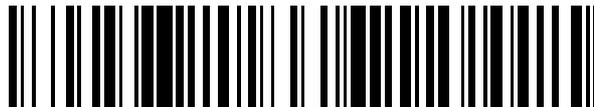


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 746**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2011 PCT/US2011/043831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12009422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2011 E 11738896 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2593542**

54 Título: **Métodos para generar linfocitos citolíticos naturales**

30 Prioridad:

13.07.2010 US 363981 P
16.06.2011 US 201161497897 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2018

73 Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren, NJ 07059, US

72 Inventor/es:

HARIRI, ROBERT J.;
HEIDARAN, MOHAMMAD A.;
JASKO, STEPHEN;
KANG, LIN;
LAW, ERIC;
PAL, AJAI;
STOUT, BHAVANI;
VOSKINARIAN-BERSE, VANESSA;
ZEITLIN, ANDREW y
ZHANG, XIAOKUI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 746 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 generar linfocitos citolíticos naturales

2. Campo

5 La invención generalmente se refiere a métodos para producir una población de linfocitos citolíticos naturales, p. ej.,
 10 linfocitos citolíticos naturales procedentes de la placenta, por ejemplo, de perfundido placentario (p. ej., perfundido
 placentario humano) tales como linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta u otros tejidos,
 por ejemplo, sangre del cordón umbilical o sangre periférica. También se describen en la presente memoria
 poblaciones de linfocitos citolíticos naturales aumentadas producidas por los métodos presentados en la presente
 memoria. Además se describen en la presente memoria métodos para usar el perfundido placentario, y los linfocitos
 citolíticos naturales del mismo, para suprimir la proliferación de células tumorales. En determinados aspectos de la
 descripción, los linfocitos citolíticos naturales se usan en combinación con, o se tratan con, uno o más compuestos
 inmunomoduladores, p. ej., compuestos inmunomoduladores denominados IMiD™.

3. Antecedentes

15 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son linfocitos citotóxicos que constituyen un componente principal del sistema
 inmunitario innato. Los linfocitos citolíticos naturales no expresan los receptores de antígenos de linfocitos T (TCR),
 CD3 o el receptor de linfocitos B de inmunoglobulinas (Ig) de superficie. Los linfocitos citolíticos naturales
 generalmente expresan los marcadores de superficie CD16 (FcyRIII) y CD56 en personas, pero una subclase de
 linfocitos citolíticos naturales humanas es CD16⁻. Los linfocitos citolíticos naturales son citotóxicos; pequeños
 20 gránulos en su citoplasma contienen proteínas especiales tales como perforina y proteasas conocidas como
 granzimas. Tras la liberación en las proximidades de una célula destinada a destruir, la perforina forma poros en la
 membrana celular de la célula diana a través de los cuales pueden entrar las granzimas y las moléculas asociadas,
 induciendo la apoptosis. Una granzima, granzima B (también conocida como granzima 2 y serina esterasa 1
 asociada a linfocitos T citotóxicos), es una serina proteasa crucial para la inducción rápida de la apoptosis de células
 diana en la respuesta inmunitaria mediada por células.

25 Los linfocitos NK se activan en respuesta a interferones o citocinas procedentes de macrófagos. Los linfocitos NK
 activados se denominan linfocitos citolíticos activados por linfocina (LAK). Los linfocitos NK poseen dos tipos de
 receptores de superficie, "receptores activadores" marcados y "receptores inhibidores", que controlan la actividad
 citotóxica de las células.

30 Entre otras actividades, los linfocitos NK desempeñan una función en el rechazo de los tumores en el huésped.
 Debido a que las células cancerosas tienen una expresión del CMH de clase I reducida o nula, pueden convertirse
 en dianas de los linfocitos NK. La acumulación de datos clínicos sugiere que el trasplante haploidéntico de linfocitos
 NK humanos aislados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de la médula ósea median potentes
 efectos antileucémicos sin incurrir en enfermedad detectable de injerto contra huésped (GVHD). Véase Ruggeri *et*
 35 *al.*, *Science* 295:2097-2100 (2002)). Los linfocitos citolíticos naturales pueden activarse por células que carecen o
 presentan concentraciones reducidas de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Además, se
 sabe que los receptores de activación expresados en linfocitos NK median en la detección de células "estresadas" o
 transformadas con ligandos rápidos para activar receptores y, por lo tanto, desencadenar la activación de linfocitos
 NK. Por ejemplo, RCN1 (NKG2D) se une a hemaglutininas víricas. Los ligandos de NKG2D incluyen la proteína de
 40 unión a UL16 (ULB1) de CMV, ULB2, ULB3 y secuencia A relacionada con el polipéptido MCH de clase I (MICA) y
 las proteínas MICB. La proteína NK 2B4 se une a CD48 y DNAM-1 se une al receptor de poliovirus (PVR) y Nectina
 2, ambas se detectan sistemáticamente en la leucemia mieloide aguda (LMA). Ver Penda *et al.*, *Blood* 105: 2066-
 2073 (2004). Además, se ha descrito que la lisis de LMA depende principalmente del receptor de citotoxicidad
 natural (RCN). Véase Fauriat *et al.*, *Blood* 109: 323-330 (2007). Se han usado linfocitos NK activados y aumentados
 45 y linfocitos LAK de sangre periférica tanto en tratamiento *ex vivo* como en tratamiento *in vivo* de pacientes con
 cáncer avanzado, con algún éxito contra enfermedades relacionadas con médula ósea, tales como leucemia; cáncer
 de mama; y determinados tipos de linfoma. El tratamiento con linfocitos LAK requiere que el paciente reciba primero
 IL-2, seguido de leucoféresis y a continuación una incubación *ex vivo* y cultivo de las células sanguíneas autólogas
 recogidas en presencia de IL-2 durante unos pocos días. Los linfocitos LAK deben reinfundirse junto con dosis
 relativamente altas de IL-2 para completar el tratamiento. Este tratamiento de purga es costoso y puede causar
 50 efectos secundarios graves. Estos incluyen retención de líquidos, edema pulmonar, disminución de la presión arterial
 y fiebre alta.

Cayarol *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 28:1991-2002 (1998) describieron un método en una etapa para diferenciación de
 linfocitos citolíticos naturales de la sangre del cordón umbilical humano, de la médula ósea de adultos y de la sangre
 periférica movilizada utilizando una combinación de IL-15, factor de células madre (SCF) y células mesenquimatosas
 55 murinas (MS-5) centrándose en la función de IL-15 y de las células mesenquimatosas en el proceso de
 diferenciación de linfocitos citolíticos naturales. Además, la presencia de IL-2, SCF y MS-5 se señaló que rinde baja
 proporción de linfocitos citolíticos naturales en comparación con el cultivo enriquecido con IL-15, SCF y MS-5. Por
 otra parte, según el estudio, la adición de IL-2 al último no tuvo efecto, lo que indica que IL-2 no es necesario para la
 diferenciación de linfocitos citolíticos naturales.

60 A pesar de las propiedades ventajosas de los linfocitos NK para destruir células tumorales y células infectadas por
 virus, siguen siendo difíciles de emplear y aplicar en inmunoterapia, principalmente debido a la dificultad de

mantener sus capacidades de localización de tumores y tumorocidas durante el cultivo y el crecimiento. Por lo tanto, hay necesidad en la técnica de desarrollar un método eficiente para producir y aumentar los linfocitos citolíticos naturales que conserven funciones tumorocidas.

4. Compendio

5 La presente invención proporciona un método *in vitro* en dos etapas para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende:

(a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15), ligando tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), trombopoyetina (Tpo), factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), donde dicha IL-15 y opcional SCF e IL-7 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos citolíticos naturales durante dicho aumento; y

(b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos citolíticos naturales activados;

15 en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas son CD34⁺.

En una realización del método de la invención, el primer medio además comprende interleucina-2 (IL-2) o heparina. En otra realización del método de la invención, el primer medio además comprende suero bovino fetal o suero humano. En cualesquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, el SCF está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En cualesquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, el Flt3-L está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En una realización del método de la invención, la IL-2 está presente a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el primer medio. En otra realización del método de la invención, la IL-7 está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. Aún en otra realización del método de la invención, la IL-15 está presente a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En cualquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, la Tpo está presente a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio.

En otra realización del método de la invención, dicha IL-2 en la etapa (b) está presente a una concentración de 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el segundo medio. En otra realización del método de la invención, el segundo medio además comprende células sustentadoras. Aún en otra realización del método de la invención, dicho segundo medio además comprende uno o más de suero bovino fetal (FCS), transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, albúmina de suero bovino (ASB) y fitohemaglutinina.

En una realización del método de la invención, las células madre o progenitoras hematopoyéticas comprenden células madre o progenitoras hematopoyéticas de perfundido placentario humana y células madre o progenitoras hematopoyéticas del cordón umbilical, en donde dicho perfundido placentario y dicha sangre del cordón umbilical son de la misma placenta. En otra realización de la invención, los linfocitos citolíticos naturales son CD3⁺ CD56⁺ CD16⁻. Aún en otra realización de la invención, los linfocitos NK son además CD94⁺ CD117⁺, CD161⁻, NKG2D⁺, NKp46⁺ o CD226⁺.

En la presente memoria se describen métodos para aumentar y diferenciar células, por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células madre hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas CD34⁺, a linfocitos citolíticos naturales. En un aspecto, se proporciona un método para producir linfocitos citolíticos naturales (NK) que comprende cultivar células madre hematopoyéticas o células progenitoras, por ejemplo, células madre CD34⁺ o células progenitoras, en un primer medio para producir un aumento de células que están diferenciadas, y posteriormente cultivar dichas células aumentadas en un segundo medio en el que dichas células aumentan más y se diferencian en linfocitos citolíticos naturales. La primera y segunda etapas comprenden cultivar las células en medios con una combinación única de factores celulares. En determinadas realizaciones, dichos factores celulares (p. ej., citocinas) no están comprendidos dentro de un componente indefinido del medio (p. ej., suero), por ejemplo, los factores celulares (p. ej., citocinas) son exógenos al componente indefinido de los medios (p. ej., suero). En determinadas realizaciones, dicho método es un método en dos etapas. En determinadas realizaciones, dicho método no comprende ninguna tercera etapa o intermedia en la que las células se ponen en contacto. Por lo tanto, la invención proporciona un método *in vitro* en dos etapas para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15), ligando tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), trombopoyetina (Tpo), factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15, SCF e IL-7 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y (b) aumentar las células de la primera etapa en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas son CD34⁺. Los linfocitos

citolíticos naturales producidos por los métodos proporcionados en la presente memoria (p. ej., el método en dos etapas) se denominan en la presente memoria linfocitos TSNK.

5 En determinadas realizaciones, dicho primer medio comprende medio que comprende suero humano (p. ej., suero AB humano), suero bovino fetal (SBF) o suero de ternero fetal (FCS), p. ej., 5% a 20% v/v, factor de células madre (SCF), p. ej., 1 ng/ml a 50 ng/ml, ligando de tirosina cinasa 3 tipo FMS (ligando de Flt3), p. ej., 1 ng/ml a 20 ng/ml; interleucina-7 (IL-7), p. ej., 1 ng/ml a 50 ng/ml; trombopoyetina (TPO), p. ej., 1 ng/ml a 50 ng/ml; interleucina-2 (IL-2), p. ej., 50 UI/ml a 500 UI/ml; interleucina-15 (IL-15), p. ej., 1 ng/ml a 50 ng/ml; y/o heparina, p. ej., 0,1 UI/ml a 10 UI/ml. En otra realización específica, dicho primer medio comprende medio de crecimiento, suero humano (p. ej., suero AB humano), FBS FCS, SCF, IL-7, IL-15, ligando de Flt3 (Flt3-L), TPO, así como IL-2 y/o heparina. En otra
10 realización específica, dicho primer medio comprende medio de crecimiento, 10% de suero humano o suero fetal bovino, 20 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de Flt3-L, 20 ng/ml de IL-7, 20 ng/ml de TPO, 200 UI/ml de IL-2, 10 ng/ml de IL-15 y 1,5 UI/ml de heparina. En otra realización específica, dicho primer medio no comprende IL-2. En otra realización específica, dicho cultivo en dicho primer medio comprende cultivar usando células sustentadoras, p. ej., células K562, p. ej., células K562 tratadas con mitomicina C, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), p. ej.,
15 PBMC tratadas con mitomicina C o células madre adherentes a cultivo histórico, p. ej., células madre adherentes al cultivo histórico tratadas con mitomicina C.

En determinadas realizaciones, dicho primer medio además comprende GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™ y/o DMEM:F12. En determinadas realizaciones, dicho medio además comprende O-acetil-carnitina (también denominada acetilcarnitina, O-acetil-L-carnitina u OAC),
20 p. ej., aproximadamente 0,5 mM-10 mM. En una realización, dicho medio además comprende Stemspar® H3000, y/o DMEM:F12 y OAC, p. ej., aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM. En una realización específica, dicho medio además comprende GBGM®. En otra realización específica, dicho medio además comprende DMEM:F12 y aproximadamente 5 mM de OAC. En otra realización específica, dicho medio además comprende Stemspar® H3000 y aproximadamente 5 mM de OAC.

25 En determinadas realizaciones, dicho segundo medio comprende un medio de crecimiento celular que comprende IL-2 y uno o más de: suero humano (p. ej., suero AB humano), suero bovino fetal (FBS) o suero de ternero fetal (FCS), p. ej., 5%-15% de FCS v/v; IL-2, p. ej., 10 UI/ml a 1.000 UI/ml; transferrina, p. ej., 10 µg/ml a 50 µg/ml; insulina, p. ej., 5 µg/ml a 20 µg/ml; etanolamina, p. ej., 5×10^{-4} a 5×10^{-5} M; ácido oleico, p. ej., 0,1 µg/ml a 5 µg/ml; ácido linoleico, p. ej., 0,1 µg/ml a 5 µg/ml; ácido palmítico, p. ej., 0,05 µg/ml a 2 µg/ml; albúmina de suero bovino (ASB), p. ej., 1 µg/ml a 5 µg/ml; y/o fitohemaglutinina, p. ej., de 0,01 µg/ml a 1 µg/ml. En una realización específica, dicho segundo medio comprende IL-2. En una realización más específica, dicho segundo medio comprende un
30 medio de crecimiento celular que comprende suero humano, FBS o FCS, p. ej., 10% v/v, IL-2, transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, suero bovino, albúmina (ASB) y/o fitohemaglutinina. En una realización más específica, dicho segundo medio comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM),
35 10% de suero humano, FBS o FCS, 400 UI de IL-2, 35 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de insulina, etanolamina 2×10^{-5} M, 1 µg/ml de ácido oleico, 1 µg/ml de ácido linoleico, 0,2 µg/ml de ácido palmítico, 2,5 µg/ml de ASB y 0,1 µg/ml de fitohemaglutinina. En otra realización específica, dicho cultivo en dicho segundo medio comprende cultivar usando células sustentadoras, p. ej., células K562 (p. ej., células K562 tratadas con mitomicina C) o PBMC (p. ej.,
40 PBMC tratadas con mitomicina C), p. ej., en el momento en que se producen las células en dicho segundo medio, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días a partir de entonces. En determinadas realizaciones, dicho medio además comprende GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™ y/o DMEM:F12. En determinadas realizaciones, dicho medio además comprende uno o más de O-acetil-carnitina (también denominada acetilcarnitina, O-acetil-L-carnitina u OAC), o un compuesto que afecta el ciclo de acetil-CoA en mitodronia, tiazovivina, Y- 27632, pyintegrina, inhibidores de Rho cinasa (ROCK), inhibidores de caspasa u otros
45 compuestos/péptidos antiapoptóticos, NOVA-RS (Sheffield Bio-Science) u otros potenciadores del crecimiento de pequeñas moléculas. En determinadas realizaciones, dicho medio además comprende nicotinamida. En determinadas realizaciones, dicho medio además comprende aproximadamente OAC 0,5 mM-10 mM. En una realización, dicho medio además comprende Stemspar® H3000, y/o DMEM:F12 y OAC, p. ej., aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM. En una realización específica, dicho medio además comprende GBGM®. En
50 otra realización específica, dicho medio además comprende DMEM:F12 y aproximadamente OAC 5 mM. En otra realización específica, dicho medio además comprende Stemspar® H3000 y OAC aproximadamente 5 mM.

En otro aspecto descrito en la presente memoria se proporciona un método para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 opcionales no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados.

60 En otra realización específica, en la presente memoria se proporciona un método en dos etapas para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, en donde una primera etapa de dicho método comprende aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende una o más de SCF, ligando de tirosina cinasa 3 tipo FMS (Flt3-L), trombopoyetina (Tpo), IL-7 e IL-15, y en el que dicho

SCF, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio (p. ej., suero), y en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y a un segunda etapa de dicho método comprende aumentar las células de la primera etapa en un segundo medio que comprende IL-2, para producir linfocitos NK activados. En otra realización específica, dicho primer medio además comprende interleucina-2 (IL-2) y/o heparina. En otra realización específica, dicho primer medio además comprende aproximadamente 5%-20% de suero bovino fetal o suero humano. En otra realización específica, el SCF está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En otra realización específica, el Flt3-L está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En otra realización específica, la IL-2 está presente a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el primer medio. En otra realización específica, la IL-7 está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En otra realización específica, la IL-15 está presente a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En otra realización específica, la Tpo está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En otra realización específica, la heparina está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 U/ml en el primer medio. En otra realización específica, la IL-2 en la segunda etapa está presente a una concentración de 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el segundo medio. En otra realización específica, dicho segundo medio además comprende uno o más de suero bovino fetal (FCS), transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, albúmina de suero bovino (ASB) y fitohemaglutinina.

En determinadas realizaciones específicas, dichas células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en dicho primer medio durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días antes de dicho cultivo en dicho segundo medio. En determinadas otras realizaciones específicas, dichas células se cultivan en dicho segundo medio durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días. En una realización más específica, dichas células madre o progenitoras hematopoyéticas se cultivan en dicho primer medio durante 21 días, y a continuación se cultivan en dicho segundo medio durante 21 días.

Además en la presente memoria se proporciona una población de linfocitos citolíticos naturales producidos por el método en dos etapas descrito anteriormente, denominados en la presente memoria linfocitos TSNK. En una realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son $CD3^-CD56^+$. En una realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son $CD3^+CD56^+CD16^-$. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son además $CD94^+CD117^+$. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son además $CD161^-$. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son además $NKG2D^+$. En otra realización específica, dichos linfocitos NK son además $NKp46^+$. En otra realización específica, dichos linfocitos NK son además $CD226^+$.

