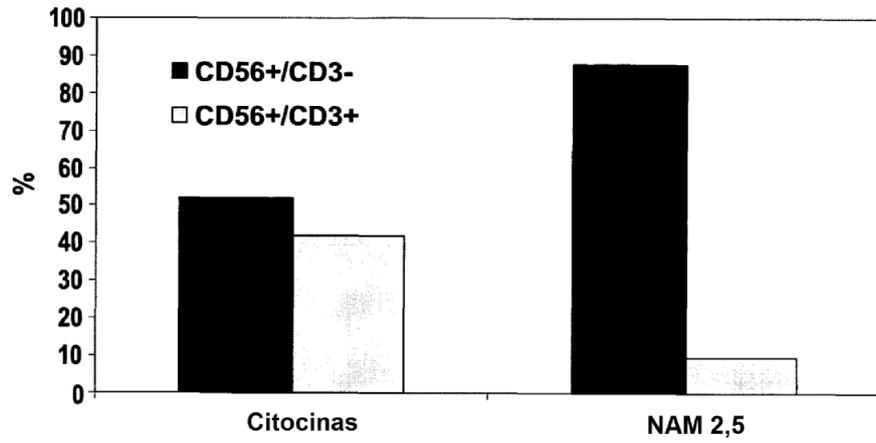


FIG. 4A

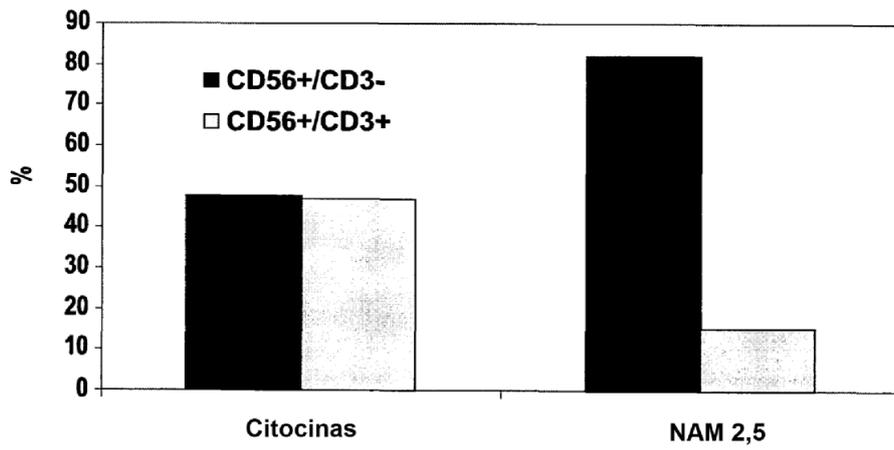


FIG. 4B

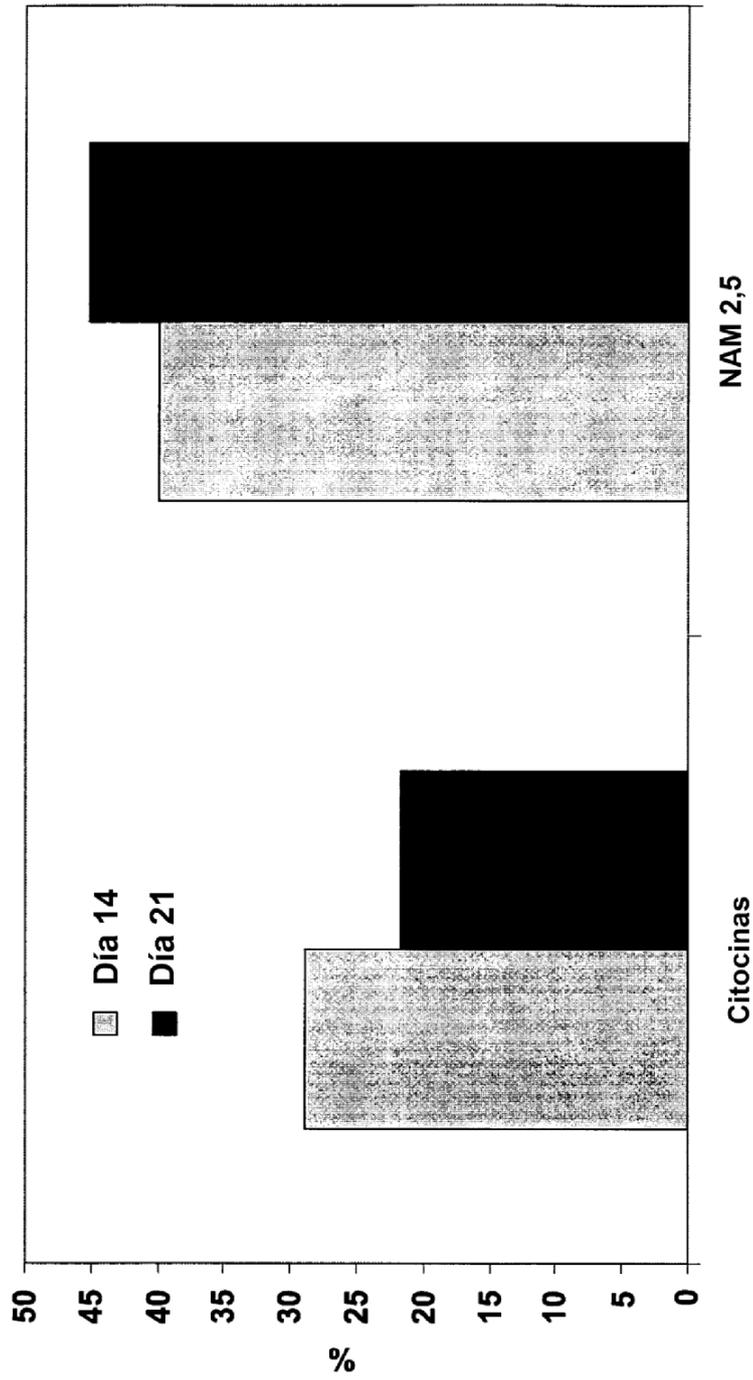


FIG. 5

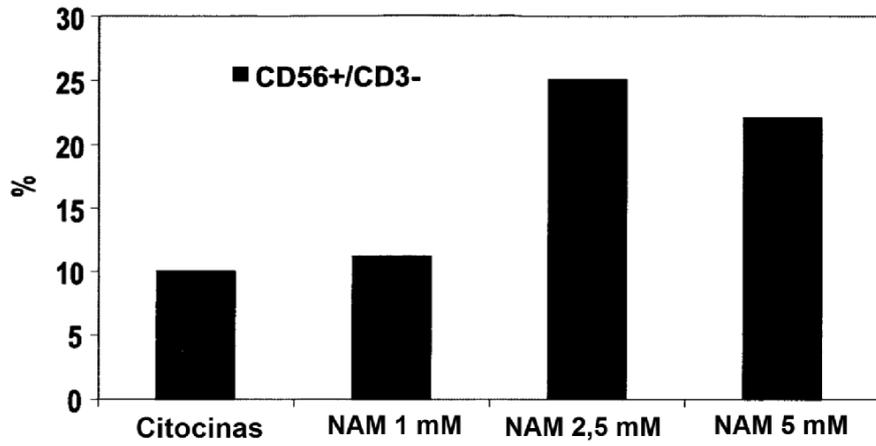


FIG. 6A

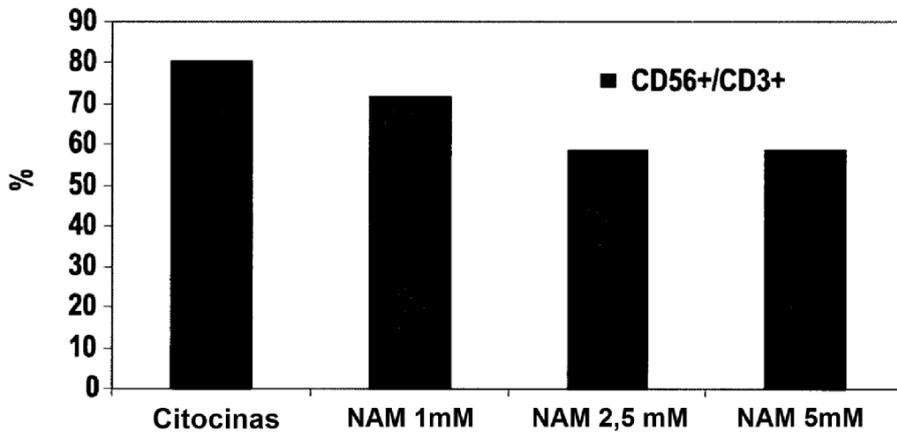


FIG. 6B

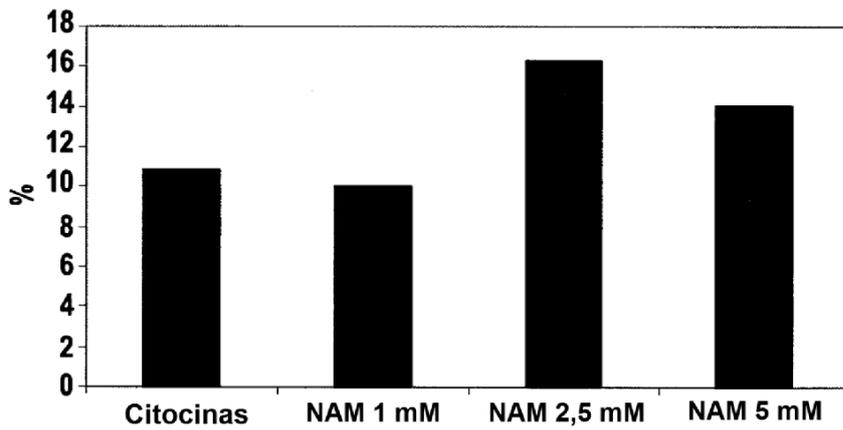


FIG. 6C

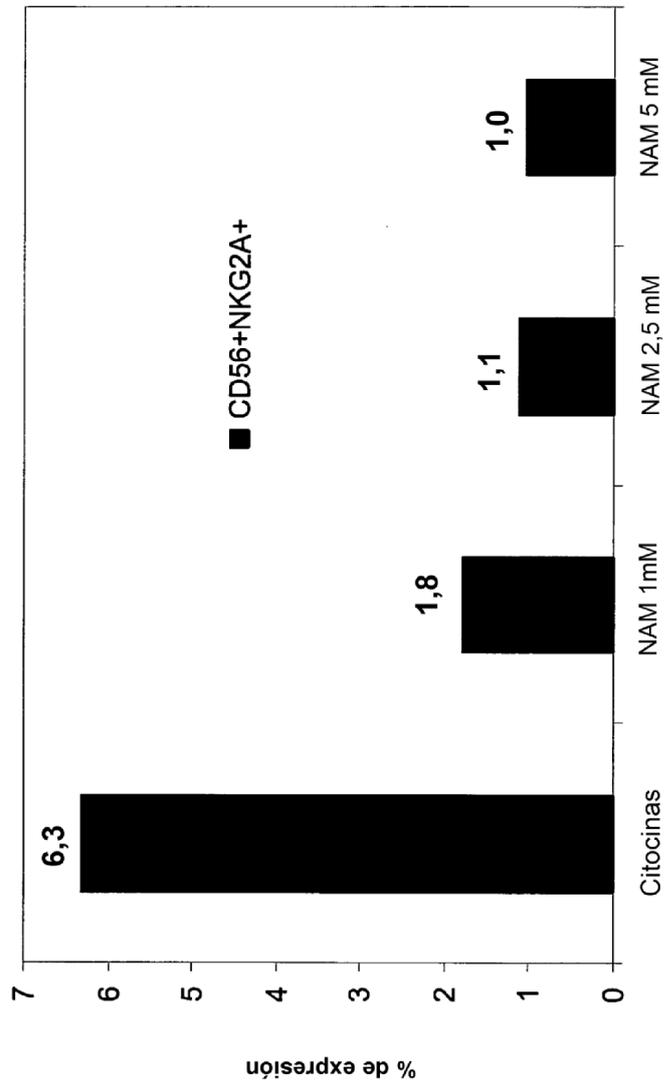


FIG. 7

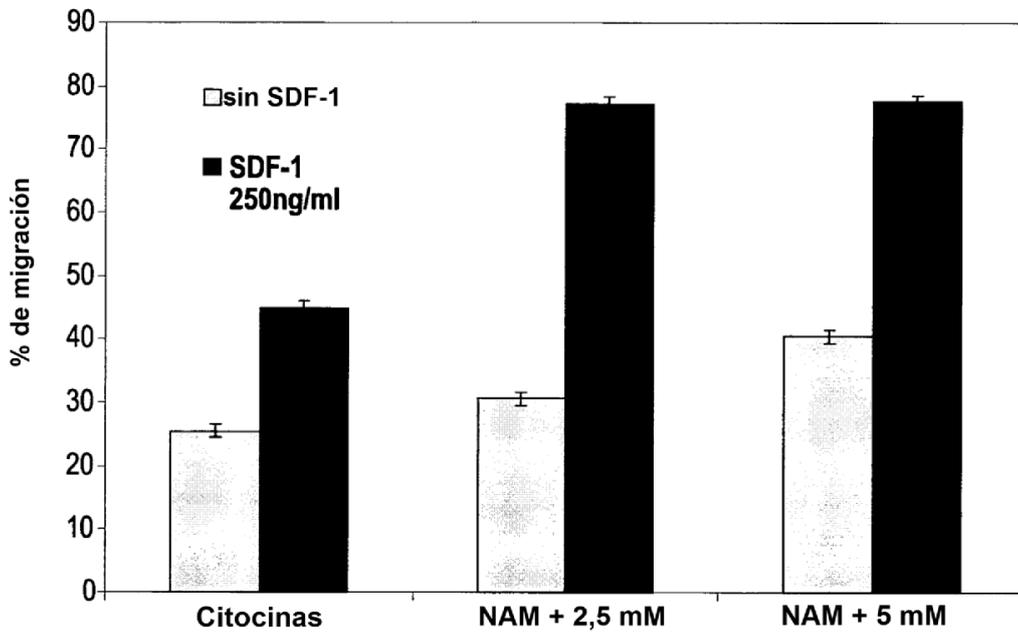


FIG. 8A

	Citocinas	+NAM 2,5mM	+NAM 5mM
CXCR4	3,24	13	14,72
CD49e	82,99	96,95	98,32
CD62L	13,96	54,49	81,48