En determinadas realizaciones, más del 90%, 92%, 94%, 96% o 98% de dichos linfocitos TSNK son $CD56^+$ y $CD16^-$. En algunas realizaciones, al menos 80%, 82%, 84%, 86%, 88% o 90% de dichos linfocitos TSNK son $CD3^-$ y $CD56^+$. En otras realizaciones, más del 90%, 92%, 94%, 96% o 98% de dichos linfocitos TSNK son $CD56^+$, $CD16^-$ y $CD3^-$. En otras realizaciones, al menos el 50%, 52%, 54%, 56%, 58% o 60% de dichos linfocitos TSNK son $NKG2D^+$. En otras realizaciones, menos del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% o 3% de dichos linfocitos TSNK son $NKB1^+$. En algunas otras realizaciones, menos del 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son $NKAT2^+$. En determinadas otras realizaciones, menos del 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son $CD56^+$ y $CD16^+$. En realizaciones más específicas, al menos el 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $NKp46^+$. En otras realizaciones más específicas, al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% u 85% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD117^+$. En otras realizaciones más específicas, al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 45% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD94^+$. En otras realizaciones más específicas, al menos el 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD161^-$. En otras realizaciones más específicas, al menos el 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD226^+$. En realizaciones más específicas, al menos el 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD7^+$. En realizaciones más específicas, al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% o 60% de dichos linfocitos TSNK $CD3^-$, $CD56^+$ son $CD5^+$.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe la utilización de linfocitos TSNK para suprimir la proliferación de células tumorales, tratar la infección vírica o tratar el cáncer, p. ej., cánceres de la sangre y tumores sólidos. En algún aspecto de la descripción, los linfocitos TSNK se ponen en contacto con, o se usan en combinación con, un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1 a continuación, o talidomida.

En algunos aspectos de la descripción, dicho cáncer es un tumor sólido. En otro aspecto de la descripción, dicho cáncer es un cáncer sanguíneo. En otros aspectos de la descripción, el cáncer es glioblastoma, carcinoma canalicular primario, leucemia, leucemia aguda de linfocitos T, linfoma mielóide crónico (LMC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de colon, linfoma histiocítico, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma colorrectal, cáncer de próstata, mieloma múltiple o retinoblastoma.

En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o células progenitoras hematopoyéticas, a partir de las cuales se producen los linfocitos TSNK, se obtienen a partir de perfundido placentario, sangre de cordón umbilical o sangre periférica. En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o células progenitoras hematopoyéticas, a partir de las cuales se producen los linfocitos TSNK, son células combinadas de perfundido placentario y sangre de cordón umbilical, p. ej., sangre de cordón umbilical de la misma placenta que el perfundido. En otra realización específica, dicha sangre de cordón umbilical se aísla de una placenta distinta de la placenta de la que se obtiene dicho perfundido placentario. En determinadas realizaciones, las células combinadas se pueden obtener agrupando o combinando la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario. En determinadas realizaciones, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 o similares por volumen para obtener las células combinadas. En una realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1 a 1:10, de 5:1 a 1:5, o de 3:1 a 1:3. En otra realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 o 1:10. En una realización más específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 8,5:1,5 (85%:15%).

En determinadas realizaciones, la sangre del cordón umbilical y el perfundido de la placenta se combinan en una relación de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, o similares por contenido total de células nucleadas (TNC) para obtener las células combinadas. En una realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido de la placenta se combinan en una relación de 10:1 a 10:1, de 5:1 a 1:5, o de 3:1 a 1:3. En otra realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido de la placenta se combinan en una relación de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 o 1:10.

En un aspecto de la descripción, se describe en la presente memoria un método para tratar un individuo que tiene cáncer o una infección vírica, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de linfocitos TSNK aislados.

En otro aspecto de la descripción, los linfocitos TSNK aislados se han tratado con un compuesto inmunomodulador, p. ej. un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1 a continuación, o talidomida, antes de dicha administración. En otro aspecto de la descripción, el método comprende administrar al individuo (1) una cantidad eficaz de linfocitos TSNK aislados; y (2) una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida. Una "cantidad eficaz" en este contexto significa una cantidad de linfocitos TSNK, y opcionalmente de compuesto inmunomodulador o talidomida, que produce una mejora detectable en uno o más síntomas de dicho cáncer o dicha infección, en comparación con un individuo que tiene dicho cáncer o dicha infección a quien no se le han administrado dichos linfocitos TSNK y, opcionalmente, un compuesto inmunomodulador o talidomida. En un aspecto de la descripción, dicho compuesto inmunomodulador es lenalidomida o pomalidomida. En otro aspecto de la descripción, el método además comprende administrar un compuesto anticancerígeno al individuo, p. ej., uno o más de los compuestos anticancerígenos descritos en el apartado 6.8.3, a continuación.

En otro aspecto de la descripción en la presente memoria se describe un método para suprimir la proliferación de células tumorales que comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos TSNK.

En otro aspecto de la descripción, los linfocitos TSNK aislados se han tratado con un compuesto inmunomodulador, p. ej. un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1, más adelante o talidomida, antes de dicho contacto. En otro aspecto de la descripción, las células tumorales se ponen en contacto además con una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador, p. ej. un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1 más adelante o talidomida. Una "cantidad eficaz" en este contexto significa una cantidad de linfocitos TSNK, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida, que da como resultado una supresión detectable de dichas células tumorales en comparación con un número equivalente de células tumorales que no han entrado en contacto con dichos linfocitos TSNK, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, el método además comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de un compuesto anticancerígeno, p. ej., un compuesto anticancerígeno descrito en el apartado 6.8.3, más adelante.

En un aspecto del método descrito en la presente memoria, las células tumorales son células de cáncer sanguíneo. En otro aspecto de la descripción, las células tumorales son células de tumor sólido. En otra realización, las células tumorales son células de carcinoma canalicular primario, células de leucemia, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de linfoma mielóide (LMC), células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mielógena crónica (LMC), células de glioblastoma, células de carcinoma pulmónar, células de adenocarcinoma de colon, células de linfoma histiocítico, células de mieloma múltiple, células de retinoblastoma, células de carcinoma colorrectal, células de cáncer de próstata o células de adenocarcinoma colorrectal. En algunos casos, dicha puesta en contacto tiene lugar *in vitro*. En otros casos, dicha puesta en contacto tiene lugar *in vivo*. En algunos casos, dicho contacto *in vivo* tiene lugar en un ser humano.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al paciente (1) lenalidomida; (2) melfalán; y (3) linfocitos NK aumentados, en donde dichos linfocitos NK son eficaces para tratar mieloma múltiple en dicho paciente. En algunos casos, dichos linfocitos NK son linfocitos NK de sangre del cordón umbilical o linfocitos NK producidos a partir de células hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical, p. ej., células madre hematopoyéticas. En otros casos, dichos linfocitos NK se han producido por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para producir linfocitos NK, p. ej., para producir linfocitos TSNK. En algunos casos, dichos linfocitos NK han aumentado antes de dicha administración. En algunos casos, dichas lenalidomida, melfalán y/o linfocitos NK se administran por separado. En algunos aspectos del método para tratar a un paciente con mieloma múltiple descrito en la presente memoria, dichos linfocitos NK se producen mediante un método en dos etapas para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, en donde una primera etapa de dicho método comprende aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de entre el factor de células madre (SCF), interleucina-7 (IL-7) e interleucina-15 (IL-15), y en donde dicho SCF, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y en donde una segunda etapa de dicho método comprende aumentar las células del primer etapa en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir linfocitos NK activados.

En otro aspecto del método descrito de tratamiento de un individuo con mieloma múltiple, dichos linfocitos NK se producen por un método que comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de entre el factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 opcional no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y (b) aumentar las células del etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados.

En la presente memoria se describe también un método para tratar a un individuo que tiene leucemia linfocítica crónica (LLC), que comprende administrar al individuo una dosis terapéuticamente eficaz de (1) lenalidomida; (2) melfalán; (3) fludarabina; y (4) linfocitos NK aumentados, p. ej., linfocitos TSNK, en donde dichos linfocitos NK son eficaces para tratar dicha LLC en dicho individuo. En un aspecto de esta descripción, dichos linfocitos NK son linfocitos NK de sangre del cordón umbilical o linfocitos NK producidos a partir de células hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical, p. ej., células madre hematopoyéticas. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos NK se han producido por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para producir linfocitos NK, p. ej., para producir linfocitos TSNK. En un aspecto de los anteriores métodos descritos, dichos linfocitos NK han aumentado durante al menos 10 días antes de dicha administración. En otro aspecto de los anteriores métodos descritos, dichos lenalidomida, melfalán, fludarabina y linfocitos NK aumentados se administran a dicho individuo por separado. En algunos aspectos del método de tratamiento de un individuo con LLC, dichos linfocitos NK se producen por un método en dos etapas para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activadas, en donde una primera etapa de dicho método comprende aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de entre el factor de células madre (SCF), interleucina-7 (IL-7) e interleucina-15 (IL-15), y en donde dichos SCF, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y en donde una segunda etapa de dicho método comprende aumentar las células de la primera etapa en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir linfocitos NK activados.

En otros aspectos del método descrito de tratamiento de un individuo con LLC, dichos linfocitos NK se producen mediante un método que comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de entre el factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 opcionales no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de manera que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y (b) aumentar las células del etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para crioconservar una población de linfocitos NK, por ejemplo, linfocitos TSNK. En un aspecto, dicho método comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de entre el factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 opcionales no están comprendidas dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; (b) aumentar las células del etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK

activados, y (c) crioconservar los linfocitos NK de la etapa (b) en un medio de crioconservación. En un aspecto de los métodos descritos, dicha etapa (c) además comprende (1) preparar una solución de suspensión celular; (2) añadir medio de crioconservación a la solución de suspensión celular de la etapa (1) para obtener la suspensión celular crioconservada; (3) enfriar la suspensión de células crioconservadas de la etapa (3) para obtener una muestra crioconservada; y (4) almacenar la muestra crioconservada por debajo de -80°C . En determinados casos, el método no incluye etapas intermedias entre la etapa (a) y (b), y entre la etapa (b) y (c).

Dicho método para crioconservar una población de linfocitos NK, p. ej., linfocitos TSNK comprende: (a) aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de entre el factor de células madre (SCF), IL-2, interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15) y heparina, y en donde dicho SCF, IL-2, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir linfocitos NK activados; y (c) crioconservar los linfocitos NK de la etapa (b) en un medio de crioconservación. En un aspecto de esta descripción, dicha etapa (c) además comprende (1) preparar una solución de suspensión celular; (2) añadir medio de crioconservación a la solución de suspensión celular de la etapa (1) para obtener la suspensión celular crioconservada; (3) enfriar la suspensión de células crioconservadas de la etapa (3) para obtener una muestra crioconservada; y (4) almacenar la muestra crioconservada por debajo de -80°C . En algunos casos, el método no incluye etapas intermedias entre las etapas (a) y (b), y entre la etapa (b) y (c), y/o sin más etapas de cultivo antes de la etapa (a).

En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas a partir de las cuales se producen los linfocitos TSNK expresan uno o más de los microARN ASH-miR-380, ASH-miR-512, ASH-miR-517, ASH-miR-518c, ASH-miR-519b y ASH-miR-520a a un nivel detectablemente más alto que los linfocitos citolíticos naturales de sangre periférica, según se determina, p. ej., por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

En otro aspecto de los métodos descritos anteriormente, dichos linfocitos TSNK se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dichos linfocitos citolíticos naturales expresen de forma detectable más granzima B o perforina que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos TSNK, no puestos en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos TSNK se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dichas células presenten de forma detectable más citotoxicidad para con dichas células tumorales que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos TSNK, no puestos en contacto con dicho compuesto inmunomodulador, p. ej., lenalidomida o pomalidomida, o con talidomida. En otra realización específica, dichos linfocitos TSNK expresan uno o más de BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, o TNFRSF18 a un nivel más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos TSNK, no puestos en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos TSNK expresan uno o más de ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI y/o TBX21 a un nivel más elevado que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos TSNK, que no se han puesto en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida.

En algunos aspectos de los métodos descritos de tratamiento o supresión tumoral anteriores, los linfocitos TSNK se combinan con otros linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos citolíticos naturales aislados del perfundido placentario, de la sangre de cordón umbilical o de la sangre periférica, o producidos a partir de células hematopoyéticas por un método diferente. En realizaciones específicas, los linfocitos TSNK se combinan con linfocitos citolíticos naturales de otra procedencia, o producidos por un método diferente, en una proporción de aproximadamente 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 o similar.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende linfocitos TSNK aislados. En un aspecto, dichos linfocitos TSNK se producen a partir de células hematopoyéticas, p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas aisladas de perfundido placentario, sangre de cordón umbilical y/o sangre periférica. En algunos casos, dichos linfocitos TSNK comprenden al menos 50% de células en la composición. En otros casos, dichos linfocitos TSNK comprenden al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de células en la composición. En determinados casos, más del 90%, 92%, 94%, 96% o 98% de linfocitos TSNK en dicha composición son $\text{CD}56^{+}$ y $\text{CD}16^{-}$. En otros casos, al menos el 80%, 82%, 84%, 86%, 88% o 90% de linfocitos TSNK en dicha composición son $\text{CD}3^{-}$ y $\text{CD}56^{+}$. En otros casos, al menos el 50%, 52%, 54%, 56%, 58% o 60% de dichas células son $\text{NKG}2\text{D}^{+}$. En otros casos, menos del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% o 3% de dichas células son $\text{NKB}1^{+}$. En determinados otros casos, menos del 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son $\text{NKAT}2^{+}$. En determinados otros casos, menos del 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son $\text{CD}56^{+}$ y $\text{CD}16^{+}$. En otros casos, al menos el 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de dichos linfocitos TSNK $\text{CD}3^{-}$, $\text{CD}56^{+}$ son $\text{NKP}46^{+}$. En otros casos, al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% u 85% de dichos linfocitos TSNK $\text{CD}3^{-}$, $\text{CD}56^{+}$ son $\text{CD}117^{+}$. En otros casos, al menos el

20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 45% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD94⁺. En otros casos, al menos el 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD226⁺. En determinados casos, al menos el 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD7⁺. En otros casos, al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% o 60% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD5⁺.

5 En otra realización específica, dichos linfocitos TSNK CD56⁺, CD16⁺ aislados son de un solo individuo. En una realización más específica, dichos linfocitos citolíticos naturales CD56⁺, CD16⁺ aislados comprenden linfocitos citolíticos naturales de al menos dos individuos diferentes. En otro aspecto de la descripción, dichos linfocitos TSNK se han puesto en contacto con un compuesto inmunomodulador o talidomida en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que dichos linfocitos TSNK expresen de forma detectable más granzima B o perforina que un número equivalente de linfocitos citolíticos naturales, es decir, linfocitos TSNK, que no se han puesto en contacto con dicho compuesto inmunomodulador o talidomida. En otro aspecto de la descripción, dicha composición además comprende un compuesto inmunomodulador o talidomida. En algunos ejemplos, el compuesto inmunomodulador es un compuesto descrito en el apartado 6.2.1 más adelante, p. ej., un compuesto de isoindolina amino-sustituido.

10 En otra realización específica, la composición además comprende uno o más compuestos anticancerosos, p. ej., uno o más de los compuestos anticancerosos descritos en el apartado 6.8.2, más adelante.

15 En otro aspecto de la descripción, la composición comprende linfocitos TSNK y linfocitos citolíticos naturales de otra procedencia, o producidos por otro método. Por ejemplo, dicha otra procedencia es sangre de placenta y/o sangre de cordón umbilical. En otro ejemplo, dicha otra procedencia es sangre periférica. En un ejemplo más, los linfocitos TSNK se combinan con linfocitos citolíticos naturales o se preparan por otro método en una proporción de aproximadamente 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 o similares.

20 En otro aspecto de la descripción, la composición comprende linfocitos TSNK y perfundido placentario aislado o células de perfundido placentario aisladas. En otro aspecto aún, dicho perfundido placentario es del mismo individuo que dichos linfocitos TSNK. En otro aspecto, dicho perfundido placentario comprende perfundido placentario de un individuo diferente al de dichos linfocitos TSNK. En otro aspecto, todas, o sustancialmente todas (p. ej., más del 90%, 95%, 98% o 99%) de las células en dicho perfundido placentario son células fetales. En otro aspecto, el perfundido placentario o las células de perfundido placentario comprenden células fetales y maternas. En otro aspecto, las células fetales en dicho perfundido placentario comprenden menos de aproximadamente 90%, 80%, 70%, 60% o 50% de las células en dicho perfundido. En otro aspecto, dicho perfundido se obtiene mediante el paso de una solución de NaCl al 0,9% a través de la vasculatura de la placenta. En otro aspecto, dicho perfundido comprende un medio de cultivo. En otro aspecto, dicho perfundido se ha tratado para eliminar los eritrocitos. En otro aspecto, dicha composición comprende un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 5.2.1.1 más adelante, p. ej., un compuesto de isoindolina amino-sustituido. En otro aspecto, la composición además comprende uno o más compuestos anticancerosos, p. ej., uno o más de los compuestos anticancerosos descritos en el apartado 6.8.2, más adelante.

25 En otro aspecto, la composición comprende linfocitos TSNK y células de perfundido placentario. En otro aspecto, dichas células de perfundido placentario son del mismo individuo que dichos linfocitos TSNK. En otro aspecto, dichas células de perfundido placentario son de un individuo diferente al de dichos linfocitos TSNK. En otro aspecto, la composición comprende perfundido placentario aislado y células de perfundido placentario aisladas, en donde dicho perfundido aislado y dichas células de perfundido placentario aisladas son de diferentes individuos. En otro aspecto de cualquiera de las descripciones anteriores que comprende perfundido placentario, dicho perfundido placentario comprende perfundido placentario de al menos dos individuos. En otro aspecto de cualquiera de las descripciones anteriores que comprende células de perfundido placentario, dichas células de perfundido placentario aisladas son de al menos dos individuos. En otro aspecto, dicha composición comprende un compuesto inmunomodulador. En otro aspecto, la composición además comprende uno o más compuestos anticancerosos, p. ej., uno o más de los compuestos anticancerosos descritos en el apartado 6.8.2, más adelante.

4.1. Definiciones

30 Como se emplea en la presente memoria, las expresiones "compuesto inmunomodulador" e "IMiD™" no abarcan la talidomida.

35 Tal como se emplea en la presente memoria, "lenalidomida" significa 3-(4'-aminoisoindolina-1'-ona)-1-piperidina-2,6-diona (nombre del Chemical Abstracts Service) o 2,6-piperidindiona,3-(4-amino-1,3-dihidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il) - (nombre de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)). Como se emplea en la presente memoria, "pomalidomida" significa 4-amino-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindol-1,3-diona.

40 Como se emplea en la presente memoria, "multipotente", cuando se refiere a una célula, significa que la célula tiene la capacidad de diferenciarse en una célula de otro tipo de célula. En determinadas realizaciones, "una célula multipotente" es una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquier subconjunto de aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de mamífero. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.