FIG. 8B

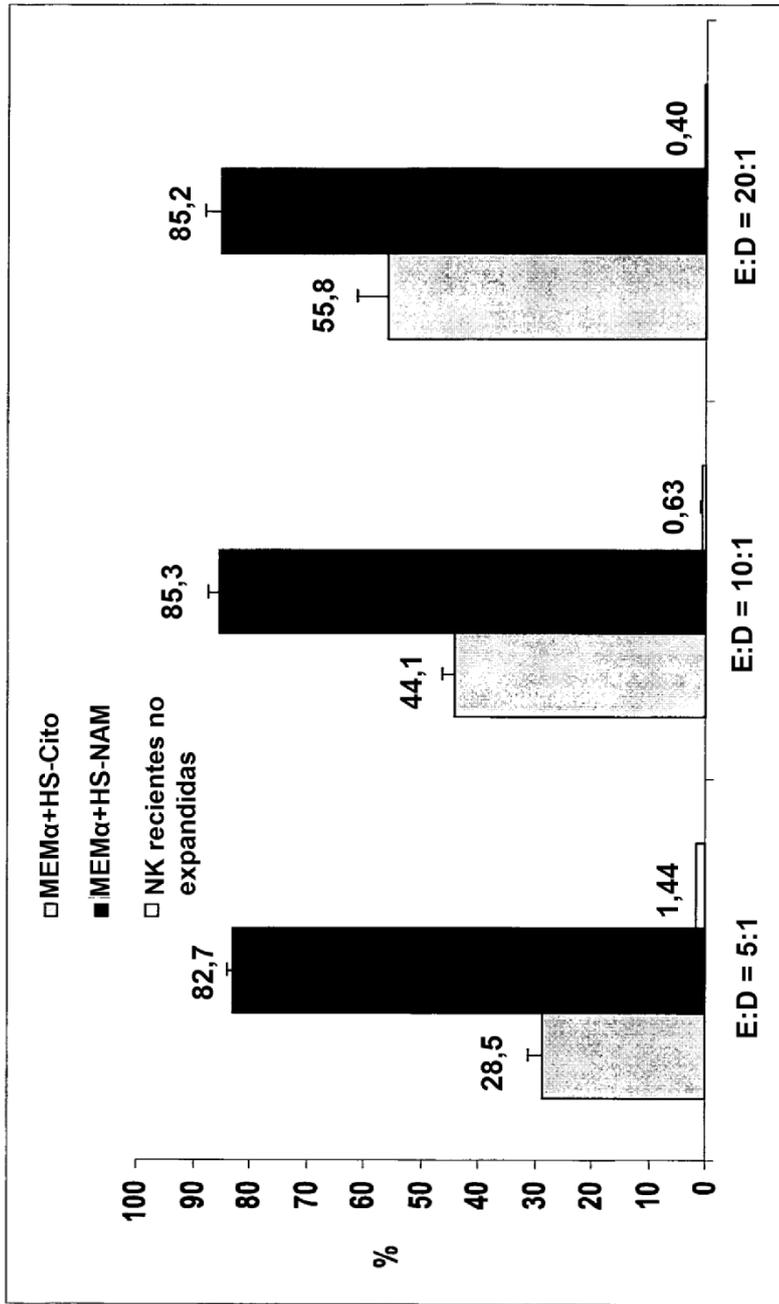


FIG. 9

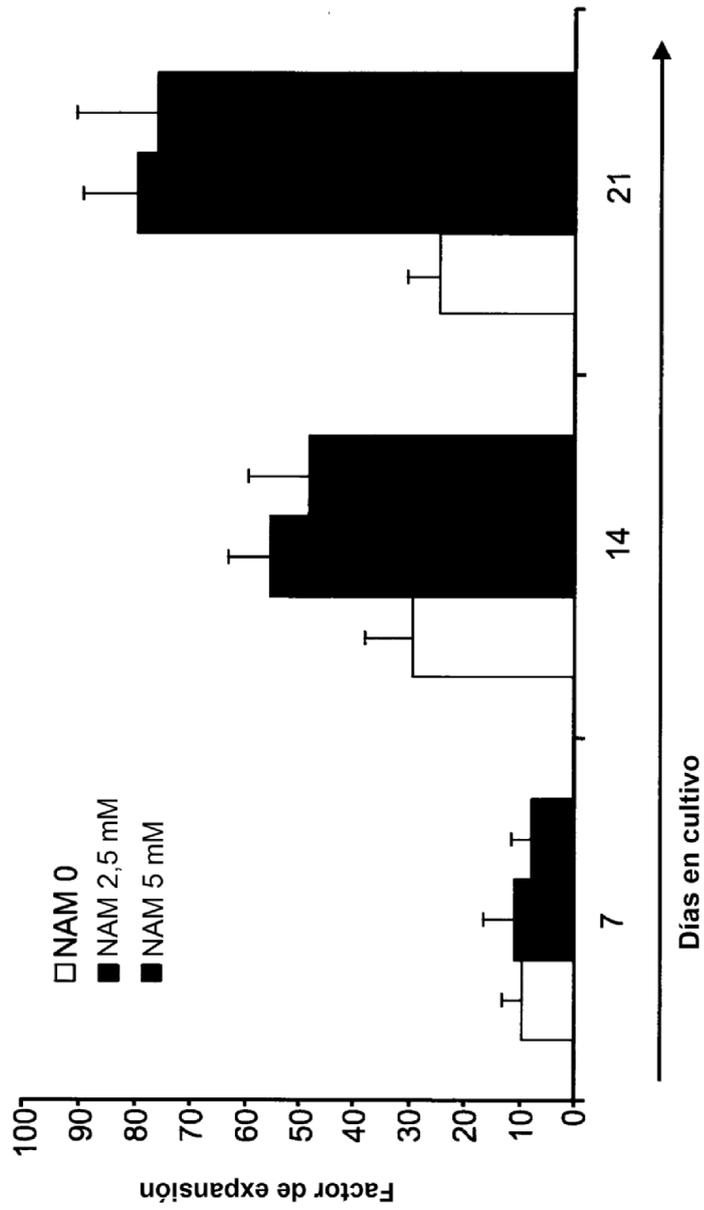


FIG. 10

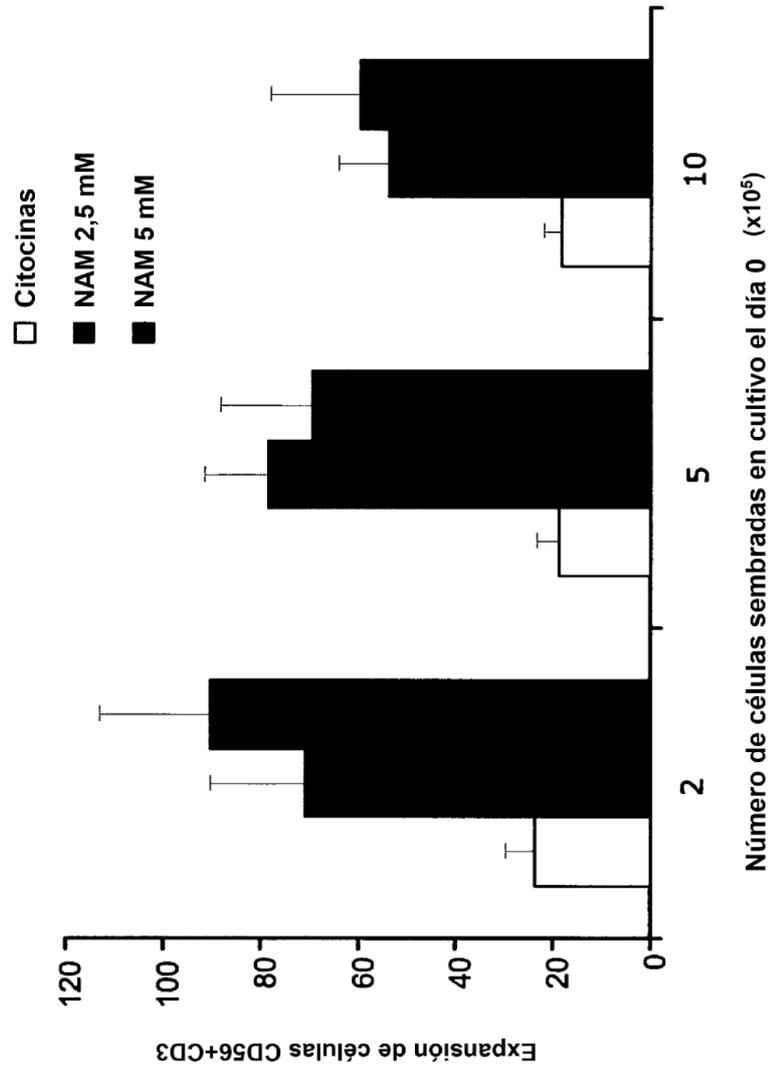


FIG. 11

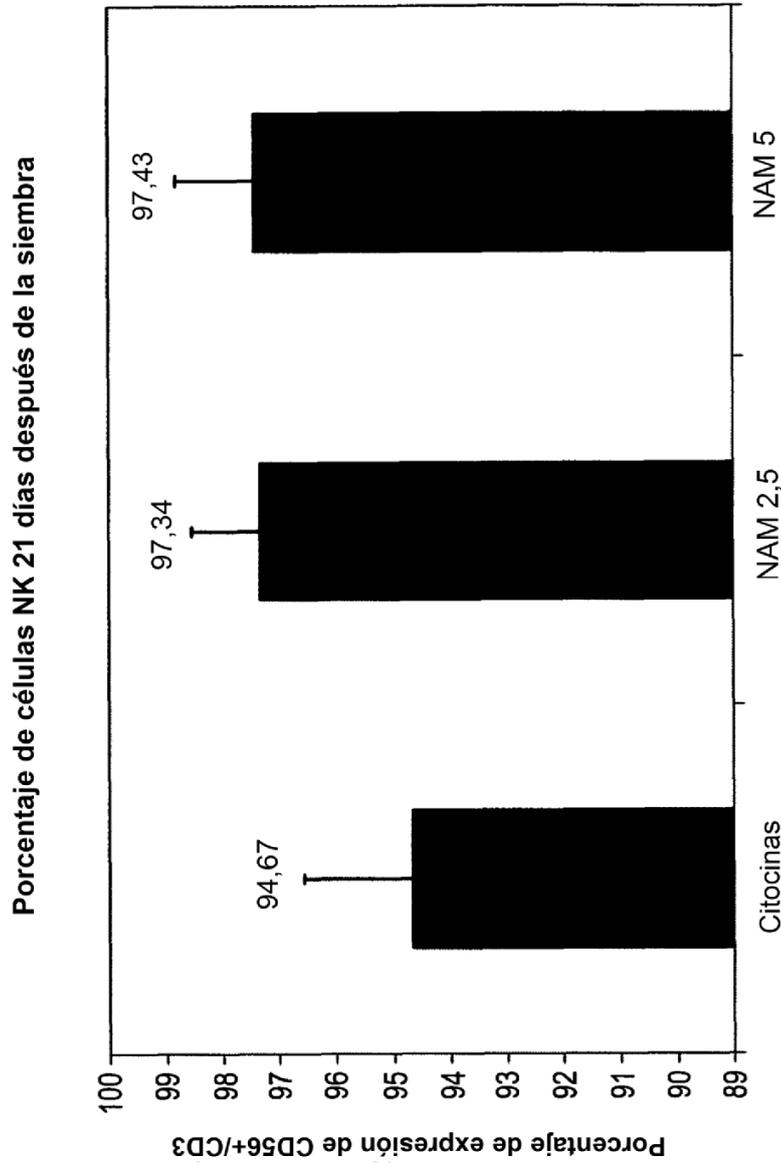


FIG. 12

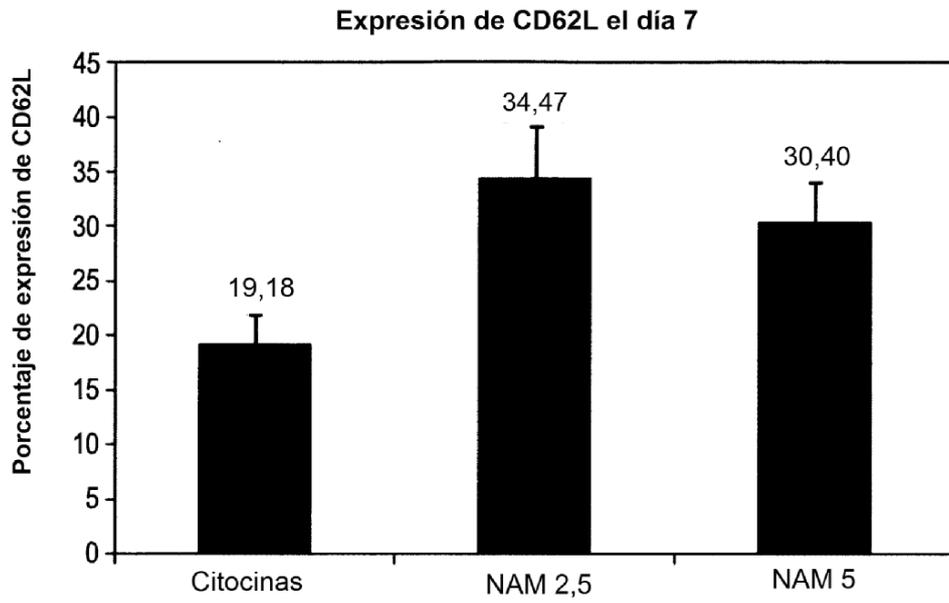


FIG. 13A

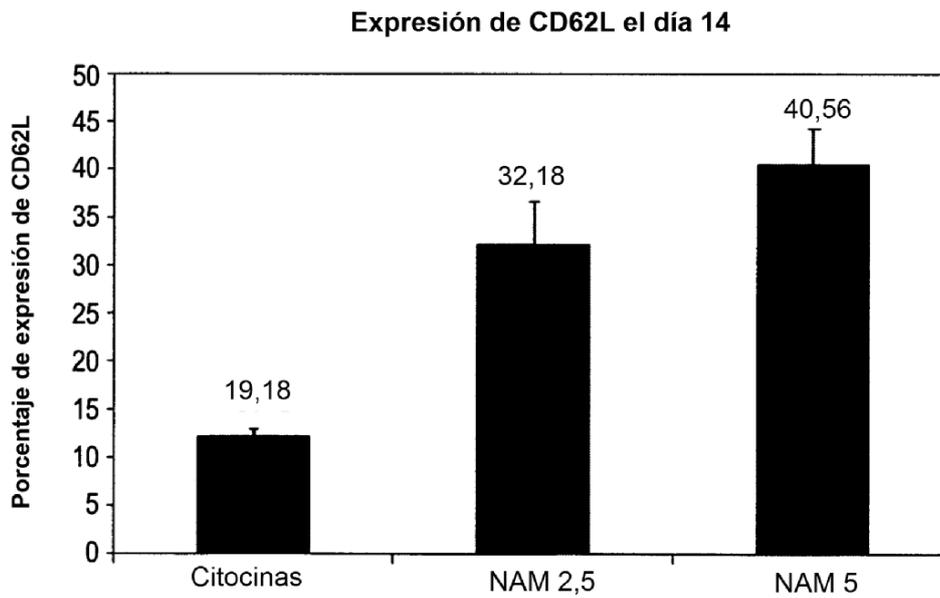


FIG. 13B

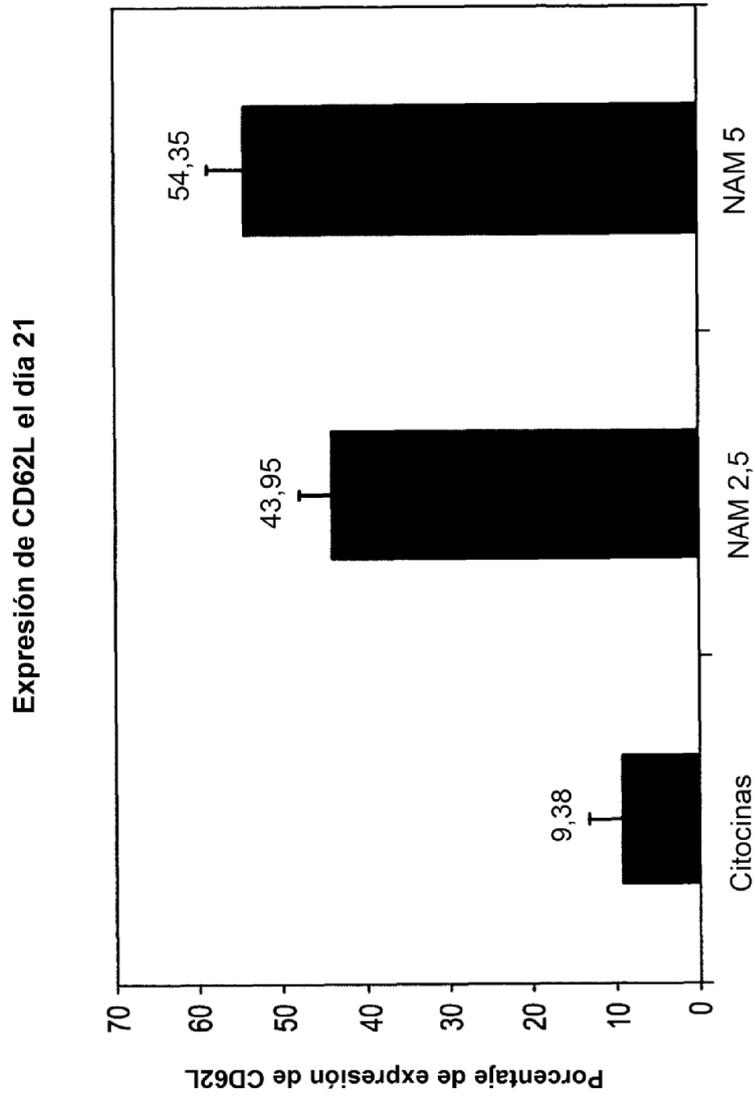


FIG. 13C

Expresión de CD14 el día 14

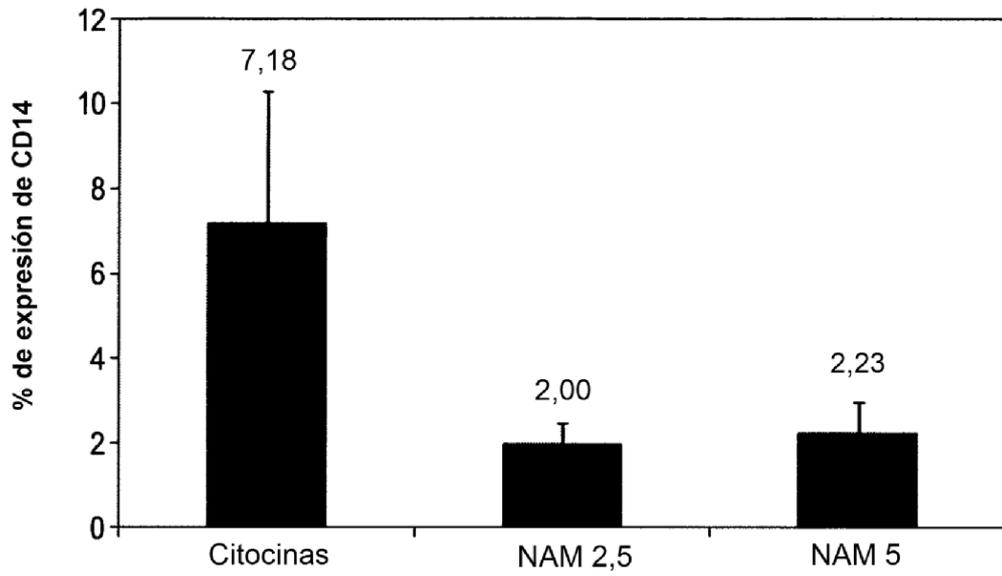


FIG. 14A