Tal como se emplea en la presente memoria, "células sustentadoras" se refiere a células de un tipo que se cultivan junto con células de un segundo tipo, para proporcionar un entorno en el que las células del segundo tipo pueden mantenerse, y quizás proliferar. Sin estar sujetos a ninguna teoría, las células sustentadoras pueden proporcionar, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, señales eléctricas, moléculas orgánicas (por ejemplo, esteroides), moléculas de ácido nucleico, factores de crecimiento (p. ej., bFGF), otros factores (p. ej., citocinas), y nutrientes metabólicos para las células diana. En determinadas realizaciones, las células sustentadoras crecen en una monocapa.

Como se emplea en la presente memoria, "linfocito citolítico natural" o "linfocitos NK" sin modificación adicional, incluye linfocitos citolíticos naturales de cualquier fuente de tejido.

Como se emplea en la presente memoria, "TSNK" y "linfocitos TSNK" se refieren a linfocitos citolíticos naturales producidos por métodos de cultivo/crecimiento (p. ej., método en dos etapas) descritos en la presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, "perfundido placentario" significa solución de perfusión que se ha pasado a través de al menos parte de una placenta, p. ej., una placenta humana, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta, incluido un gran número de células recogidas por la solución de perfusión durante el paso por la placenta.

Como se emplea en la presente memoria, "células de perfundido placentario" significa células nucleadas, p. ej., células nucleadas totales, aisladas de, o aislables de, perfundido placentario.

Como se emplea en la presente memoria, "supresión de células tumorales", "supresión de proliferación de células tumorales" y similares incluye ralentizar el crecimiento de una población de células tumorales, p. ej., destruyendo una o más de las células tumorales en dicha población de células tumorales, por ejemplo, poniendo en contacto la población de células tumorales con, p. ej., linfocitos TSNK o una población de células que comprende linfocitos TSNK.

Como se emplea en la presente memoria, el término "células hematopoyéticas" incluye células madre hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas.

Tal como se emplea en la presente memoria, el "componente indefinido" es una expresión de la técnica en el campo del medio de cultivo que se refiere a componentes cuyos constituyentes generalmente no se proporcionan ni se cuantifican. Los ejemplos de un "componente indefinido" incluyen, sin limitación, suero humano (p. ej., suero AB humano) y suero fetal (por ejemplo, suero bovino fetal o suero de ternero fetal).

Como se emplea en la presente memoria, "+", cuando se emplea para indicar la presencia de un marcador celular concreto, significa que el marcador celular está presente de manera detectable en la clasificación de células activadas por fluorescencia por encima de un control de isotipo; o es detectable por encima del fondo en RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

Como se emplea en la presente memoria, "-", cuando se emplea para indicar la presencia de un marcador celular concreto, significa que el marcador celular no está presente de forma detectable en la clasificación de células activadas por fluorescencia por encima de un control de isotipo; o no es detectable por encima del fondo en RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

5. Breve descripción de las figuras

FIG. 1: N° de veces de aumento de linfocitos NK diferenciados de células madre hematopoyéticas (HSC) con varias formulaciones de medio. Las barras de error representan la desviación típica de tres donantes. Eje X: día (D) de cultivo. Eje Y: n° de veces de aumento en comparación con el día 0 (inicio del cultivo).

FIG. 2: Caracterización fenotípica de linfocitos NK cultivados con medio NK2A. Las células fueron marcadas tres veces con PE-antiCD56, FITC-antiCD3, PerCP-antiCD16. Líneas horizontales y verticales: nivel de marcador fluorescente significativamente por encima del fondo.

FIG. 3: N° de veces de aumento de linfocitos NK cultivados con NK2A (FF), NK2A (células madre de placenta como células sustentadoras), NK2A (MSC como células sustentadoras) o medio NK en dos etapas. Eje X: día (D) de cultivo. Eje Y: n° de veces de aumento en comparación con el día 0 (inicio del cultivo).

FIG. 4: Citotoxicidad de linfocitos NK cultivados con NK2A (sin células sustentadoras), medio NK en dos etapas; NK2A con células madre de placenta (PSC) adherentes al plástico de cultivo histórico CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ como células sustentadoras, NK2A con células madre mesenquimatosas (MSC) procedentes de médula ósea como células sustentadoras, el día 45 después del inicio del cultivo. En la Fig. 4 se muestran datos representativos de tres donantes.

FIG. 5: Caracterización fenotípica de linfocitos NK el día 41 (D41) de cultivo. Se muestran datos representativos de 3 donantes. Eje X: porcentaje de linfocitos NK, producidos por el método en dos etapas, que son CD3⁺CD56⁺, CD16⁻CD56⁺ o CD16⁺CD56⁺; o que expresan NKB1, NKG2D, NKp46, CD94, CD117, CD226, CD7 o CD5. Las células se cultivaron en NK2A (sin células sustentadoras), medio NK en dos etapas; NK2A con células madre de placenta (PSC) adherentes al plástico de cultivo histórico CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ como células sustentadoras, NK2A con células madre mesenquimatosas (MSC) procedentes de médula ósea como células sustentadoras, el día 41 después del inicio del cultivo.

FIG. 6: Expresión de CD94 y CD117 en la población de linfocitos NK CD56⁺CD3⁻ durante el cultivo de NK en medio NK2A. La población dominante de linfocitos CD56⁺CD94⁺CD117⁺ se identificó a partir de linfocitos NK cultivados en medio NK2A, que se distingue de los linfocitos NK procedentes de células madre embrionarias (CME) (CD56⁺CD94⁺CD117^{low/-}). Los datos representativos de tres donantes se muestran en la FIG. 6. Eje X: fluorescencia de anti-CD94 marcada con ficoeritrina (PE). Eje Y: fluorescencia de anti-CD117 marcado con APC. Líneas horizontales y verticales: nivel de marcador fluorescente significativamente por encima del fondo. D13, D20, D28, D35: Días 13, 20, 28 y 35 después del inicio del cultivo de linfocitos CD34⁺.

FIG. 7: Efectos de las células madre de placenta en linfocitos NK cultivados en comparación con el MSC y medio NK2A solo. Eje X: linfocitos NK cultivados en medio NK2A sin una capa de alimentación (FF); linfocitos NK cultivados en medio NK2A con células madre mesenquimatosas (MCS) procedentes de la médula ósea como capa de alimentación; o medio NK2A con células madre de placenta adherentes al plástico de cultivo hístico (PDAC) CD10⁺, CD34⁺, CD105⁺, CD200⁺ como capa de alimentación. Eje Y (izquierda): citotoxicidad, expresada como porcentaje de las células tumorales restantes (1,0 = 100%); citotoxicidad indicada por cuadrados abiertos. Eje Y (derecha): n° de veces de aumento de linfocitos NK usando el método en dos etapas; n° de veces de aumento expresado en asteriscos.

Fig. 8A-8B: Efectos de las proporciones relativas de sangre de cordón umbilical (UCB) y perfundido placentario humano (PPH) sobre la pureza de los linfocitos CD34⁺ después de la descongelación. Fig. 8A: Efectos del contenido volumétrico (vol%) de PPH sobre la pureza de CD34⁺Lin⁻. Eje X: fracción volumétrica de PPH en UCB y PPH combinados (Combo). Eje Y: porcentaje de linfocitos CD34⁺ Lin⁻. Fig. 8B. Efectos del contenido de TNC de HPC (%TNC) sobre la pureza de CD34⁺Lin⁻. Eje Y: porcentaje de linfocitos CD34⁺Lin⁻.

6. Descripción detallada

La presente invención proporciona un método de producción *in vitro* en dos etapas de una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende:

- (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15), ligando tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), trombopoyetina (Tpo), factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y
- (b) aumentar las células del etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados, y

en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas son CD34⁺.

En una realización del método de la invención, el primer medio además comprende interleucina-2 (IL-2) o heparina. En otra realización del método de la invención, el primer medio además comprende suero bovino fetal o suero humano. En cualesquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, el SCF está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En cualesquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, el Flt3-L está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En una realización del método de la invención, la IL-2 está presente a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el primer medio. En otra realización del método de la invención, la IL-7 está presente a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. Aún en otra realización del método de la invención, la IL-15 está presente a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio. En cualquiera de las realizaciones descritas del método de la invención, la Tpo está presente a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml en el primer medio.

En otra realización del método de la invención, dicha IL-2 en la etapa (b) está presente a una concentración de 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml en el segundo medio. En otra realización del método de la invención, el segundo medio además comprende células sustentadoras. Aún en otra realización del método de la invención, dicho segundo medio además comprende uno o más de entre suero bovino fetal (FCS), transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, albúmina de suero bovino (ASB) y fitohemaglutinina.

En una realización del método de la invención, las células madre o progenitoras hematopoyéticas comprenden células madre o progenitoras hematopoyéticas de perfundido placentario humano y células madre o progenitoras hematopoyéticas del cordón umbilical, en donde dicho perfundido placentario y dicha sangre del cordón umbilical son de la misma placenta. En otra realización de la invención, los linfocitos NK son CD3⁺CD56⁺CD16⁻. Aún en otra realización de la invención, los linfocitos NK son además CD94⁺CD117⁺, CD161⁺, NKG2D⁺, NKp46⁺ o CD226⁺.

Se proporciona en la presente memoria un nuevo método *in vitro* en dos etapas para producir y aumentar linfocitos NK a partir de células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas o células progenitoras. Las células hematopoyéticas utilizadas para producir los linfocitos NK se pueden aislar de cualquier fuente, por ejemplo, sin limitación, placenta, sangre del cordón umbilical, sangre de la placenta, sangre periférica, bazo o hígado. En

determinada realización, los linfocitos NK se producen a partir del crecimiento de las células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas. En una realización, las células hematopoyéticas se recogen de una fuente de dichas células, p. ej., perfundido placentario, sangre de cordón umbilical, sangre de placenta, sangre periférica, bazo, hígado y/o médula ósea. En un aspecto de la descripción, las células hematopoyéticas aumentan y diferencian, continuamente, en un primer medio sin el empleo de células sustentadoras. Las células se cultivan luego en un segundo medio en presencia de células sustentadoras. Dicho aislamiento, crecimiento y diferenciación se puede realizar en una instalación central, que proporciona el crecimiento de las células hematopoyéticas para su envío a crecimiento y diferenciación descentralizadas en puntos de uso p. ej., hospital, base militar, línea del frente militar o similares.

6.1. Células hematopoyéticas

Las células hematopoyéticas útiles en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser cualquier célula hematopoyética capaz de diferenciarse en linfocitos NK, p. ej., células precursoras, células progenitoras hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas o similares. Las células hematopoyéticas pueden obtenerse a partir de fuentes de tejido tales como, p. ej., médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre de placenta, sangre periférica, hígado o similares, o combinaciones de las mismas. Las células hematopoyéticas se pueden obtener de la placenta. En una realización específica, las células hematopoyéticas se obtienen a partir de perfundido placentario. Las células hematopoyéticas del perfundido placentario pueden comprender una mezcla de células hematopoyéticas fetales y maternas, p. ej., una mezcla en la que las células maternas comprenden más del 5% del número total de células hematopoyéticas. Preferiblemente, las células hematopoyéticas del perfundido placentario comprenden al menos aproximadamente 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% de células fetales.

En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas o células progenitoras, a partir de las cuales se producen los linfocitos TSNK, se obtienen a partir de perfundido placentario, sangre de cordón umbilical o sangre periférica. En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas o células progenitoras, a partir de las cuales se producen los linfocitos TSNK, son células combinadas de perfundido placentario y sangre de cordón, p. ej., sangre de cordón de la misma placenta que el perfundido. En otra realización específica, dicha sangre de cordón umbilical se aísla de una placenta distinta de la placenta a partir de la cual se obtiene dicho perfundido placentario. En determinadas realizaciones, las células combinadas se pueden obtener juntando o combinando la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario. En determinadas realizaciones, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 o similares en volumen para obtener las células combinadas. En una realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1 a 1:10, de 5:1 a 1:5, o de 3:1 a 1:3. En otra realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 o 1:10. En una realización más específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 8,5:1,5 (85%:15%).

En determinadas realizaciones, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, o similares por contenido total de células nucleadas (TNC) para obtener las células combinadas. En una realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1 a 10:1, de 5:1 a 1:5 o de 3:1 a 1:3. En otra realización específica, la sangre del cordón umbilical y el perfundido placentario se combinan en una relación de 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 o 1:10.

En otra realización específica, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas o células progenitoras a partir de las cuales se producen dichos linfocitos TSNK son de sangre de cordón umbilical y perfundido placentario, pero en donde dicha sangre del cordón umbilical se aísla de una placenta distinta de la placenta de la que se obtiene dicho perfundido placentario.

En determinadas realizaciones, las células hematopoyéticas son células CD34⁺. En realizaciones específicas, las células hematopoyéticas útiles en los métodos descritos en la presente memoria son CD34⁺CD38⁺ o CD34⁺CD38⁻. En una realización más específica, las células hematopoyéticas son CD34⁺CD38⁻Lin⁻. En otro aspecto, las células hematopoyéticas son una o más de CD2⁻, CD3⁻, CD11b⁻, CD11c⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD24⁻, CD56⁻, CD66b⁻ y/o glucoforina A⁻. En otro aspecto, las células hematopoyéticas son una o más de CD2⁻, CD3⁻, CD11b⁻, CD11c⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD24⁻, CD56⁻, CD66b⁻ y glucoforina A⁻. En otra realización más específica, las células hematopoyéticas son CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻. En otra realización más específica, las células hematopoyéticas son CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻CD235⁻CD36⁻.

En otro aspecto de la descripción, las células hematopoyéticas son CD45⁺. En otra realización específica, las células hematopoyéticas son CD34⁺CD45⁺. En otro aspecto, la célula hematopoyética es Thy-1⁺. En una realización específica, la célula hematopoyética es CD34⁺Thy-1⁺. En otro aspecto, las células hematopoyéticas son CD133⁺. En aspectos específicos, las células hematopoyéticas son CD34⁺CD133⁺ o CD133⁺Thy-1⁺. En otra realización específica, las células hematopoyéticas CD34⁺ son CXCR4⁺. En otra realización específica, las células

hematopoyéticas CD34⁺ son CXCR4⁻. En otro aspecto, las células hematopoyéticas son positivas para KDR (receptor 2 del factor de crecimiento vascular). En otro aspecto, las células hematopoyéticas son CD34⁺KDR⁺, CD133⁺KDR⁺ o Thy-1⁺KDR⁺. En determinados otros aspectos, las células hematopoyéticas son positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH⁺), p. ej., las células son CD34⁺ALDH⁺.

- 5 En determinadas otras realizaciones, las células CD34⁺ son CD45⁻. En realizaciones específicas, las células CD34⁺, p. ej., células CD34⁺, CD45⁻ expresan uno o más, o todos, de los miARN ASH-miR-380, ASH-miR-512, ASH-miR-517, ASH-miR-518c, ASH-miR-519b, y/o ASH-miR-520a.

En determinadas realizaciones, las células hematopoyéticas son CD34⁻.

- 10 Las células hematopoyéticas también pueden carecer de determinados marcadores que indican un compromiso de linaje, o una falta de ingenuidad en el desarrollo. Por ejemplo, las células hematopoyéticas pueden ser HLA-DR⁻. En aspectos específicos, las células hematopoyéticas son CD34⁺HLA-DR⁻, CD133⁺HLA-DR⁻, Thy-1⁺HLA-DR⁻ o ALDH⁺HLA-DR⁻. En otra realización, las células hematopoyéticas son negativas para uno o más, preferiblemente todos, los marcadores de linaje CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y glucoforina A.

- 15 Por lo tanto, pueden seleccionarse células hematopoyéticas para su uso en los métodos descritos en la presente memoria basándose en la presencia de marcadores que indican un estado indiferenciado, o basándose en la ausencia de marcadores de linaje que indican que ha tenido lugar al menos alguna diferenciación de linaje. Los métodos para aislar células, incluidas las células hematopoyéticas, basándose en la presencia o ausencia de marcadores específicos se exponen en detalle, p. ej., en el apartado 6.1.2 más adelante.

- 20 Las células hematopoyéticas utilizadas en los métodos proporcionados en la presente memoria pueden ser una población sustancialmente homogénea, p. ej., una población que comprende al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% de células hematopoyéticas de una sola fuente de tejido, o una población que comprende células hematopoyéticas que presentan los mismos marcadores celulares asociados a células hematopoyéticas. Por ejemplo, las células hematopoyéticas pueden comprender al menos
25 aproximadamente 95%, 98% o 99% células hematopoyéticas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre de placenta, sangre periférica o placenta, p. ej., perfundido placentario.

- Las células hematopoyéticas usadas en los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden obtener a partir de un solo individuo, p. ej., a partir de una única placenta, o de un gran número de individuos, p. ej., pueden agruparse. Cuando las células hematopoyéticas se obtienen a partir de un gran número de individuos y se
30 combinan, las células hematopoyéticas se pueden obtener de la misma fuente de tejido. Por lo tanto, en diversas realizaciones, las células hematopoyéticas combinadas son todas de placenta, p. ej., perfundido placentario, todas las de sangre de placenta, todas las de sangre de cordón umbilical, todas las de sangre periférica y similares.

- Las células hematopoyéticas usadas en los métodos descritos en la presente memoria pueden, en determinadas realizaciones, comprender células hematopoyéticas de dos o más fuentes de tejido. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, cuando se combinan células hematopoyéticas en dos o más fuentes para usar en los métodos de la
35 presente invención, un gran número de células hematopoyéticas usadas para producir linfocitos TSNK comprende células hematopoyéticas de placenta, p. ej., perfundido de placenta. En diversas realizaciones, las células hematopoyéticas usadas para producir linfocitos TSNK comprenden células hematopoyéticas de placenta y de sangre de cordón umbilical; de placenta y sangre periférica; de placenta y sangre de placenta o placenta y médula
40 ósea. En una realización preferida, las células hematopoyéticas comprenden células hematopoyéticas de perfundido placentario en combinación con células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical, en donde la sangre del cordón umbilical y la placenta son del mismo individuo, es decir, en donde coinciden el perfundido y la sangre del cordón umbilical. En realizaciones en las que las células hematopoyéticas comprenden células hematopoyéticas en dos fuentes de tejido, las células hematopoyéticas de las fuentes se pueden combinar en una relación de, por
45 ejemplo, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o 9:1.

6.1.1. Células madre hematopoyéticas de placenta

- En determinadas realizaciones, las células hematopoyéticas usadas en los métodos proporcionados en la presente memoria son células hematopoyéticas de placenta. Tal como se emplea en la presente memoria, "células hematopoyéticas de placenta" significa células hematopoyéticas obtenidas de la propia placenta, y no de sangre de la placenta o de sangre de cordón umbilical. En una realización, las células hematopoyéticas de placenta son CD34⁺. En una realización específica, las células hematopoyéticas de placenta son predominantemente (p. ej., al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) CD34⁺ células CD38⁻. En otra realización específica, las células hematopoyéticas de placenta son predominantemente (por ejemplo, al menos
55 aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) células CD34⁺CD38⁺. Las células hematopoyéticas de placenta pueden obtenerse a partir de placenta de mamífero puerperal (p. ej., humano) por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, p. ej., por perfusión.

- En otro aspecto de la descripción, la célula hematopoyética de la placenta es CD45⁻. En una realización específica, la célula hematopoyética es CD34⁺CD45⁻. En otra realización específica, las células hematopoyéticas de placenta
60 son CD34⁺CD45⁺.

6.2. Producción de linfocitos citolíticos naturales

La producción de linfocitos NK por el método actualmente descrito comprende aumentar una población de células hematopoyéticas. Durante el crecimiento celular, un gran número de células hematopoyéticas dentro de la población de células hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK.

5 Por ejemplo, en la presente memoria se describe un método para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de entre el factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dicha IL-15 y SCF e IL-7 opcionales no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados.

10 En otro ejemplo, los linfocitos NK proporcionados en la presente memoria se producen por un proceso en dos etapas de crecimiento/diferenciación y maduración de linfocitos NK. La primera y segunda etapas comprenden cultivar las células en los medios con una combinación única de factores celulares. En algunos casos, el proceso implica (a) cultivar y aumentar una población de células hematopoyéticas en un primer medio, en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de la población de células hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK; y (b) aumentar los linfocitos NK de la etapa (a) en un segundo medio, en donde los linfocitos NK aumentan y diferencian además, y en donde los linfocitos NK maduran (p. ej., se activan o si no poseen actividad citotóxica). En determinados casos, el método no incluye etapas intermedias entre las etapas (a) y (b), ni etapas de cultivo adicionales antes de la etapa (a), y/o ninguna etapa adicional (p. ej., la etapa de maduración) después de la etapa (b).

6.2.1. Primera etapa de cultivo

15 En determinados ejemplos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden una primera etapa de cultivo y crecimiento de una población de células hematopoyéticas en un primer medio, en donde un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de la población de células hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK.

20 Sin desear estar ligado a ningún parámetro, mecanismo o teoría, el cultivo de las células hematopoyéticas como se proporciona en la presente memoria da como resultado el crecimiento continuo de las células hematopoyéticas y la diferenciación de los linfocitos NK de dichas células. En determinados ejemplos, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o células progenitoras, utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria aumentan y se diferencian en la primera etapa usando una capa de alimentación. En otros ejemplos, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o células progenitoras, aumentan y diferencian en la primera etapa sin el uso de una capa de alimentación.

25 El crecimiento y diferenciación independientes de células sustentadoras de células hematopoyéticas puede tener lugar en cualquier recipiente compatible con cultivo celular y crecimiento, p. ej., matraz, tubo, vaso de precipitados, plato, placa multipocillo, bolsa o similar. En una realización específica, el crecimiento independiente de las células sustentadoras de las células hematopoyéticas tiene lugar en una bolsa, p. ej., una bolsa de cultivo de fluorocarbono flexible permeable a los gases (por ejemplo, de American Fluoroseal). En una realización específica, el recipiente en donde aumentan las células hematopoyéticas es adecuado para el envío, p. ej., a un lugar tal como un hospital o zona militar en donde el crecimiento de los linfocitos NK aumenta y se diferencian más.

30 En determinadas realizaciones, las células hematopoyéticas aumentan y se diferencian, p. ej., de manera continua, en un primer medio de cultivo. En una realización, el primer medio de cultivo es un medio sin componente animal. Ejemplos de medios exentos de componentes animales útiles en los métodos proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a Medio basal Eagle (BME), Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Medio mínimo esencial de Glasgow (GMEM), Mezcla F-12 Ham de medio/nutriente de Eagle modificada por Dulbecco (DMEM/F-12), medio esencial mínimo (MEM), Medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), Mezcla de nutrientes F-10 Ham (F-10 de Ham), Mezcla de nutrientes F-12 Ham (F-12 de Ham), medio RPMI-1640, medio E de Williams, STEMSPAN® (nº en Cat. Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), medio de crecimiento basal Glycostem (GBGM®), medio AIM-V® (Invitrogen), X-VIVO™ 10 (Lonza), X-VIVO™ 15 (Lonza), OPTIMIZER (Invitrogen), STEMSPAN® H3000 (Tecnologías STEMCELL), CELLGRO COMPLETE™ (Mediatech), o cualesquiera de las variantes modificadas o una de sus combinaciones.

35 Como se describe en la presente memoria, el primer medio de cultivo comprende uno o más complementos del medio (p. ej., nutrientes, citocinas y/o factores). Los complementos medios adecuados para su uso en los métodos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo sin limitación, suero tal como suero AB humano, suero bovino fetal (FBS) o suero de ternera fetal (FCS), vitaminas, albúmina de suero bovino (ASB), aminoácidos (p. ej., L-glutamina), ácidos grasos (p. ej., ácido oleico, ácido linoleico o ácido palmítico), insulina (p. ej., insulina humana biotecnológica), transferrina (transferrina humana saturada de hierro), β-mercaptoetanol, factor de células madre (SCF), Ligando de tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), citocinas tales como interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), trombopoyetina (Tpo), heparina u O-acetil-carnitina (también conocida como acetilcarnitina,

O-acetil-L-carnitina u OAC). En una realización específica, el medio usado en la presente memoria comprende suero AB humano. En otra realización específica, el medio utilizado en la presente memoria comprende FBS. En otra realización específica, el medio utilizado en la presente memoria comprende OAC.

5 En determinadas realizaciones, el primer medio no comprende uno o más de entre, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interleucina-6 (IL-6), proteína 1 α inflamatoria de macrófagos (MIP1 α) o factor inhibidor de leucemia (LIF).

Por lo tanto, en un aspecto, en la presente memoria se describe un método en dos etapas para producir linfocitos NK, en donde dicha primera etapa comprende aumentar y diferenciar una población de células hematopoyéticas en un primer medio de cultivo en ausencia de células sustentadoras, en donde un gran número de células hematopoyéticas dentro de dicha población de células hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento, y en donde el medio comprende SCF a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml, IL-2 a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 UI/ml, IL-7 a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml, IL-15 a una concentración de 1 a aproximadamente 150 ng/ml y heparina a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 UI/ml, y en donde dichos SCF, IL-2, IL-7, IL-15 y heparina no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio (p. ej., suero). En determinados aspectos de esta descripción, dicho medio comprende uno o más de entre O-acetil-carnitina (también denominado acetilcarnitina, O-acetil-L-carnitina u OAC), o un compuesto que afecta el ciclo de acetil-CoA en mitodronia, tiazovivina, Y-27632, pyntegrin, inhibidores de Rho cinasa (ROCK), inhibidores de caspasa u otros compuestos/péptidos antiapoptóticos, NOVA-RS (Sheffield Bio-Science) u otros potenciadores del crecimiento de pequeñas moléculas. En determinados ejemplos de esta descripción, dicho medio comprende nicotinamida. En determinados ejemplos de esta descripción, dicho medio comprende aproximadamente OAC 0,5 mM-10 mM. En un ejemplo de esta descripción, dicho medio comprende Stemspan® H3000 y/o DMEM:F12 y OAC aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM. En un ejemplo específico del método, dicho medio es GBGM®. En otro ejemplo, dicho medio comprende Stemspan® H3000 y OAC aproximadamente 5 mM. En otro ejemplo, dicho medio comprende DMEM:F12 y OAC aproximadamente 5 mM. El OAC se puede agregar en cualquier momento durante los métodos de cultivo descritos en la presente memoria. En determinados ejemplos, dicho OAC se agrega al primer medio durante la primera etapa de cultivo. En algunos casos, dicho OAC se agrega al primer medio el día 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 de cultivo. En un ejemplo específico, dicho OAC se agrega al primer medio en el día 7 de la primera etapa de cultivo. En un ejemplo más específico, dicho OAC se agrega al primer medio el día 7 de cultivo y está presente a lo largo de la primera y segunda etapas de cultivo. En determinados casos, dicho OAC se agrega al segundo medio y/o durante la segunda etapa de cultivo. En algunos casos, dicho OAC se agrega al segundo medio el día 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 de cultivo.

En otro aspecto de la descripción, dicho medio es IMDM enriquecido con aproximadamente 5-20% de ASB, aproximadamente 1-10 μ g/ml de insulina humana biotecnológica, aproximadamente 10-50 μ g/ml de transferrina humana saturada con hierro y aproximadamente 10-50 μ M de β -mercaptoetanol. En otro aspecto, dicho medio no comprende uno o más, o ninguno, de IL-11, IL-3, homeosecuencia-B4 (HoxB4) y/o metilcelulosa.

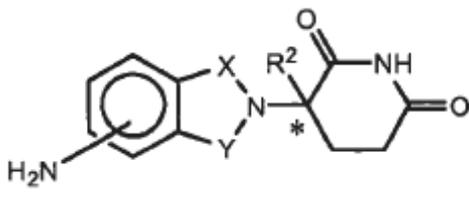
En otros aspectos de la descripción, dicho medio comprende SCF a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml; aproximadamente 5 a aproximadamente 100 ng/ml; o aproximadamente 20 ng/ml. En otros aspectos de la descripción, dicho medio comprende IL-2 a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 2.000 UI/ml; o aproximadamente 100 a aproximadamente 500 UI/ml; o aproximadamente 200 UI/ml. En otros aspectos de la descripción, dicho medio comprende IL-7 a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml; aproximadamente 5 a aproximadamente 100 ng/ml o aproximadamente 20 ng/ml. En otros aspectos de la descripción, dicho medio comprende IL-15 a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml; aproximadamente 5 a aproximadamente 100 ng/ml o aproximadamente 10 ng/ml. En otros aspectos de la descripción, dicho medio comprende heparina a una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 U/ml; o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 U/ml; o aproximadamente 1,5 U/ml.

Aún en otro aspecto de los métodos descritos, dicho medio además comprende ligando tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L) a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml, trombopoyetina (Tpo) a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ng/ml, o una combinación de ambos. En otros ejemplos, dicho medio comprende Flt3-L a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml; aproximadamente 5 a aproximadamente 100 ng/ml o aproximadamente 20 ng/ml. En otros ejemplos, dicho medio comprende Tpo a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml; aproximadamente 5 a aproximadamente 100 ng/ml o aproximadamente 20 ng/ml.

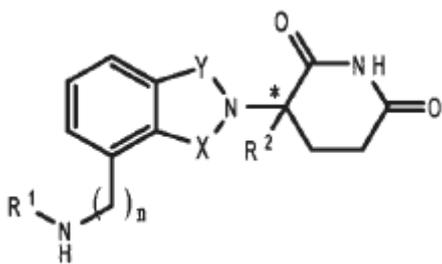
55 En un ejemplo del método, el primer medio de cultivo es GBGM®, que comprende aproximadamente 20 ng/ml de SCF, aproximadamente 20 ng/ml de IL-7, aproximadamente 10 ng/ml de IL-15. En otra realización más específica del método, el primer medio de cultivo es GBGM®, que comprende aproximadamente 20 ng/ml de SCF, aproximadamente 20 ng/ml de Flt3-L, aproximadamente 20 ng/ml de IL-7, aproximadamente 10 ng/ml de IL-15 y aproximadamente 20 ng/ml de Tpo, así como aproximadamente 200 UI/ml de IL-2 o aproximadamente 1,5 U/ml de heparina. En otra realización específica, dicho primer medio de cultivo además comprende 10% de suero humano (p. ej., suero AB humano) o suero fetal (p. ej., FBS).

60

En otro aspecto de la descripción, las células hematopoyéticas aumentan al cultivar dichas células, p. ej., en dicho primer medio, en contacto con un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inhibidor de TNF- α , durante un tiempo y en una cantidad suficiente para producir un aumento detectable en la proliferación de las células hematopoyéticas durante un tiempo dado, en comparación con un número equivalente de células hematopoyéticas no puestas en contacto con el compuesto inmunomodulador. Véase, p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2003/0235909. En algunos ejemplos, el compuesto inmunomodulador es una isoindolina amino-sustituida. En un ejemplo, el compuesto inmunomodulador es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona; 3-(4'-aminoisolidolina-1'-ona)-1-piperidina-2,6-diona; 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona; o 4-amino-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindol-1,3-diona. En otro ejemplo, el compuesto inmunomodulador es pomalidomida o lenalidomida. En otro ejemplo, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en donde uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R₂ es hidrógeno o alquilo inferior, o una de sus sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos o una mezcla de sus estereoisómeros farmacéuticamente aceptables. En otro ejemplo, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en donde uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R¹ es H, alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} o alquil(C₁-C₈)-O-(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈) o alquino(C₂-C₈);

R³ y R^{3'} son independientemente alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O-(CO)R⁵ o C(O)OR⁵;

R⁴ es alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), alquilo(C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆) o alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅);

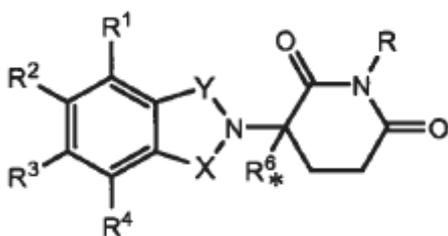
R⁵ es alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈) o alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo o heteroarilo(C₂-C₅);

cada aparición de R⁶ es independientemente H, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈) o alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo(C₂-C₅) o alquil(C₀-C₈)-C(O)OR⁵ o los grupos R⁶ pueden unirse para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

* representa un centro de carbono quiral;

o una de sus sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos o mezcla de sus estereoisómeros farmacéuticamente aceptables. En otra realización, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en donde:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH₂ o C=O;

R es H o CH₂OCOR';

- 5 (i) cada uno de R¹, R², R³ o R⁴, independientemente de los demás, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ o R⁴ es nitro o -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ o R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluoro;

- 10 R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en donde n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ tomado independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ tomados juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno o -CH₂CH₂X₁CH₂CH₂- en donde X₁ es -O-, -S-, o -NH-;

- 15 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de hasta 8 átomos de carbono, o fenilo; y

* representa un centro de carbono quiral;

o una de sus sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereómeros, racematos o mezcla de estereoisómeros farmacéuticamente aceptables.

- 20 En un aspecto de la descripción, el crecimiento de las células hematopoyéticas se realiza en IMDM enriquecido con un 20% de BITS (albúmina de suero bovino, insulina humana recombinante y transferrina), SCF, ligando de Flt3, IL-3 y 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolin-1,3-diona (10 μM en DMSO al 0,05%). En otro aspecto de la descripción, aproximadamente 5x10⁷ células hematopoyéticas, p. ej., células CD34⁺, aumentan en el medio de aproximadamente 5x10¹⁰ células a aproximadamente 5x10¹² células, que se vuelven a poner en suspensión en 100 ml de IMDM para producir un aumento de la población de las células hematopoyéticas. La población de células hematopoyéticas aumentada preferiblemente se criopreserva para facilitar el envío.

En diversas realizaciones específicas, al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de las células hematopoyéticas se diferencian a linfocitos NK.

- 30 En determinadas realizaciones, el método de crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, como se describe en la presente memoria, comprende mantener la población celular que comprende dichas células hematopoyéticas entre aproximadamente 2 x 10⁴ y aproximadamente 2 x 10⁵ células por mililitro durante el crecimiento y diferenciación. En algunas otras realizaciones, el método de crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, como se describe en la presente memoria, comprende mantener la población celular que comprende dichas células hematopoyéticas en no más de aproximadamente 1 x 10⁵ células por mililitro.

- 35 El tiempo para el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas en linfocitos NK puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 120 días. En una realización, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 7 días a aproximadamente 75 días. En otra realización, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 14 días a aproximadamente 50 días. En una realización específica, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días.

6.2.2. Segunda etapa

- 40 Generalmente, en el método proporcionado en la presente memoria, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o células progenitoras, y linfocitos citolíticos naturales, resultantes de la primera etapa, aumentan y diferencian más en una segunda etapa, p. ej., sin el uso de una capa de alimentación o en la presencia de células sustentadoras. El cultivo de las células como se describe en la presente memoria da como resultado el crecimiento continuo, la diferenciación así como la maduración de los linfocitos NK de la primera etapa. En la segunda etapa, los linfocitos NK aumentan, diferencian y maduran, de manera continua, en un segundo medio de cultivo, por ejemplo, que comprende diferentes citocinas y/o moléculas bioactivas que dicho primer medio. En determinados aspectos, el

segundo medio de cultivo es un medio sin componentes animales. Ejemplos de medios de cultivo celular sin componentes animales se describen en el apartado 6.2.1, anterior.

Por lo tanto, en un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para producir linfocitos NK, que comprende aumentar los linfocitos NK de la primera etapa, descrito anteriormente, en un segundo medio en presencia de células sustentadoras y en contacto con interleucina-2 (IL-2) En realizaciones específicas, dicho segundo medio comprende medio de crecimiento celular que comprende IL-2, p. ej., 10 UI/ml a 1000 UI/ml, y uno o más de: suero humano (p. ej., suero AB humano), suero bovino fetal (FBS) o suero de ternera fetal (FCS), p. ej., 5% -15% de FCS v/v; transferrina, p. ej., 10 µg/ml a 50 µg/ml; insulina, p. ej., 5 µg/ml a 20 µg/ml; etanolamina, p. ej., 5×10^{-4} a 5×10^{-5} M; ácido oleico, p. ej., 0,1 µg/ml a 5 µg/ml; ácido linoleico, p. ej., 0,1 µg/ml a 5 µg/ml; ácido palmítico, p. ej., 0,05 µg/ml a 2 µg/ml; albúmina de suero bovino (ASB), p. ej., 1 µg/ml a 5 µg/ml; y/o fitohemaglutinina, p. ej., 0,01 µg/ml a 1 µg/ml. En una realización más específica, dicho segundo medio comprende medio de crecimiento celular que comprende FBS o FCS, por ejemplo, 10% de FCS v/v, IL-2, transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, albúmina de suero bovino (ASB) y fitohemaglutinina. En una realización más específica, dicho segundo medio comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), 10% de SFB o FCS, 400 UI de IL-2, 35 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de insulina, 2×10^{-5} M de etanolamina, 1 µg/ml de ácido oleico, 1 µg/ml de ácido linoleico (Sigma-Aldrich), 0,2 µg/ml de ácido palmítico (Sigma-Aldrich), 2,5 µg/ml de ASB (Sigma-Aldrich) y 0,1 µg/ml de fitohemaglutinina.

En determinadas realizaciones, el segundo medio no comprende uno o más de entre, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interleucina-6 (IL-6), proteína inflamatoria 1α de macrófagos (MIP1α) o factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Además del método, en la presente memoria se describe cualquiera de los medios descritos anteriormente como composiciones.