Expresión de CD15 el día 14

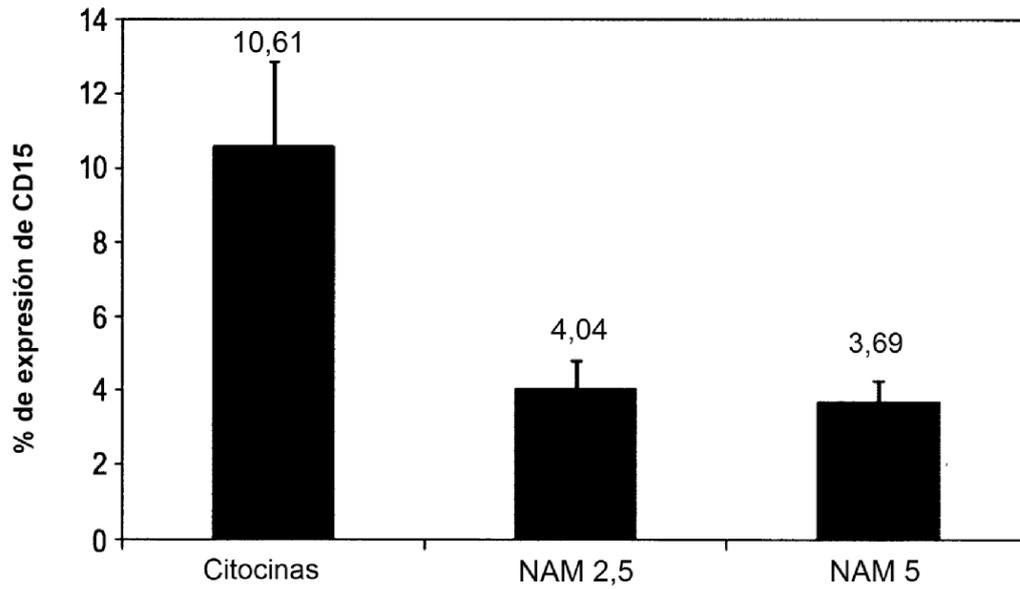


FIG. 14B

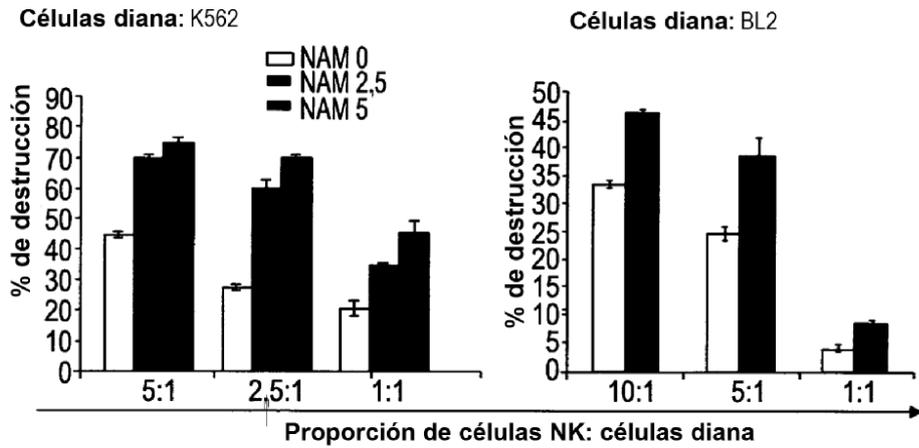


FIG. 15A

Células diana: Leucemia bifenotípica primaria (aprox. 90 % de las células son CD3+)

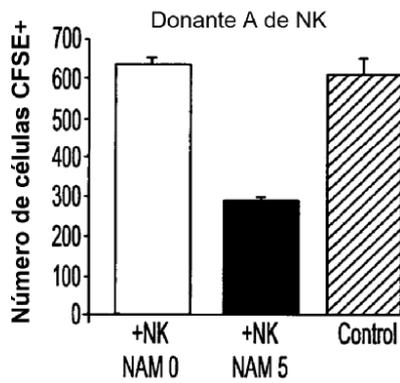


FIG. 15B

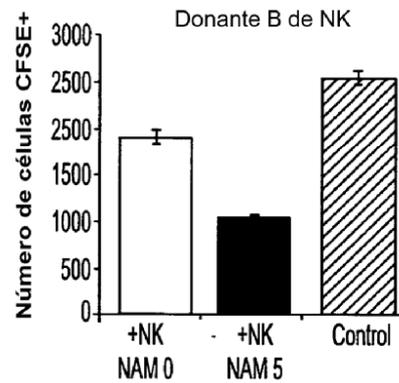


FIG. 15C

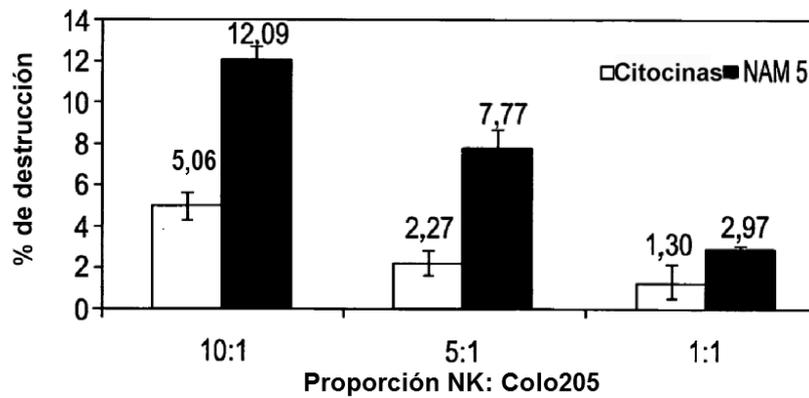
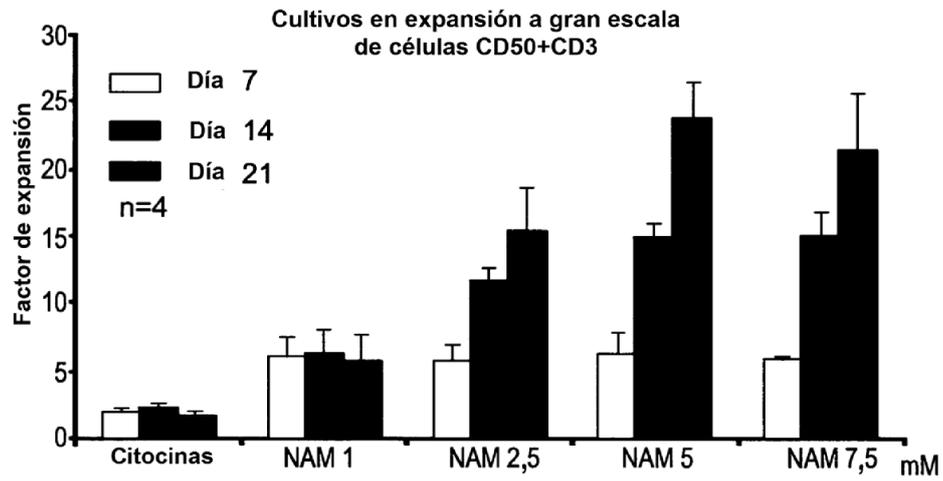
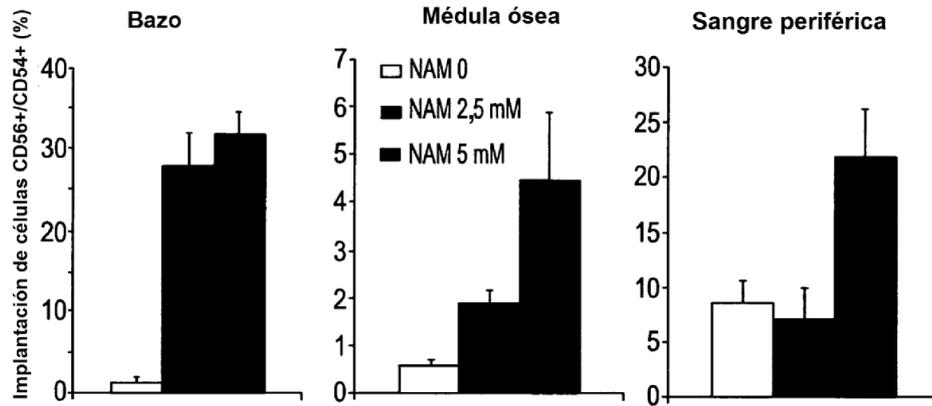