Cuando se emplean células sustentadoras, pueden generarse a partir de diversos tipos de células. Ejemplos de estos tipos de células incluyen, sin limitación, fibroblastos, células madre (p. ej., células madre de placenta adherentes al plástico de cultivo hístico), células sanguíneas (p. ej., células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) y células cancerosas (p. ej., leucemia mielógena crónica (LMC) células tales como K562). En una realización específica, dicho cultivo en dicho segundo medio comprende cultivar usando células sustentadoras, p. ej., células K562 y/o células mononucleares de sangre periférica (CMSP), p. ej., en el momento en que se inician las células en dicho segundo medio, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días después. En ciertas realizaciones, las células sustentadoras son opcionalmente de una especie diferente a las células que están soportando. Por ejemplo, los linfocitos NK humanas pueden ser soportados por fibroblastos embrionarios de ratón (de cultivo primario o una estirpe telomerizada).

En determinadas realizaciones, las células sustentadoras se inactivan opcionalmente por irradiación (p. ej., irradiación γ) o tratamiento con un agente antimetabólico tal como mitomicina C, para evitar que superen las células que están soportando, pero permitir la síntesis de factores importantes que soportan los linfocitos NK. Por ejemplo, las células pueden irradiarse a una dosis para inhibir la proliferación, pero permitir la síntesis de factores importantes que soportan células madre embrionarias humanas (hES) (aproximadamente 4.000 rads de irradiación gamma).

El cultivo de linfocitos NK para la segunda etapa puede tener lugar en cualquier recipiente compatible con cultivo celular y crecimiento, p. ej., matraz, tubo, vaso de precipitados, plato, placa multipocillo, bolsa o similar. En una realización específica, el cultivo de linfocitos NK dependiente de células sustentadoras tiene lugar en una bolsa, p. ej., una bolsa de cultivo de fluorocarbono flexible permeable a los gases (p. ej., de American Fluoroseal). En una realización específica, el recipiente en donde se cultivan los linfocitos NK es adecuado para envío, p. ej., a un sitio tal como un hospital o zona militar en donde los linfocitos NK aumentan, se diferencian y maduran más.

La diferenciación de las células de la etapa 1 en linfocitos TSNK puede evaluarse detectando marcadores específicos de linfocitos NK, p. ej., por citometría de flujo. Los marcadores específicos de linfocitos NK incluyen, pero sin limitación, CD56, CD94, CD117 y NKp46. La diferenciación también puede evaluarse por las características morfológicas de los linfocitos NK, p. ej., gran tamaño, alta actividad de síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico (RE) abundante y/o gránulos preformados.

El tiempo para el crecimiento y diferenciación de las células de la etapa 1 en linfocitos TSNK puede ser, p. ej., de aproximadamente 3 días a aproximadamente 120 días. En una realización, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 7 días a aproximadamente 75 días. En otra realización, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 14 días a aproximadamente 50 días. En una realización específica, el tiempo de diferenciación es de aproximadamente 10 días a aproximadamente 21 días.

La diferenciación de células hematopoyéticas en linfocitos NK puede evaluarse mediante la detección de marcadores, p. ej., CD56, CD94, CD117, NKG2D, DNAM-1 y NKp46, por ejemplo, por citometría de flujo. La diferenciación también puede evaluarse por las características morfológicas de los linfocitos NK, p. ej., gran tamaño, alta actividad de síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico abundante (RE) y/o gránulos preformados. La maduración de linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) puede evaluarse mediante la detección de uno o más marcadores funcionalmente relevantes, por ejemplo, CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR y la familia NKG2 de receptores activadores (p. ej., NKG2D). La maduración de linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) también puede evaluarse mediante la detección de marcadores específicos durante diferentes etapas de desarrollo.

Por ejemplo, en una realización, los linfocitos pro-NK son CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁺, CD117⁻ y/o CD161⁻. En otra realización, los linfocitos pre-NK son CD34⁻, CD45RA⁺, CD10⁻, CD117⁺ y/o CD161⁻. En otra realización, los linfocitos NK inmaduros son CD34⁻, CD117⁺, CD161⁺, NKp46⁻ y/o CD94/NKG2A⁻. En otra realización, los linfocitos NK CD56^{bright} son CD117⁺, NKp46⁺, CD94/NKG2A⁺, CD16⁻ y/o KIR^{+/}. En otra realización, los linfocitos NK CD56^{dim} son CD117⁻, NKp46⁺, CD94/NKG2A^{+/}, CD16⁺ y/o KIR⁺. En una realización específica, la maduración de linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) viene determinada por el porcentaje de linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) que son CD161⁻, CD94⁺ y/o NKp46⁺. En una realización más específica, al menos el 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de linfocitos NK maduros (p. ej., linfocitos TSNK) son NKp46⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos el 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de linfocitos NK maduros (p. ej., linfocitos TSNK) son CD94⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos el 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de linfocitos NK maduras (p. ej., linfocitos TSNK) son CD161⁻.

En algunas realizaciones, la diferenciación de células hematopoyéticas en linfocitos NK se evalúa detectando el nivel de expresión de, p. ej., CD3, CD7 o CD127, CD10, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD56, CD94, CD117, CD161, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 o TO-PRO-3, utilizando, p. ej., anticuerpos contra uno o más de estos marcadores celulares. Dichos anticuerpos se pueden conjugar con un marcador detectable, por ejemplo, como marcador fluorescente, p. ej., FITC, R-PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7 o APC-H7.

6.3. Aislamiento de linfocitos TSNK

Se conocen en la técnica métodos para aislar linfocitos citolíticos naturales y se pueden emplear para aislar los linfocitos TSNK. Los linfocitos citolíticos naturales se pueden aislar o enriquecer tiñendo las células de una fuente de tejido, p. ej., sangre periférica, con anticuerpos contra CD56 y CD3, y seleccionando linfocitos CD56⁺CD3⁻. Los linfocitos TSNK se pueden aislar usando un equipo disponible en el mercado, por ejemplo, el NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Los linfocitos TSNK también pueden aislarse o enriquecerse mediante la eliminación de células que distintas de linfocitos NK en una población de células que comprenden los linfocitos TSNK. Por ejemplo, los linfocitos TSNK pueden aislarse o enriquecerse suprimiendo las células que presentan marcadores de células distintas de NK utilizando, p. ej., anticuerpos contra uno o más de CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR y/o CD235a (glucoforina A). El aislamiento negativo se puede llevar a cabo usando un equipo disponible en el mercado, p. ej., el NK Cell Negative Isolation Kit (DynaL Biotech). Las células aisladas por estos métodos pueden además clasificarse, p. ej., para separar las células CD16⁺ y CD16⁻.

La separación celular puede realizarse, p. ej., por citometría de flujo, clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o, preferiblemente, clasificación de células activada por campos magnéticos usando microperlas conjugadas con anticuerpos específicos. Las células pueden aislarse, p. ej., usando una técnica de clasificación celular activada por campos magnéticos (MACS), un método para separar partículas en función de su capacidad para unir perlas magnéticas (p. ej., de aproximadamente 0,5-100 µm de diámetro) que comprenden uno o más anticuerpos específicos, p. ej., anticuerpos anti-CD56. La separación de células por campos magnéticos puede realizarse y automatizarse usando, p. ej., un separador AUTOMACSTM (Miltenyi). Se puede realizar una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluida la adición covalente de anticuerpos que reconoce específicamente una molécula concreta o hapteno de la superficie celular. Las perlas se mezclan con las células para permitir la unión. Las células se pasan luego a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador específico de superficie celular. Estas células se pueden aislar y volver a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores adicionales de superficie celular. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que unen ambos anticuerpos. Dichas células pueden diluirse luego en placas separadas, tales como placas de microvaloración para aislamiento clonal.

6.4. Perfundido placentario

Los linfocitos TSNK pueden producirse a partir de células hematopoyéticas, p. ej., células madre progenitoras o hematopoyéticas de cualquier fuente, p. ej., tejido placentario, perfundido placentario, sangre de cordón umbilical, sangre de placenta, sangre periférica, bazo, hígado o similares. En determinadas realizaciones, las células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas combinadas de perfundido placentario y de sangre del cordón de la misma placenta utilizada para generar el perfundido placentario. Perfundido placentario que comprende células de perfundido placentario que pueden obtenerse, por ejemplo, por los métodos descritos en las patentes de EE.UU. n° 7.045.148 y n° 7.468.276.

6.4.1. Composición de la recogida celular

El perfundido placentario y las células del perfundido, a partir de las cuales se pueden aislar células madre o progenitoras hematopoyéticas, o útiles en la supresión tumoral o en el tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, cáncer o una infección vírica, p. ej., en combinación con los linfocitos TSNK, según lo dispuesto en la presente memoria, se puede recoger por perfusión de un mamífero, p. ej. de una placenta puerperal humana, utilizando una composición para recogida de células de placenta. El perfundido se puede recoger de la placenta por perfusión de la placenta con cualquier solución fisiológicamente aceptable, p. ej., una solución salina, medio de cultivo o una composición para recogida de células más compleja. Una composición para recogida de células adecuada para perfundir una placenta, y para la recogida y conservación de células de perfundido se describe en detalle en la publicación de la solicitud de los EE.UU. mencionada n° 2007/0190042.

La composición para recogida de células puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de células madre, por ejemplo, una solución salina (p. ej., solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9% etc.), un medio de cultivo (p. ej., DMEM, H.DMEM, etc.) y similares.

- 5 La composición para recogida de células puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células de placenta, es decir, evitar que las células de placenta mueran, o retrasar la muerte de las células de placenta, reducir el número de células de placenta en una población de células que mueren, o similar, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, p. ej., un inhibidor de apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (PAN), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (p. ej., 2-(1H-indol-3-yl)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina o clonazepam); un inhibidor de TNF- α ; y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).
- 10
- 15 La composición para recogida de células puede comprender una o más enzimas degradadoras de tejidos, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una hialuronidasa, una ribonucleasa o una desoxirribonucleasa o similares. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (p. ej., colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASA, hialuronidasa y similares.
- 20 La composición para recogida de células puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostáticamente eficaz de un antibiótico. En algunos casos, el antibiótico es un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En un caso concreto, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.
- 25

- La composición para recogida de células también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones de magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor que 20.000 daltons, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide sintético o de origen natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente a aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presente a aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un agente reductor (p. ej., N-acetilcisteína presente a aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que evita la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamilo presente a aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (p. ej., aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1.000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etilisopropil-amilorida, hexametilen-amilorida, dimetil-amilorida o isobutil-amilorida presente a aproximadamente 1,0 μ M a aproximadamente 5 μ M).
- 30
- 35
- 40

6.4.2. Recogida y manipulación de placenta

- En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. Preferiblemente, la placenta se recupera de una paciente después de la autorización y después de que se toman antecedentes personales completos del paciente y se asocian a la placenta. Preferiblemente, los antecedentes personales continúan después del parto.
- 45

- Antes de la recuperación del perfundido, se extrae sangre del cordón umbilical y sangre de la placenta. En determinados casos, después del parto, se recupera la sangre del cordón umbilical en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso convencional de recuperación de sangre del cordón umbilical. Generalmente, se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véase, p. ej., Anderson, Patente de EE.UU. nº 5.372.581, Hessel *et al.*, Patente de EE.UU. nº 5.415.665). La aguja o cánula generalmente se coloca en la vena umbilical y la placenta se puede masajear suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta. Dicha recuperación de sangre del cordón umbilical puede realizarse comercialmente, p. ej., LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry y CryoCell. Preferiblemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación para minimizar la alteración del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón umbilical.
- 50
- 55

- Generalmente, una placenta se transporta desde la sala de parto o alumbramiento a otro lugar, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón umbilical y la recogida del perfundido. La placenta se transporta preferentemente en un dispositivo de transporte estéril y aislado térmicamente (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20 y 28°C), por ejemplo, colocando la placenta, con cordón umbilical proximal sujeto, en una bolsa de plástico estéril con cierre hermético, que se coloca a continuación en un recipiente aislado. En otro aspecto, la placenta se transporta en un equipo de recogida de sangre del cordón sustancialmente como se describe en la
- 60

patente de EE.UU. nº 7.147.626. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio cuatro a veinticuatro horas después del parto. En determinados aspectos, el cordón umbilical proximal se pinza, preferiblemente dentro de 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón umbilical. En otros aspectos, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón umbilical, pero antes del tratamiento posterior de la placenta.

La placenta, antes de la recogida del perfundido, puede almacenarse en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). La placenta puede almacenarse durante un período de más de cuarenta y ocho horas, y preferiblemente durante un período de cuatro a veinticuatro horas antes de perfundir la placenta para eliminar cualquier resto de sangre del cordón umbilical. La placenta se almacena preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5°C a 25°C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una solución de heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (p. ej., 1% p/p en solución 1:1.000). La placenta desangrada se almacena preferentemente durante no más de 36 horas antes de recoger el perfundido placentario.

6.4.3. Perfusión de placenta

Los métodos para perfusión de placentas de mamífero y de obtención de perfundido placentario se describen, por ejemplo, en Hariri, patentes de EE.UU. nº 7.045.148 y nº 7.255.879, y en las Publicaciones de Solicitud de EE.UU. nº 2007/0190042 y nº 20070275362.

El perfundido puede obtenerse mediante el paso de una solución de perfusión, p. ej., solución salina, medio de cultivo o composiciones para recogida de células descritas anteriormente, a través de la vasculatura de la placenta. Una placenta de mamífero puede perfundirse mediante el paso de la solución de perfusión a través tanto de la arteria umbilical como de la vena umbilical. El caudal de la solución de perfusión a través de la placenta se puede lograr usando, p. ej., caudal de gravedad en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión se fuerza a través de la placenta usando una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. La vena umbilical puede estar, p. ej., canulada con una cánula, p. ej., una cánula de TEFLON® o de plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En el preparado para perfusión, la placenta está preferiblemente orientada de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical están situadas en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el paso de una solución de perfusión a través de la vasculatura de la placenta, o a través de la vasculatura de la placenta y el tejido circundante. En un aspecto, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada mediante un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión pasa dentro de la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión exuda y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado desde la superficie de la placenta que se sujetó al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y dejar fluir o filtrar por las aberturas en la pared de la placenta que está interconectada con la pared uterina materna. En otro aspecto, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, es decir, se pasa a través solamente de la vasculatura de la placenta (tejido fetal).

En un aspecto, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, p. ej., a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa a la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión exuda de las paredes de los vasos sanguíneos y/o pasa a su través hacia los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado desde la superficie de la placenta que se sujetó al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y dejar fluir o filtrar por las aberturas en la pared de la placenta que está interconectada con la pared uterina materna. Las células de placenta que se recogen por este método, que se puede denominar método "pan", son normalmente una mezcla de células fetales y maternas.

En otro ejemplo, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales. Las células de placenta recolectadas por este método, que se puede denominar método en "circuito cerrado", suelen ser casi exclusivamente fetales.

El método de perfusión en circuito cerrado puede realizarse de la siguiente manera. Se obtiene una placenta puerperal dentro de las 48 horas posteriores al nacimiento. El cordón umbilical se sujeta y corta por encima de la abrazadera. El cordón umbilical puede descartarse, o se puede tratar para recuperar, p. ej., células madre del cordón umbilical y/o procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica puede retenerse durante la perfusión, o puede separarse del corion, p. ej., usando una disección roma con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, puede, p. ej., descartarse o procesarse, p. ej., para obtener células madre por digestión enzimática, o para producir, p. ej., un biomaterial de membrana amniótica, p. ej., el biomaterial descrito en la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos sanguíneos visibles y la sangre residual, p. ej.,

usando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, p. ej., cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para exponer una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican y se abren, p. ej., haciendo avanzar una pinza de cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada vaso. El aparato, p. ej., tubería de plástico conectada a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta a continuación en cada una de las arterias de placenta. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para este fin, p. ej., una bomba peristáltica. A continuación, la tubería de plástico, conectada a un depósito de recogida estéril, p. ej., una bolsa de sangre tal como una bolsa de recogida de 250 ml, se inserta en la vena de la placenta. Alternativamente, la tubería conectada a la bomba se inserta en la vena de la placenta, y los tubos a un depósito(s) de recogida se insertan en una o ambas arterias de placenta. La placenta se perfunde a continuación con un volumen de solución de perfusión, p. ej., aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. Las células en el perfundido se recogen a continuación, p. ej., por centrifugación.

En un aspecto, el cordón umbilical proximal se sujeta durante la perfusión, y más preferiblemente, se sujeta a 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.

La primera recogida de fluido de perfusión de una placenta de mamífero durante el proceso de desangrado generalmente se colorea con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón umbilical y/o de la sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que avanza la perfusión y las células sanguíneas residuales del cordón se eliminan por lavado de la placenta. En general, de 30 a 100 ml de líquido de perfusión son adecuados para extraer inicialmente sangre de la placenta, pero se puede usar más o menos líquido de perfusión según los resultados observados.

El volumen de líquido de perfusión utilizado para perfundir la placenta puede variar en función del número de células de placenta a recolectar, el tamaño de la placenta, el número de recogidas que se realicen de una única placenta, etc. En diversos ejemplos, el volumen de líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5.000 ml, 50 ml a 4.000 ml, 50 ml a 3.000 ml, 100 ml a 2.000 ml, 250 ml a 2.000 ml, 500 ml a 2.000 ml o 750 ml a 2.000 ml. Normalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después del desangrado.

La placenta se puede perfundir un gran número de veces en el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se ha de perfundir un gran número de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un recipiente u otro recipiente adecuado y perfundirse con una composición para recogida de células o una solución de perfusión patrón (p. ej., una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS") con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina) y/o con o sin un agente antimicrobiano (p. ej., β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomina (p. ej., a 40-100 μ g/ml), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0,5 μ g/ml). Por ejemplo, una placenta aislada puede mantenerse o cultivarse durante un período de tiempo sin recoger el perfundido, de manera que la placenta se mantenga o cultive durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y recogida de perfundido. La placenta perfundida se puede mantener por uno o más hora(s) adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse una segunda vez con, p. ej., 700-800 ml de líquido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Preferiblemente, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, p. ej., la composición para recogida de células de placenta, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes momentos pueden procesarse además individualmente para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo, células nucleadas totales. Los perfundidos de diferentes momentos también pueden juntarse.

6.4.4. Perfundido placentario y células de perfundido placentario

Normalmente, el perfundido placentario de una sola perfusión de la placenta comprende de aproximadamente 100 millones a aproximadamente 500 millones de células nucleadas, incluidas las células hematopoyéticas a partir de las cuales se pueden producir linfocitos TSNK por el método descrito en la presente memoria. En algunos casos, el perfundido placentario o las células de perfundido comprenden células CD34⁺, p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas. Dichas células pueden, en una realización más específica, comprender células progenitoras o CD34⁺CD45⁻, células madre o progenitoras CD34⁺CD45⁺ o similares. En algunos casos, perfundido o las células de perfundido se crioconservan antes del aislamiento de las células hematopoyéticas de las mismas. En algunos otros casos, el perfundido placentario comprende, o las células de perfundido comprenden, solo células fetales, o una combinación de células fetales y células maternas.