FIG. 15D



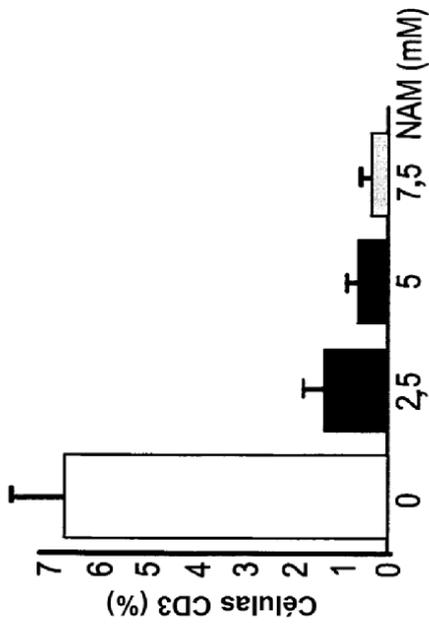


FIG. 18A

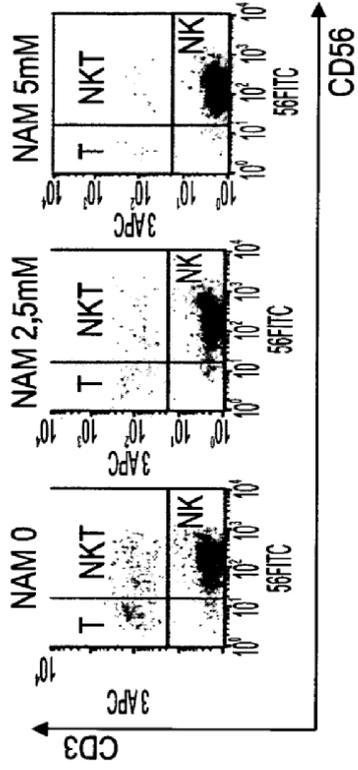


FIG. 18B

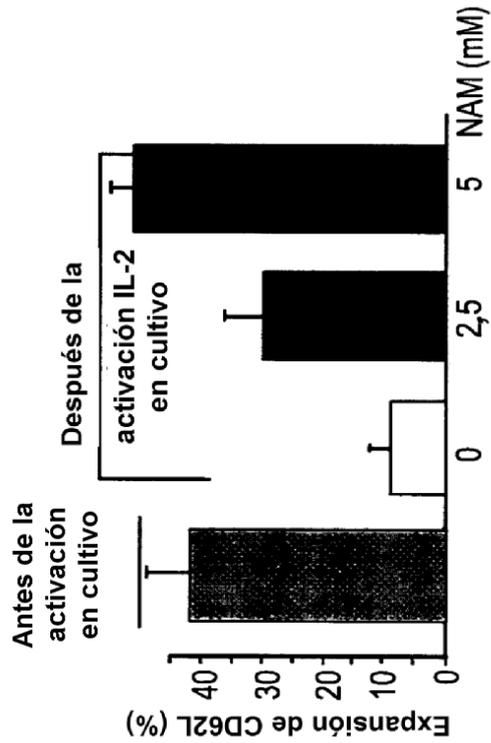


FIG. 19A

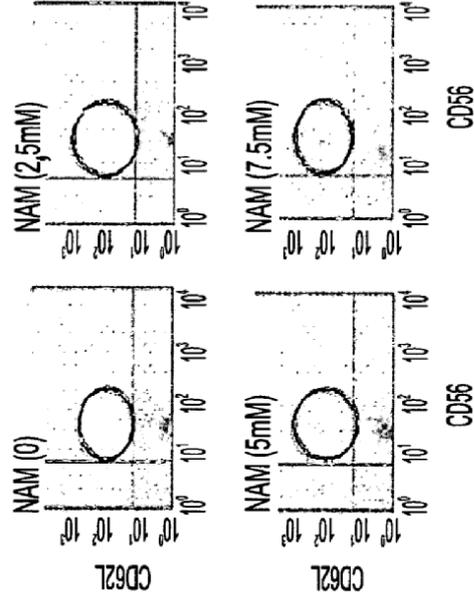