6.5. Linfocitos TSNK

En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan linfocitos TSNK, los linfocitos NK producidos por los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., el método en dos etapas). También Además en la presente memoria se proporciona una población de células que comprende los linfocitos TSNK producidos por los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., el método en dos etapas). En una realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son CD3⁻CD56⁺. En una realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son CD3⁻CD56⁺CD16⁻. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (por ejemplo, linfocitos TSNK) son además CD94⁺CD117⁺. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son además CD161⁻. En otra realización específica, dichos linfocitos NK (p. ej., linfocitos TSNK) son además NKG2D⁺. En otra

realización específica, dichos linfocitos NK son además NKp46⁺. En otra realización específica, dichos linfocitos NK son además CD226⁺.

5 En determinadas realizaciones, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% de dichos linfocitos TSNK son CD56⁺ y CD16⁻. En otras realizaciones, al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% o 90% de dichos linfocitos TSNK son CD3⁻ y CD56⁺. En otras realizaciones, al menos el 50%, 52%, 54%, 56%, 58% o 60% de dichos linfocitos TSNK son NKG2D⁺. En otras realizaciones, menos del 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% o 3% de dichas células son NKB1⁺. En algunas otras realizaciones, menos del 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son NKAT2⁺. En algunas otras realizaciones, menos del 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% o 2% de dichos linfocitos TSNK son CD56⁺ y CD16⁺. En realizaciones más específicas, al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son NKp46⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% u 85% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD117⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD94⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD161⁺. En otras realizaciones más específicas, al menos 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD226⁺. En realizaciones más específicas, al menos el 20%, 25%, 30%, 35% o 40% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD7⁺. En realizaciones más específicas, al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% o 60% de dichos linfocitos TSNK CD3⁻, CD56⁺ son CD5⁺.

20 En varios otros aspectos, los linfocitos TSNK se pueden combinar con, p. ej., linfocitos NK, en donde dichos linfocitos NK se han aislado de una fuente de tejido y no han aumentado; los linfocitos NK aislados de una fuente de tejido y que han aumentado, o los linfocitos NK producidos por un método diferente, p. ej., linfocitos citolíticos naturales CD56⁺CD16⁺, p. ej., en proporciones de, por ejemplo, aproximadamente 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o aproximadamente 9:1. Como se emplea en este contexto, "aislado" significa que las células se han eliminado de su entorno de tejido normal.

25 Los linfocitos TSNK pueden tener un genotipo fetal o un genotipo materno. Por ejemplo, debido a que la placenta en el puerperio, como fuente de células hematopoyéticas adecuada para producir linfocitos TSNK, comprende tejido y células del feto y de la madre, el perfundido placentario puede comprender solo células fetales o una mayoría sustancial de células fetales (p. ej., más de aproximadamente 90%, 95%, 98% o 99%), o puede comprender una mezcla de células fetales y maternas (p. ej., las células fetales comprenden menos de aproximadamente 90%, 80%, 70%, 60%, o 50% del total de células nucleadas del perfundido). En una realización, los linfocitos TSNK proceden solo de células hematopoyéticas de placenta fetales, p. ej., células obtenidas de la perfusión en circuito cerrado de la placenta en donde la perfusión produce perfundido que comprende una mayoría sustancial, o solo, células hematopoyéticas de placenta fetales. En otra realización, los linfocitos TSNK proceden de células fetales y maternas, p. ej., células obtenidas por perfusión por el método pan (véase anteriormente), en donde la perfusión produjo un perfundido que comprende una mezcla de células de placenta fetales y maternas. Por lo tanto, en un aspecto, en la presente memoria se proporciona una población de linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta, la mayoría sustancial de los cuales tienen el genotipo fetal. En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria una población de linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta que comprenden linfocitos citolíticos naturales que tienen el genotipo fetal y linfocitos citolíticos naturales que tienen el fenotipo materno.

40 También se describen en la presente memoria poblaciones de linfocitos TSNK que comprenden linfocitos citolíticos naturales no producidos por los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en un aspecto, se describe en la presente memoria una población de linfocitos TSNK que también comprende linfocitos citolíticos naturales aislados de, p. ej., sangre de cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea, o una combinación en dos o más de las anteriores, o linfocitos NK que han aumentado por un método diferente a los métodos descritos en la presente memoria. Dichas poblaciones de linfocitos TSNK pueden comprender los linfocitos TSNK y otros linfocitos NK en, p. ej., una proporción de aproximadamente 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, o aproximadamente 1:100, o similar.

45 En algunos casos de esta descripción, los linfocitos citolíticos naturales aislados (p. ej., linfocitos TSNK) o poblaciones enriquecidas para linfocitos citolíticos naturales (p. ej., linfocitos TSNK) pueden evaluarse detectando uno o más marcadores funcionalmente relevantes, por ejemplo, CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR y la familia NKG2 de receptores activadores (p. ej., NKG2D). En algunos casos de esta descripción, la pureza de los linfocitos citolíticos naturales aislados o enriquecidos puede confirmarse detectando uno o más de CD56, CD3 y CD16.

50 Opcionalmente, los linfocitos citolíticos naturales aislados o enriquecidos con actividad citotóxica pueden evaluarse, p. ej., en un ensayo de citotoxicidad usando células tumorales, p. ej., células tumorales K562, LN-18, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 o U266 cultivadas o similares como células diana.

60 6.6. Linfocitos TSNK en combinación con perfundido placentario

Además se describen en la presente memoria composiciones que comprenden linfocitos TSNK en combinación con perfundido placentario, células de perfundido placentario y/o células de placenta adherentes, p. ej., para su empleo en la supresión de la proliferación de una célula tumoral o un gran número de células tumorales.

6.6.1. Combinaciones de linfocitos TSNK y perfundido o células de perfundido

5 Además se describen en la presente memoria composiciones que comprenden combinaciones de linfocitos TSNK y perfundido placentario y/o células de perfundido placentario. En un aspecto, por ejemplo, se proporciona en la presente memoria un volumen de perfundido placentario enriquecido con linfocitos TSNK. En algunos casos, por ejemplo, cada mililitro de perfundido placentario se enriquece con aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más linfocitos TSNK. En otros casos, las células de perfundido placentario se enriquecen con linfocitos TSNK. En algunos otros casos, cuando las células de perfundido placentario se combinan con linfocitos TSNK, las células de perfundido placentario generalmente comprenden aproximadamente, más que aproximadamente, o menos de aproximadamente, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células. En algunos otros casos, cuando los linfocitos TSNK se combinan con un gran número de células de perfundido placentario y/o linfocitos citolíticos naturales combinados, los linfocitos NK generalmente comprenden aproximadamente, más que aproximadamente, o menos de aproximadamente, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del número total de células. En algunos otros casos, cuando se usan linfocitos TSNK para enriquecer el perfundido placentario, el volumen de solución (p. ej., solución salina, medio de cultivo o similar) en donde se suspenden las células comprende aproximadamente, más que aproximadamente, o menos que aproximadamente, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% o 1% del volumen total de perfundido más células, donde los linfocitos TSNK se ponen en suspensión a aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por mililitro antes del enriquecimiento.

En otros casos, cualquiera de las combinaciones de células anteriores se combina, a su vez, con sangre de cordón umbilical o células nucleadas de sangre de cordón umbilical.

25 Además, en la presente memoria se describe perfundido placentario agrupado que se obtiene en dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas, y se combinan, p. ej., se agrupan. Dicho perfundido combinado puede comprender volúmenes aproximadamente iguales de perfundido de cada fuente, o puede comprender diferentes volúmenes de cada fuente. Los volúmenes relativos de cada fuente pueden seleccionarse al azar, o pueden basarse en, p. ej., una concentración o cantidad de uno o más factores celulares, p. ej., citocinas, factores de crecimiento, hormonas o similares; el número de células placentarias en el perfundido de cada fuente; u otras características del perfundido de cada fuente. El perfundido procedente de múltiples perfusiones de la misma placenta se puede agrupar de manera similar.

35 De la misma manera, en la presente memoria se describen células de perfundido placentario y linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta, que se obtienen a partir de dos o más fuentes, p. ej., dos o más placentas y se combinan. Dichas células combinadas pueden comprender números aproximadamente iguales de células de las dos o más fuentes, o diferentes números de células de una o más de las fuentes combinadas. Los números relativos de células de cada fuente se pueden seleccionar basándose, p. ej., en el número de uno o más tipos de células específicos en las células que se combinarán, p. ej., el número de células CD34⁺, etc.

40 Además en la presente memoria se describen linfocitos TSNK, y combinaciones de linfocitos TSNK con perfundido placentario y/o células de perfundido placentario, que se han ensayado para determinar el grado o cantidad de supresión tumoral (es decir, la potencia) que cabe esperar de, p. ej., un número dado de linfocitos TSNK, o un volumen dado de perfundido. Por ejemplo, una alícuota o número de muestra de células se pone en contacto con un número conocido de células tumorales en condiciones en las que las células tumorales si no proliferarían, y la tasa de proliferación de las células tumorales en presencia de perfundido placentario, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales placentarios, o de sus combinaciones, a lo largo del tiempo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas o más) se compara con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales placentarios, o combinaciones de las mismas. La potencia de las células puede expresarse, p. ej., como número de células o volumen de solución requerida para suprimir el crecimiento de células tumorales, p. ej., en aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o similares.

55 En determinados aspectos, los linfocitos TSNK se dan como unidades administrables de calidad farmacéutica. Dichas unidades pueden proporcionarse en volúmenes discretos, p. ej., 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 35 ml, 40 ml, 45 ml, 50 ml, 55 ml, 60 ml, 65 ml, 70 ml, 75 ml, 80 ml, 85 ml, 90 ml, 95 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml o similares. Dichas unidades pueden producirse de manera que contengan un número específico de células, p. ej., linfocitos TSNK solas, o linfocitos TSNK en combinación con otros linfocitos NK o células de perfundido, p. ej., 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células por unidad. Por ejemplo, las unidades pueden comprender aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 o más linfocitos TSNK por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células por unidad. Dichas unidades pueden proporcionarse para contener números específicos de linfocitos TSNK y/o cualquiera de las demás células.

En los aspectos anteriores, los linfocitos TSNK o combinaciones de linfocitos TSNK con otros linfocitos NK, células de perfundido o perfundido pueden ser autólogos para un receptor (es decir, obtenidas del receptor) o alogénicas para un receptor (es decir, obtenidas finalmente de otro individuo de dicho receptor).

5 En algunos casos, cada unidad de células está marcada para especificar uno o más de entre volúmenes, número de células, tipo de células, si la unidad se ha enriquecido para un tipo determinado de célula, y/o potencia de un número dado de células en la unidad, o un número dado de mililitros de la unidad, es decir, si las células en la unidad producen una supresión cuantificable de proliferación de un tipo o tipos determinados de células tumorales.

6.6.2. Combinaciones de linfocitos TSNK y células madre de placenta adherentes

10 En otros aspectos, los linfocitos TSNK, solos o en combinación con perfundido placentario o células de perfundido placentario, se enriquecen con células de placenta adherentes aisladas, p. ej., células madre de placenta y células multipotentes de placenta como se describe, p. ej., en Hariri Patentes de EE.UU. n° 7.045.148 y n° 7.255.879, y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n° 2007/0275362. "Células de placenta adherentes" significa que las células son adherentes a una superficie de cultivo hístico, p. ej., plástico de cultivo hístico. Las células de placenta adherentes útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria no son trofoblastos, 15 células germinativas embrionarias o células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células madre de placenta adherentes se usan como células sustentadoras durante los procesos (p. ej., el método en dos etapas) como se describió anteriormente.

20 Los linfocitos TSNK, solos o en combinación con perfundido placentario o células de perfusión de la placenta se pueden enriquecer con, p. ej., 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células de placenta adherentes por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células de placenta adherentes. Las células de placenta adherentes en las combinaciones pueden ser, p. ej., células de placenta adherentes que se han cultivado para, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, o 40 poblaciones por duplicado, o más.

25 Las células de placenta adherentes aisladas, cuando se cultivan en cultivos primarios o aumentan en cultivo celular, se adhieren al sustrato de cultivo hístico, p. ej., la superficie del recipiente de cultivo hístico (p. ej., plástico de cultivo hístico). Las células de placenta adherentes en cultivo adoptan generalmente un aspecto fibroblastoideo, estrellado, con una serie de procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células de placenta adherentes son, sin embargo, morfológicamente distinguibles de los fibroblastos cultivados en las mismas 30 condiciones, ya que las células de placenta adherentes presentan un mayor número de dichos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células de placenta adherentes también se distinguen de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adoptan una morfología más redondeada o adoquinada en cultivo.

35 Las células de placenta adherentes aisladas, y las poblaciones de células de placenta adherentes, útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, expresan un gran número de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células o poblaciones de células que comprenden las células de placenta adherentes. Las células de placenta adherentes y las poblaciones de células de placenta adherentes útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen células de placenta adherentes y poblaciones celulares adherentes que contienen células de placenta obtenidas directamente de la placenta o cualquier parte de la misma (p. ej., amnios, corion, placa amnios-corion, cotiledones placentarios, cordón umbilical y similares). La 40 población de células madre de placenta adherentes, puede ser una población (es decir, dos o más) de células madre de placenta adherentes en cultivo, p. ej., una población en un recipiente, p. ej., una bolsa.

45 Las células de placenta adherentes generalmente expresan los marcadores CD73, CD105 y CD200, y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38 o CD45. Las células madre adherentes de placenta también pueden expresar HLA-ABC (CMH-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar células de placenta adherentes y para distinguir las células de placenta adherentes de otros tipos de células. Debido a que las células de placenta adherentes pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características similares a las células madre mesenquimatosas. La falta de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica las células madre de placenta adherentes como células madre no hematopoyéticas.

50 En algunos casos, las células de placenta adherentes aisladas descritas en la presente memoria suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerígenas o el crecimiento tumoral.

55 En cuanto a las células madre adherentes de placenta se utilizan como células sustentadoras durante el método en dos etapas de la presente invención la siguiente caracterización de dichas células describe diferentes realizaciones de la invención. En determinadas realizaciones, las células de placenta adherentes aisladas son células madre de placenta aisladas. En determinadas otras realizaciones, las células de placenta adherentes aisladas son células multipotentes de placenta aisladas. En una realización específica, las células de placenta adherentes aisladas son CD34⁻, CD10⁺ y CD105⁺ según se detecta por citometría de flujo. En una realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son células madre de placenta. En otra realización más específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son células de placenta adherentes multipotentes. En otro aspecto, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas tienen posibilidades de 60 diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteógeno o células de un fenotipo condrógeno. En una realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas

- son además CD200⁺. En otra realización más específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son además CD90⁺ o CD45⁻, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ aisladas son además CD90⁺ o CD45⁻, según se detecta por citometría de flujo.
- 5 En una realización más específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además CD90⁺ o CD45⁻, como se detecta mediante citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta adherentes CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ son además CD90⁺ y CD45⁻, según se detecta por citometría de flujo. En otra realización más específica, las células de placenta CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ son además CD80⁺ y CD86⁺, según se detecta por citometría de flujo.
- 10 En una realización, las células de placenta adherentes aisladas son CD200⁺, HLA-G⁺. En una realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En una realización más específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células de placenta adherentes aisladas producen uno o más corpúsculos embrioideos cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioideos.
- 15 En otra realización, las células de placenta adherentes aisladas son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. En una realización específica de dichas poblaciones, dichas células de placenta adherentes aisladas son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células de placenta adherentes aisladas producen uno o más corpúsculos embrioideos cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioideos.
- 20 En otra realización, las células de placenta adherentes aisladas son CD200⁺, OCT-4⁺. En una realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En un aspecto, las células de placenta adherentes aisladas también producen uno o más corpúsculos embrioideos cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioideos.
- 25 En otra realización, las células de placenta adherentes aisladas son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En una realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre adherentes son también OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre adherentes son también CD200⁺. En una realización más específica, dichas células madre adherentes son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.
- 30 En otro aspecto de la descripción, las células de placenta adherentes aisladas son células madre CD73⁺, CD105⁺, en donde dichas células producen uno o más corpúsculos embrioideos en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioideos. En un aspecto de esta descripción, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto de esta descripción, las células de placenta adherentes aisladas son también OCT-4⁺. Aun en otro aspecto de esta descripción, dichas células de placenta adherentes aisladas son también OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.
- 35 En un aspecto de la descripción, las células madre de placenta adherentes son células madre OCT-4⁺ en donde dichas células madre de placenta adherentes producen uno o más corpúsculos embrioideos cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioideos, y en donde dichas células madre se han identificado como supresoras de manera detectable de la proliferación de células cancerosas o del crecimiento tumoral.
- 40 En diversas realizaciones, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, en al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células de placenta adherentes aisladas son OCT-4⁺. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son CD200⁺. En una realización más específica, dichas células de placenta adherentes aisladas son también CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células de placenta adherentes aisladas han aumentado, por ejemplo, se han sometido a pases al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces.
- 45 En una realización más específica de cualquiera de las realizaciones anteriores, las células de placenta adherentes aisladas expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de la placenta, véase, p. ej., Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998)).
- 50 En otra realización, las células de placenta adherentes aisladas CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD133⁻. En otra realización, las células de placenta adherentes aisladas segregan constitutivamente IL-6, IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1).
- 60

Cada una de las células de placenta adherentes aisladas mencionadas anteriormente puede comprender células obtenidas y aisladas directamente de una placenta de mamífero, o células que se han cultivado y sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más veces, o una de sus combinaciones. La diversidad de supresores de células tumorales de las células de placenta adherentes aisladas descritas anteriormente pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células de placenta adherentes aisladas.

6.6.3. Composiciones que comprenden medios acondicionados de células de placenta adherentes

También se describe en la presente memoria el uso de una composición que comprende linfocitos TSNK y además medio acondicionado, en donde dicha composición es supresora de tumores, o es eficaz en el tratamiento de cáncer o infección vírica. Las células de placenta adherentes como se describe en el apartado 6.6.2 anterior se pueden usar para producir un medio acondicionado que sea supresor de células tumorales, anticancerígeno o antivírico, es decir, un medio que comprenda una o más biomoléculas segregadas o excretadas por las células que tienen un efecto supresor de células tumorales detectables, efecto anticancerígeno o efecto antivírico. Por ejemplo, el medio acondicionado comprende un medio en donde las células han proliferado (es decir, se han cultivado) durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otros ejemplos, el medio acondicionado comprende un medio en donde dichas células han crecido hasta al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluencia o hasta 100% de confluencia. Dicho medio acondicionado puede usarse para soportar el cultivo de una población de células separadas, p. ej., células de placenta o células de otro tipo. En otro ejemplo, el medio acondicionado proporcionado en la presente memoria comprende un medio en donde se han cultivado células de placenta aisladas adherentes, p. ej., células madre de placenta adherentes aisladas o células multipotentes de placenta adherentes aisladas, y otras células distintas de las células de placenta adherentes aisladas, p. ej., células madre no placentarias o células multipotentes.