FIG. 19B

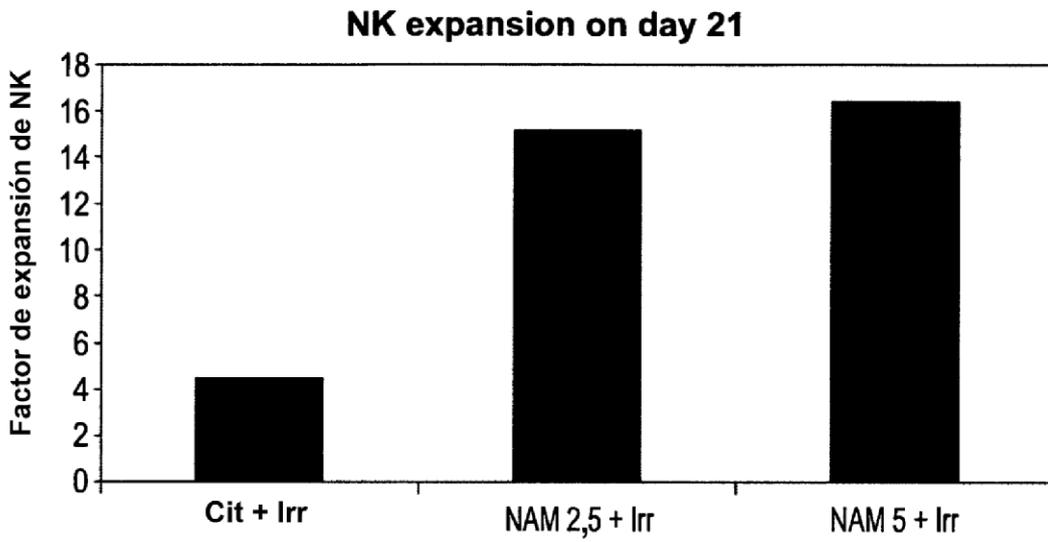


FIG. 20

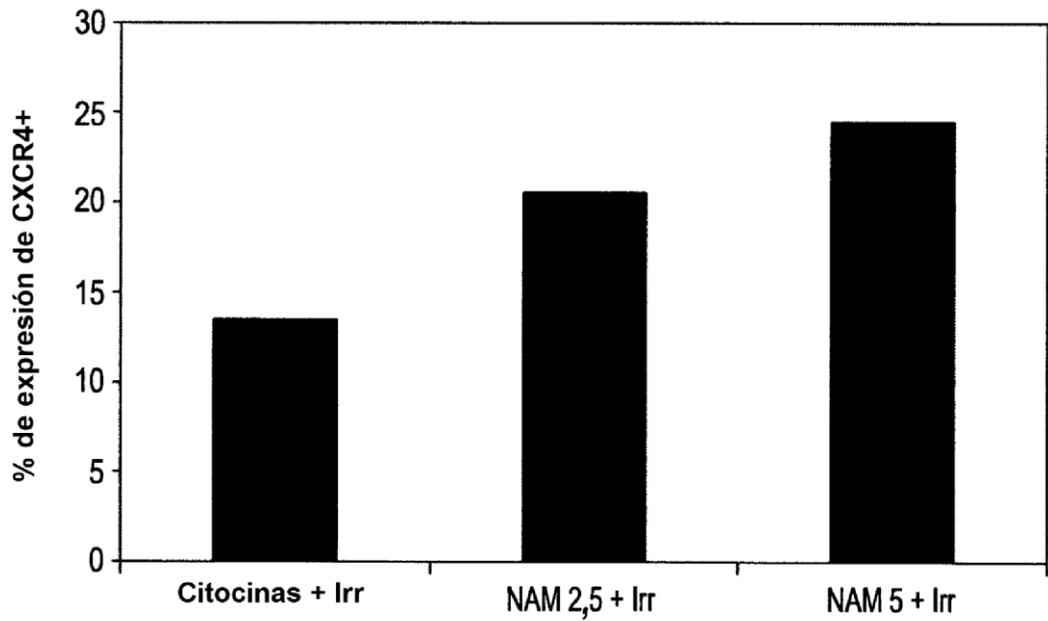


FIG. 21

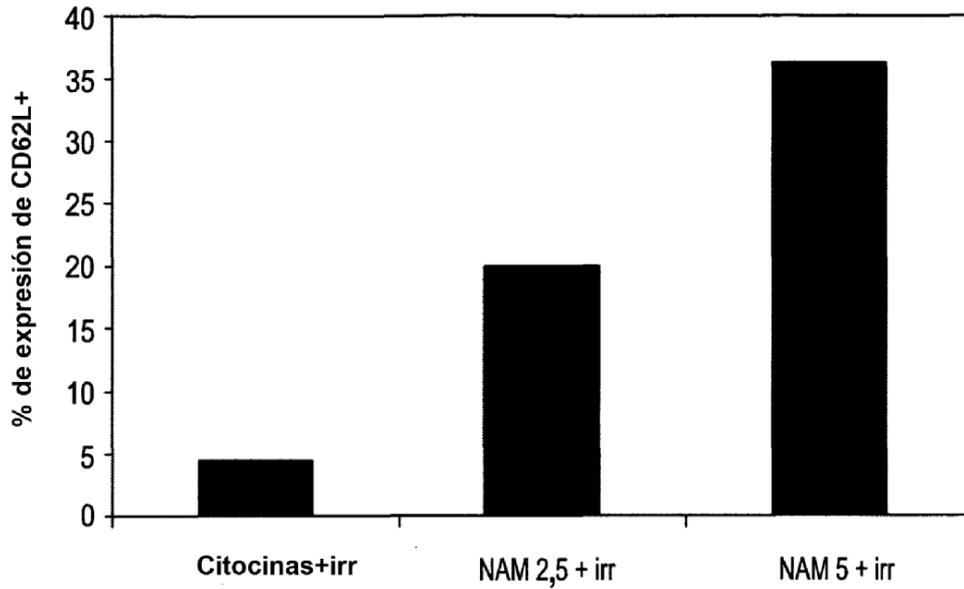


FIG. 22

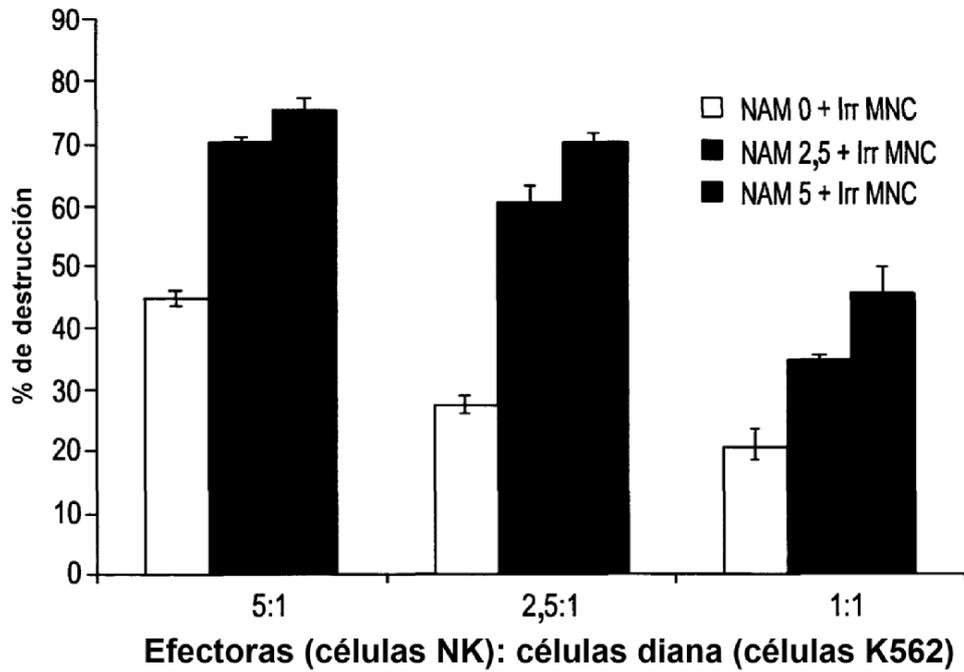


FIG. 23