Dicho medio acondicionado se puede combinar con cualquiera de, o cualquier combinación de linfocitos TSNK, perfundido placentario, células de perfundido placentario para formar una composición que es supresora de células tumorales, anticancerígena o antivírica. En determinados ejemplos, la composición comprende menos de la mitad de medio acondicionado en volumen, por ejemplo, aproximadamente, o menos de aproximadamente, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% en volumen.

Por tanto, en la presente memoria se describe una composición que comprende linfocitos TSNK y medio de cultivo de un cultivo de células de placenta adherentes aisladas, en donde dichas células de placenta adherentes aisladas (a) se adhieren a un sustrato; y (b) son $CD34^-$, $CD10^+$ y $CD105^+$; en donde dicha composición suprime de forma detectable el crecimiento o la proliferación de las células tumorales, o es anticancerígena o antivírica. En un ejemplo, las células de placenta adherentes aisladas son $CD34^-$, $CD10^+$ y $CD105^+$ según se detecta por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células de placenta adherentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas son células madre de placenta. En otro ejemplo, las células de placenta $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas son células de placenta adherentes multipotentes. En otro ejemplo, las células de placenta $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas tienen posibilidades de diferenciarse en células de un fenotipo neural, células de un fenotipo osteógeno o células de un fenotipo condrogénico. En otro ejemplo, las células de placenta adherentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas son además $CD200^+$. En otro ejemplo, las células de placenta $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas son además $CD90^+$ o $CD45^-$, según se detecta por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células de placenta $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ aisladas son además $CD90^+$ o $CD45^-$, según se detecta por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células de placenta adherentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ son además $CD90^+$ o $CD45^-$, según se detecta por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células de placenta adherentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ son además $CD90^+$ y $CD45^-$, según se detecta por citometría de flujo. En otro ejemplo, las células de placenta adherentes $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ son además $CD80^-$ y $CD86^-$, según se detecta por citometría de flujo.

En otro aspecto de la descripción, en la presente memoria se describe una composición que comprende linfocitos TSNK y medio de cultivo de un cultivo de células de placenta adherentes aisladas, en donde dichas células de placenta adherentes aisladas (a) se adhieren a un sustrato; y (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105 y facilitan la formación de uno o más corpúsculos embrioides en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioides, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más corpúsculos embrioides en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de corpúsculos embrioides; en donde dicha composición suprime de forma detectable el crecimiento o la proliferación de las células tumorales, o es anticancerígena o antivírica. En un ejemplo, la composición además comprende una diversidad de dichas células adherentes de placenta aisladas. En otro ejemplo, la composición comprende una diversidad de células no placentarias. En otro ejemplo, dichas células no placentarias comprenden células $CD34^+$, p. ej., células progenitoras hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical o células progenitoras hematopoyéticas de sangre de placenta. Las células no placentarias también pueden comprender células madre, tales como células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea. Las células no placentarias también pueden

ser uno o más tipos de células adultas o estirpes celulares. En otro ejemplo, la composición comprende un agente antiproliferativo, p. ej., un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .

En otro aspecto de esta descripción, se obtiene medio de cultivo acondicionado por una de las células o combinaciones de células descritas anteriormente a partir de una diversidad de células de placenta adherentes aisladas cultivadas junto con una diversidad de células tumorales en una proporción de células de placenta adherentes aisladas a células tumorales de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1. Por ejemplo, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante puede obtenerse de un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^5 células de placenta adherentes aisladas, aproximadamente 1×10^6 células de placenta adherentes aisladas, aproximadamente 1×10^7 células de placenta adherentes aisladas o aproximadamente 1×10^8 células de placenta adherentes aisladas, o más. En otro aspecto de esta descripción, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se obtiene a partir de un cultivo conjunto que comprende aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células de placenta adherentes aisladas y aproximadamente 1×10^5 células tumorales; aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células de placenta adherentes aisladas y aproximadamente 1×10^6 células tumorales; aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células de placenta adherentes aisladas y aproximadamente 1×10^7 células tumorales; o aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células de placenta adherentes aisladas y aproximadamente 1×10^8 células tumorales.

6.7. Conservación de células

Las células, p. ej., linfocitos TSNK o células de perfundido placentario que comprenden células madre hematopoyéticas o células progenitoras, pueden conservarse, es decir, colocarse en condiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo o en condiciones que inhiban la muerte celular por, p. ej., apoptosis o necrosis.

El perfundido placentario se puede producir mediante el paso de una composición para recogida de células a través de al menos una parte de la placenta, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta. La composición para recogida de células comprende uno o más compuestos que actúan para proteger las células contenidas dentro del perfundido. Dicha composición para recogida de células de placenta puede comprender un inhibidor de apoptosis, un inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarbono transportador de oxígeno, como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. relacionada número 20070190042.

En un aspecto, el perfundido o una población de células de placenta se recogen de una placenta puerperal de mamífero, p. ej., humano, poniendo en contacto el perfundido o población de células con una composición para recogida de células que comprende un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono que porta oxígeno, en donde dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o evitar la apoptosis en la población de células de placenta, p. ej., células de placenta adherentes, por ejemplo, células madre de placenta o células multipotentes de placenta, en comparación con una población de células que no han estado en contacto con el inhibidor de apoptosis. Por ejemplo, la placenta se puede perfundir con la composición para recogida de células, y las células de placenta, p. ej. todas las células de placenta nucleadas, están aisladas de la misma. En otro aspecto, el inhibidor de apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otro aspecto, dicho inhibidor de apoptosis es un inhibidor de JNK. En otro aspecto, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de células de placenta adherentes, p. ej., células madre de placenta adherentes o células multipotentes de placenta adherentes. En otro aspecto, la composición para recogida de células comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases separadas. En otro aspecto, la composición para recogida de células comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otro aspecto, la composición para recogida de células además comprende un emulsionante, p. ej., lecitina. En otro aspecto, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 25°C en el momento de entrar en contacto con las células de placenta. En otro aspecto, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2°C y 10°C, o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 5°C, en el momento de entrar en contacto con las células de placenta. En otro aspecto, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células. En otro aspecto, dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células.

En otro aspecto de esta descripción, el perfundido placentario y/o las células de placenta pueden recogerse y conservarse poniendo en contacto el perfundido y/o las células con un inhibidor de apoptosis y un compuesto conservador de órganos, donde dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o evitar la apoptosis de las células, en comparación con las células de perfundido o de placenta que no entran en contacto con el inhibidor de apoptosis. En un aspecto, el compuesto conservador de órganos es la solución UW (descrita en la Patente de EE.UU. nº 4.798.824, también conocida como VIASPAN™; véase también Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990) o una solución descrita en Stern *et al.*, Patente de EE.UU. nº 5.552.267. En aspecto, dicha composición conservadora de órganos es hidroxietil-almidón, ácido lactobiónico, rafinosa o una de sus combinaciones. En otro aspecto, la composición para recogida de células de placenta además comprende un perfluorocarbono portador de oxígeno, en dos fases o en emulsión.

En otro aspecto del método, las células de placenta se ponen en contacto con una composición para recogida de células que comprende un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, un compuesto conservante de órganos, o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otro aspecto, las células de

placenta se ponen en contacto con dicha composición para recogida de células después de la recogida por perfusión.

Normalmente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de células de placenta, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y el estrés mecánico. En otro aspecto del método, por lo tanto, el perfundido placentario o una población de células de placenta está expuesto a un estado hipóxico durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en donde un estado hipóxico es una concentración de oxígeno menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. En un aspecto, dicho perfundido o población de células de placenta está expuesto a dicho estado hipóxico durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otro aspecto, dicha población de células de placenta está expuesta a dicho estado hipóxico durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no está expuesta a un estado hipóxico, durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento. En otro aspecto, dicha población de células de placenta no está expuesta a estrés por cizalladura durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Células, p. ej., células de perfundido placentario, células hematopoyéticas, p. ej., células madre hematopoyéticas CD34⁺; linfocitos NK, p. ej., linfocitos TSNK; las células de placenta adherentes aisladas descritas en la presente memoria se pueden crioconservar, p. ej., en medio de crioconservación en recipientes pequeños, p. ej., ampollas o viales con tabique. En algunos ejemplos, las células proporcionadas en la presente memoria se crioconservan a una concentración de aproximadamente 1×10^4 - 5×10^8 células por ml. En ejemplos específicos, las células proporcionadas en la presente memoria se crioconservan a una concentración de aproximadamente 1×10^6 - $1,5 \times 10^7$ células por ml. En ejemplos más específicos, las células proporcionadas en la presente memoria se crioconservan a una concentración de aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , $1,5 \times 10^7$ células por ml.

El medio de crioconservación adecuado incluye, pero no se limita a, solución salina normal, medio de cultivo incluido, p. ej., medio de crecimiento o medio de congelación de células, por ejemplo medio de congelación de células disponible en el mercado, p. ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma); CryoStor®CS2, CryoStor®CS5 o CryoStor®CS10 (BioLife Solutions). El medio de crioconservación preferiblemente comprende DMSO (sulfóxido de dimetilo), a una concentración de, p. ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa, dextrano, albúmina (p. ej., albúmina de suero humano), trehalosa y/o glicerol. El medio de crioconservación puede comprender aproximadamente 1% -10% de DMSO, aproximadamente 25%-75% de dextrano y/o aproximadamente 20-60% de albúmina de suero humano (ASH). Además, el medio de crioconservación puede comprender aproximadamente 1%-10% de DMSO, aproximadamente 25%-75% de trehalosa y/o aproximadamente 20-60% de ASH humana. Además, el medio de crioconservación puede comprender 5% de DMSO, 55% de dextrano y 40% de ASH. Además, el medio de crioconservación puede comprender 5% de DMSO, 55% de trehalosa (10% p/v en solución salina normal) y 40% de ASH. Además, el medio de crioconservación comprende 5% de DMSO, 55% de trehalosa y 40% de ASH. El medio de crioconservación puede comprender 5% de DMSO, 55% de trehalosa (10% p/v en solución salina normal) y 40% de ASH. También, el medio de crioconservación puede comprender CryoStor® CS5 o CryoStor®CS10.

Las células descritas en la presente memoria se pueden crioconservar mediante cualquiera de una variedad de métodos, y en cualquier etapa de cultivo, crecimiento o diferenciación celular. Por ejemplo, las células se pueden crioconservar justo después del aislamiento de los tejidos u órganos de origen, p. ej., perfundido placentario o sangre de cordón umbilical, o durante, o después de la primera o la segunda etapa de los métodos descritos anteriormente. En algunos casos, las células hematopoyéticas, p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas, se crioconservan en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos o aproximadamente en 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 o 24 horas después del aislamiento de los tejidos u órganos de origen. En algunos casos, dichas células se crioconservan dentro de 1, 2 o 3 días después del aislamiento de los tejidos u órganos de origen. En algunos casos, dichas células se crioconservan después de cultivarse en un primer medio como se describe en el apartado 6.2.1, anterior, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días. En algunos casos, dichas células se crioconservan después de cultivarse en un primer medio como se describe en el apartado 6.2.1, anterior, durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28, y en un segundo medio durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días como se describe en el apartado 6.2.1, anteriormente.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para crioconservar una población de linfocitos NK, p. ej., linfocitos TSNK. Por ejemplo, dicho método comprende: (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15) y, opcionalmente, uno o más de entre el factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dichos IL-15 y SCF e IL-7 opcionales no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y una diversidad de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células hematopoyéticas las células madre o progenitoras se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados, y (c) crioconservar los linfocitos NK de la etapa (b) en un medio de crioconservación. En un ejemplo, dicha etapa (c) además comprende (1) preparar una solución de suspensión celular; (2) añadir medio de crioconservación a la solución de suspensión celular de la etapa (1) para obtener la suspensión celular crioconservada; (3) enfriar la suspensión de células crioconservada de la etapa (3) para obtener

una muestra criopreservada; y (4) almacenar la muestra criopreservada por debajo de -80°C. En algunos ejemplos, el método no incluye etapas intermedias entre las etapas (a) y (b), y entre las etapas (b) y (c), y/o sin etapas de cultivo adicionales antes de la etapa (a).

En otro ejemplo, dicho método de criopreservación de una población de linfocitos NK, p. ej., linfocitos TSNK comprende: (a) aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de los factores del factor de células madre (SCF), IL-2, interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15) y heparina, y en donde dicho SCF, IL-2, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde una diversidad de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir linfocitos NK activados; y (c) criopreservar los linfocitos NK de la etapa (b) en un medio de criopreservación. En un ejemplo, dicha etapa (c) además comprende (1) preparar una solución de suspensión celular; (2) añadir medio de criopreservación a la solución de suspensión celular de la etapa (1) para obtener la suspensión celular criopreservada; (3) enfriar la suspensión celular criopreservada de la etapa (3) para obtener una muestra criopreservada; y (4) almacenar la muestra criopreservada por debajo de -80°C. En algunos ejemplos, el método no incluye etapas intermedias entre la etapa (a) y (b), y entre la etapa (b) y (c).

Las células descritas en la presente memoria se enfrían preferiblemente en un congelador de velocidad controlada, p. ej., a aproximadamente 0,1, 0,3, 0,5 o 1°C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferiblemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células criopreservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de la descongelación para su uso. Por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas preferiblemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37°C. En algunos ejemplos, las células criopreservadas se descongelan después de estar criopreservadas durante aproximadamente 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 o 24 horas, o durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días. En algunos ejemplos, las células criopreservadas se descongelan después de estar criopreservadas durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 meses. En algún ejemplo, las células criopreservadas se descongelan después de estar criopreservadas durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

El medio de descongelación adecuado incluye, pero no se limita a, solución salina normal, medio de cultivo plasmático incluidos, por ejemplo, medio de crecimiento, p. ej., medio RPMI. Preferiblemente, el medio de descongelación comprende uno o más complementos del medio (p. ej., nutrientes, citocinas y/o factores). Los complementos del medio adecuados para descongelar las células descritas en la presente memoria incluyen, por ejemplo, sin limitación, suero tal como suero AB humano, suero bovino fetal (FBS) o suero de ternera fetal (FCS), vitaminas, albúmina sérica humana (ASH), albúmina sérica bovina (ASB), aminoácidos (p. ej., L-glutamina), ácidos grasos (p. ej., ácido oleico, ácido linoleico o ácido palmítico), insulina (p. ej., insulina humana biotecnológica), transferrina (transferrina humana saturada con hierro), β-mercaptoetanol, factor de células madre (SCF), ligando de tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), citocinas como interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15), trombopoyetina (Tpo) o heparina. En un ejemplo, el medio de descongelación útil en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende RPMI. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende plasmalyte. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende aproximadamente 0,5-20% de FBS. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15 o 20% de FBS. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende aproximadamente 0,5% -20% de ASH. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende aproximadamente 1, 2,5, 5, 10, 15 o 20% de ASH. En un ejemplo, dicho medio de descongelación comprende RPMI y aproximadamente 10% de FBS. En otro ejemplo, dicho medio de descongelación comprende plasmalyte y aproximadamente 5% de ASH.

Los métodos de criopreservación descritos en la presente memoria pueden optimizarse para permitir el almacenamiento a largo plazo, o en condiciones que inhiben la muerte celular por, p. ej., apoptosis o necrosis. En un ejemplo, las células después de la descongelación comprenden más de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de células viables, determinadas mediante, p. ej., el contador celular automático o el método del azul de tripano. En otro ejemplo, las células después de la descongelación comprenden aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 o 25% de células muertas. En otro ejemplo, las células después de la descongelación comprenden aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 o 25% de células apoptóticas precoces. En otra realización, aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15 o 20% de células después de la descongelación experimentan apoptosis después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días después de descongelarse, p. ej., según se determina por un ensayo de apoptosis (p. ej., equipo de ensayo de apoptosis TO-PRO3 o AnnV/PI). En algunos ejemplos, las células después de la descongelación se vuelven a criopreservar después de ser cultivadas, aumentarlas o diferenciarlas usando métodos descritos en la presente memoria.

6.8. Usos de linfocitos TSNK

Los linfocitos TSNK descritos en la presente memoria pueden utilizarse en métodos para tratar individuos que tienen cáncer, p. ej., individuos que tienen células tumorales sólidas y/o células de cáncer sanguíneo, o personas que

tienen una infección vírica. Los linfocitos TSNK descritos en la presente memoria también pueden usarse en métodos para suprimir la proliferación de células tumorales.

6.8.1. Tratamiento de individuos que tienen cáncer

5 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo o un tumor sólido, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos TSNK. En algunos casos, el individuo tiene una carencia de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., una carencia de linfocitos NK activos contra el cáncer del individuo. En otro ejemplo, el método además comprende administrar a dicho perfundido placentario individual aislado o a las células de perfundido placentario aisladas, p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz de perfundido placentario o células de perfundido placentario aisladas. En otro caso, el método comprende administrar además a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1, anterior, o talidomida. Como se emplea en la presente memoria, una "cantidad eficaz" es una cantidad que, p. ej., da como resultado una mejora detectable de, disminución del avance o eliminación de uno o más síntomas de un cáncer del que sufre el individuo.

15 En un ejemplo, el cáncer es un cáncer sanguíneo, p. ej., una leucemia o un linfoma. En otro ejemplo, el cáncer es una leucemia aguda, p. ej., leucemia aguda de linfocitos T, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursores B, leucemia linfoblástica aguda de precursores T, Leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt) o leucemia bifenotípica aguda; una leucemia crónica, p. ej., linfoma mielóide crónico, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia monocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (LLC)/linfoma linfocítico pequeño o leucemia prolinfocítica de linfocitos B; linfoma de tricoleucocitos; leucemia prolinfocítica de linfocitos T; o un linfoma, p. ej., linfoma histiocítico, linfoma linfoplasmacítico (p. ej., macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, neoplasia de células plasmáticas (p. ej., mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, una enfermedad de deposición de inmunoglobulina monoclonal o una enfermedad de las cadenas pesadas), linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células de la corteza cerebral, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primaria, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia agresiva de linfocitos NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma extraganglionar de linfocitos NK/T, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma de linfocitos NK blástico, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno cutáneo linfoproliferativo de linfocitos T positivo a CD30 cutáneo primario (p. ej., linfoma anaplásico cutáneo primario macrolcelular o papulosis linfomatoidea), linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma macrolcelular anaplásico no especificado, linfoma de Hodgkin o linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos ganglionares. En otro ejemplo, el cáncer es mieloma múltiple o síndrome mielodisplásico.

40 En algunos otros ejemplos, el cáncer es un tumor sólido, p. ej., un carcinoma, tal como un adenocarcinoma, un carcinoma corticosuprarrenal, un adenocarcinoma de colon, un adenocarcinoma colorrectal, un carcinoma colorrectal, un carcinoma de células canaliculares, un carcinoma pulmonar, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma (p. ej., un melanoma maligno), un carcinoma de piel amelanótico o un carcinoma no especificado; un tumor desmoide; un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; un tumor endocrino; un sarcoma de Ewing; un tumor de células germinativas (p. ej., cáncer testicular, cáncer de ovario, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, germinoma, etc.); un hepatoblastoma; un carcinoma hepatocelular; un neuroblastoma; un sarcoma de tejido blando no rhabdomyosarcomático; un osteosarcoma; un retinoblastoma; un rhabdomyosarcoma; o un tumor de Wilms. En otra realización, el tumor sólido es un neuroma acústico; un astrocitoma (p. ej., un astrocitoma pilocítico de grado I, un astrocitoma de bajo grado, grado II, un astrocitoma anaplásico de grado III o un glioblastoma multiforme de grado IV); un cordoma; un craneofaringioma; un glioma (p. ej., un glioma de tronco encefálico; un ependimoma; un glioma mixto, un glioma del nervio óptico o un subependimoma); un glioblastoma; un meduloblastoma; un meningioma; un tumor cerebral metastásico; un oligodendroglioma; un pineoblastoma; un tumor pituitario; un tumor neuroectodérmico primitivo; o un neurilemoma. En otro ejemplo, el cáncer es cáncer de próstata.

55 En algunos casos, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo o un tumor sólido, p. ej., un individuo que tiene una carencia de linfocitos citolíticos naturales, es un individuo que ha recibido un trasplante de médula ósea antes de dicha administración. En algunos casos, el trasplante de médula ósea fue en tratamiento de dicho cáncer. En algunos otros casos, el trasplante de médula ósea fue en el tratamiento de una afección distinta de dicho cáncer. En algunos casos, el individuo recibió un inmunosupresor además de dicho trasplante de médula ósea. En algunos casos, el individuo que se ha sometido a un trasplante de médula ósea presenta uno o más síntomas de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en el momento de dicha administración. En algunos otros casos, al individuo que se ha sometido a un trasplante de médula ósea se le administran dichas células antes de que se haya manifestado un síntoma de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

60 En determinados casos específicos, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo, ha recibido al menos una dosis de un inhibidor de TNF α , p. ej., ETANERCEPT® (Enbrel), antes de dicha administración. En un caso específico, dicho individuo recibió dicha dosis de un inhibidor de TNF α a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12

meses de diagnóstico de dicho cáncer. En un caso específico, el individuo que ha recibido una dosis de un inhibidor de TNF α presenta leucemia mieloide aguda. En otro caso, el individuo que ha recibido una dosis de un inhibidor de TNF α y presenta leucemia mieloide aguda muestra además supresión del brazo largo del cromosoma 5 en células sanguíneas. En otro caso, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo, presenta un cromosoma Filadelfia.

En algunos casos, el cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo o un tumor sólido, en dicho individuo es resistente a uno o más fármacos contra el cáncer. En otro caso, el cáncer es resistente a GLEEVEC® (mesilato de imatinib).

En algunos casos, el cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo, en dicho individuo responde a al menos un fármaco anticanceroso; en esta realización, perfundido placentario, células de perfundido placentario aisladas, linfocitos citolíticos naturales aislados, p. ej., linfocitos citolíticos naturales de placenta, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados aislados, y/o una de sus combinaciones, y opcionalmente un compuesto inmunomodulador, se agregan como tratamientos adjuntos o como una politerapia con dicho medicamento contra el cáncer. En algunos otros casos, el individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer sanguíneo, ha sido tratado con al menos un fármaco anticanceroso, y ha recaído, antes de dicha administración.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un individuo que tiene mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo (1) lenalidomida; (2) melfalán; y (3) linfocitos NK aumentados, en donde dichos linfocitos NK son eficaces para tratar mieloma múltiple en dicho individuo. En un aspecto, dichos linfocitos NK son linfocitos NK de sangre del cordón umbilical o linfocitos NK producidos a partir de células hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical, p. ej., células madre hematopoyéticas. En otro aspecto, dichos linfocitos NK se han producido por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para producir linfocitos NK, p. ej., para producir linfocitos TSNK. En otro aspecto, dichos linfocitos NK han aumentado antes de dicha administración. En otro aspecto, dichas lenalidomida, melfalán y/o linfocitos NK se administran por separado. En algunos aspectos del método de tratamiento de un individuo con mieloma múltiple, dichos linfocitos NK se producen por un método que comprende: aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de entre el factor de células madre (SCF), IL-2, interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15) y heparina, y en donde dichos SCF, IL-2, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde una diversidad de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2).

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un individuo que tiene leucemia linfocítica crónica (LLC), que comprende administrar al individuo una dosis terapéuticamente eficaz de (1) lenalidomida; (2) melfalán; (3) fludarabina; y (4) linfocitos NK aumentados, p. ej., linfocitos TSNK, en donde dichos linfocitos NK son eficaces para tratar dicha LLC en dicho individuo. En un ejemplo, dichos linfocitos NK son linfocitos NK de la sangre del cordón umbilical o linfocitos NK producidos a partir de células madre hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical. En otro ejemplo, dichos linfocitos NK se han producido por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para producir linfocitos NK, p. ej., para producir linfocitos TSNK. En otro ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, dichos linfocitos NK han aumentado durante al menos 10 días antes de dicha administración. En un ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, dichos lenalidomida, melfalán, fludarabina y linfocitos NK aumentados se administran a dicho individuo por separado. En algunos ejemplos del método para tratar a un individuo con LLC, dichos linfocitos NK se producen mediante un método que comprende: aumentar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende uno o más de las sustancias siguientes: factor de células madre (SCF), IL -2, interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 (IL-15) y heparina, y en donde dichos SCF, IL-2, IL-7 e IL-15 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, y en donde una diversidad de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir linfocitos NK activados.

6.8.2. Supresión de la proliferación de células tumorales

Además, se describe en la presente memoria un método para suprimir la proliferación de células tumorales, que comprende poner en contacto las células tumorales con linfocitos TSNK. Opcionalmente, las células tumorales y/o los linfocitos TSNK se ponen en contacto con perfundido placentario aislado o células de perfundido placentario aisladas. En otro ejemplo, las células tumorales y/o los linfocitos TSNK se ponen en contacto además con un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1 anterior, o talidomida, de manera que la proliferación de las células tumorales se reduce de forma detectable en comparación con células tumorales del mismo tipo que no han estado en contacto con linfocitos TSNK. Opcionalmente, las células tumorales y/o los linfocitos TSNK en contacto con un compuesto inmunomodulador se ponen en contacto con perfundido placentario aislado o células de perfundido placentario aisladas.

Como se emplea en la presente memoria, "puesta en contacto", con respecto a las células, en un aspecto abarca contacto físico directo, p. ej., célula-célula, entre perfundido placentario, células de perfundido placentario, linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos TSNK, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados aislados y las células tumorales. En otro aspecto, "puesta en contacto" abarca la presencia en el mismo espacio físico, p. ej., perfundido

placentario, células de perfundido placentario, linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios de placenta, y/o linfocitos citolíticos naturales combinados aislados se colocan en el mismo recipiente p. ej., placa de cultivo, placa de múltiples pocillos) como células tumorales. En otro aspecto, la "puesta en contacto" de perfundido placentario, células de perfundido placentario, linfocitos citolíticos naturales combinadas o linfocitos citolíticos naturales intermedios placentarios, y células tumorales se lleva a cabo, p. ej., inyectando o infundiendo el perfundido placentario o células, p. ej., células de perfundido placentario, linfocitos citolíticos naturales combinados o linfocitos citolíticos naturales, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios placentarios en un individuo, p. ej., un ser humano con células tumorales, p. ej., un paciente con cáncer. "Puesta en contacto", en el contexto de compuestos inmunomoduladores y/o talidomida, significa, p. ej., que las células y el compuesto inmunomodulador y/o la talidomida se ponen en contacto físico directamente entre sí, o se colocan dentro del mismo volumen físico (p. ej. un recipiente de cultivo celular o un individuo).

En un ejemplo, las células tumorales son células de cáncer sanguíneo, p. ej., células de leucemia o células de linfoma. En ejemplos más específicos, el cáncer es una leucemia aguda, p. ej., células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda (LMA), células de leucemia promielocítica aguda, células de leucemia mieloblástica aguda, células de leucemia megacarioblástica aguda, células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B, células de leucemia linfoblástica aguda de precursores T, células de leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt) o células de leucemia bifenotípica aguda; células de leucemia crónica, p. ej., células de linfoma mieloide crónico, células de leucemia mielógena crónica (LMC), células de leucemia monocítica crónica, células de leucemia linfocítica crónica (LLC)/linfoma linfocítico de células pequeñas o células de leucemia prolinfocítica de linfocitos B; células de linfoma de tricoleucocitos; células de leucemia prolinfocítica de linfocitos T; o células de linfoma, p. ej., células de linfoma histiocítico, células de linfoma linfoplasmacítico (p. ej., células de macroglobulinemia Waldenström), células de linfoma de zona marginal esplénica, células de neoplasma de células plasmáticas (p. ej., células de mieloma de células plasmáticas, células de plasmacitoma, enfermedad de deposición de inmunoglobulina monoclonal o enfermedad de las cadenas pesadas), células de linfoma de linfocitos B de zona marginal extraganglionar (linfoma MALT), células de linfocitos B de zona marginal ganglionar (NMZL), células de linfoma folicular, células de linfoma de células de la corteza cerebral, células de linfoma B grandes difusas, células de linfoma de linfocitos B grandes mediastínicas (tímicas), células de linfoma de linfocitos B grandes intravasculares, células de linfoma de efusión primaria, células grandes de leucemia linfocítica granular de linfocitos T, células leucémicas de linfocitos NK agresivas, células de linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto, células del tipo linfoma nasal de linfocitos NK/T extraganglionar, células de linfoma de linfocitos T de tipo enteropático, células de linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, células de linfoma de linfocitos NK blástico, micosis fungoide (síndrome de Sezary), células de trastorno linfoproliferativo de linfocitos T positivos a CD30 cutáneo primario (p. ej., linfoma primario de células grandes anaplásico cutáneo o papulosis linfomatoidea), células de linfoma de linfocitos T angioinmunoblásticos, células no especificadas de linfoma de linfocitos T periféricos, células de linfoma de células grandes anaplásicas, células del linfoma de Hodgkin o células de linfoma de Hodgkin predominantes en linfocitos nodulares. En otro ejemplo, las células tumorales son células de mieloma múltiple o células de síndrome mielodisplásico.

En ejemplos específicos, las células tumorales son células de tumor sólido, p. ej., células de carcinoma, por ejemplo, células de adenocarcinoma, células de carcinoma corticosuprarrenal, células de adenocarcinoma de colon, células de adenocarcinoma colorrectal, células de carcinoma colorrectal, células de carcinoma de células canaliculares, células de carcinoma pulmonar, células de carcinoma de tiroides, células de carcinoma nasofaríngeo, células de melanoma (p. ej., células de melanoma maligno), células de carcinoma de piel no melanómico, o células de carcinoma no especificado; células de tumor desmoide; células de tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; células de tumor endocrino; células de sarcoma de Ewing; células de tumor de células germinativas (p. ej., células de cáncer testicular, células de cáncer de ovario, células de coriocarcinoma, células de tumor de seno endodérmico, células de germinoma, etc.); células de hepatoblastoma; células de carcinoma hepatocelular; células de neuroblastoma; células de sarcoma de tejido blando distinto de rhabdomyosarcoma; células de osteosarcoma; células de retinoblastoma; células de rhabdomyosarcoma; o células de tumor de Wilms. En otro ejemplo, las células tumorales son células de cáncer de páncreas o células de cáncer de mama. En otros ejemplos, las células de tumor sólido son células de neuroma acústico; células de astrocitoma (p. ej., células de astrocitoma pilocítico de grado I, células de astrocitoma de grado bajo de grado II, células de astrocitoma anaplásico de grado III o células de glioblastoma multiforme de grado IV); células de cordoma; células de craneofaringioma; células de glioma (p. ej., células de glioma de tronco encefálico, células de ependimoma, células de glioma mixto, células de glioma de nervio óptico o células de subependimoma); células de glioblastoma; células de meduloblastoma; células de meningioma; células de tumor cerebral metastásico; células de oligodendroglioma; células de pineoblastoma; células de tumor de la pituitaria; células de tumor neuroectodérmico primitivo; o células de neurilemoma. En otro ejemplo, las células tumorales son células de cáncer de próstata.

Como se emplea en la presente memoria, "terapéuticamente beneficioso" y "beneficiosos terapéuticos" incluyen, pero no se limitan a, p. ej., reducción del tamaño de un tumor; disminución o cese del crecimiento de un tumor; reducción del número de células cancerosas en una muestra de tejido, p. ej., una muestra de sangre, por unidad de volumen; la mejoría clínica en cualquier síntoma del cáncer concreto o el tumor que tiene dicho individuo, la disminución o el cese del empeoramiento de cualquier síntoma del cáncer concreto que tiene el individuo, etc.

6.8.3. Tratamiento de cánceres utilizando linfocitos TSNK y otros agentes anticancerosos

El tratamiento de un individuo que tiene cáncer usando los linfocitos TSNK descritos en la presente memoria puede ser parte de un régimen terapéutico contra el cáncer que incluye uno u otros agentes anticancerosos más. Dichos agentes anticancerosos son bien conocidos en la técnica. Agentes anticancerígenos específicos que se pueden administrar a un individuo que tiene cáncer, p. ej., un individuo con células tumorales, además de linfocitos TSNK, y

5 opcionalmente perfundido, células de perfundido, linfocitos citolíticos naturales distintos de linfocitos TSNK, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina; hidrocloreto de acodazol; acronina; adozelesina; adrucil; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramiyicina; asparaginas; asperlina; avastin (bevacizumab); azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; hidrocloreto de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesin; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán;

10 cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer, carboplatino; carmustina; hidrocloreto de carubicina; carzelesin; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidrocloreto de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; hidrocloreto de doxorubicina;

15 eflorixifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrocloreto de eflorixifeno; elsamitruccina; enloplatin; enpromate; epipropidina; hidrocloreto de epirubicina; erbulozol; hidrocloreto de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato sódico; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; hidrocloreto de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; hidrocloreto de gemcitabina; hidroxiurea; hidrocloreto de idarrubicina; ifosfamida; ilmofofina; iroplatin; irinotecan; hidrocloreto de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; hidrocloreto de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; hidrocloreto de laoxantrona; masoprocol; maitansina; hidrocloreto de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; hidrocloreto de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; hidrocloreto de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustine; hidrocloreto de procarbazona; puomicina; hidrocloreto de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; hidrocloreto de safingol; semustine; simtrazeno; sparfosato de sodio; esparsomicina; hidrocloreto de Spirogermanium; espiromustina; espiroplatin; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur, talisomicina; tecogalan sódico; taxotere; tegafur, hidrocloreto de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprine;

20 tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexate; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; tubulozol hidrocloreto; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vidpidina; sulfato de vinilo; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozole; zeniplatin; zinostatina e hidrocloreto de zorubicina.

35 Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adeciapenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogenia; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante-1; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos complementarios; afidicolina glicinato; moduladores del gen de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácidoapurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasctron; azatoxina; azatirosina; derivados de baccatin III; balanol; batismat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzolestaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF, bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilsperrina; bisnafida; bistratene A; bizelesina; breflate; bropirimina; budotitane; Butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; camptosar (también llamado Campto; irinotecán) derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropin B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colisicina B; combretastatin A4; análogo de combretastatina;

45 conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacin A; ciclopentantiraquinonas; cicloplatin; cypemicina; citafosina ocfosfato; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodifenmina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxilfulidina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur, epirubicina; epristeride; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreto de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecin; fomemustina; gadolinio texafrina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; Heregulin; hexametileno-bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imatinib (por ejemplo, GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguane; yododoxorrubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladine; isobengazol; isohomohalicondrin B; itasetron; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamellarin-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+ estrógeno+ progesterona; leuprorelina; levamisol;

60

65

liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguzona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux (cetuximab), gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+ pared celular de *Mycobacterium* sk; mopidamol; agente anticanceroso de mostaza; mycaperóxido B; extracto de pared celular de micobacterias; myriaporona; N-acetil-dinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENA SENSE®); O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osatcra; oxaliplatino (p. ej., Floxatin); oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidróico; panaxtril; panomifeno; parabactina; pazelliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilíico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; hidrocloreto de pilocarpina; pirarrubina; piritrexim; placetin A; placetin B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero de sodio; porfíromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario a base de proteína A, inhibidor de proteína cinasa C; inhibidores de proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina polioxi-etileno piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la proteína ras farnesil transferasa; inhibidores ras; inhibidor de ras-GAP; retelliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 proveniente del envejecimiento; oligonucleótidos transcritos; inhibidores de transducción de señal; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; escualamina; estipiamida; inhibidores de estromelisin; sulfinosina; antagonista superactivo del péptido intestinal vasoactivo; suradista; suramina; swainsonina; tallimustina; metyoduro de tamiodifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; tellurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante de la tiroides; etil-estaño etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de traducción; tretinoína; triacetiluridina; tricribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento del seno urogenital; antagonistas del receptor de la urocina; vapreotida; variolina B; Vectibix (panitumumab) velaresol; veramina; verdins; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; Welcovorin (leucovorin); Xeloda (capecitabina); zanoterona; zeniplatino; zilascorb y zinostatina stimalamer.

6.8.4. Tratamiento de la infección vírica

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un individuo que tiene una infección vírica, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos TSNK. En algunos casos, el individuo tiene una carencia de linfocitos citolíticos naturales, p. ej., una carencia de linfocitos NK activos contra la infección vírica del individuo. En algunos otros casos, dicha administración además comprende administrar al individuo uno o más perfundidos placentarios aislados, células de perfundido placentario aisladas, linfocitos citolíticos naturales aislados, p. ej., linfocitos citolíticos naturales de placenta, p. ej., linfocitos citolíticos naturales intermedios procedentes de la placenta, linfocitos citolíticos naturales combinados y aislados, y/o una de sus combinaciones. En algunos casos, los linfocitos TSNK se ponen en contacto con un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en 6.2.1, anteriormente, o talidomida, antes de dicha administración. En algunos otros casos, dicha administración comprende administrar un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador descrito en el apartado 6.2.1, anteriormente, o talidomida, a dicho individuo además de dichos linfocitos TSNK, en donde dicha cantidad es una cantidad que, p. ej., da como resultado una mejora detectable de, disminución del avance de uno o más síntomas de dicha infección vírica o la eliminación de los mismos. En casos específicos, la infección vírica es una infección por un virus de las familias Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papillomaviridae, Rhabdoviridae o Togaviridae. En otros casos, dicho virus es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus Coxsackie, virus de la hepatitis A (VHA), virus de la poliomyelitis, virus de Epstein-Barr (VEB), del herpes simple tipo 1 (VHS1), del herpes simple tipo 2 (VHS2), citomegalovirus humano (CMV), virus del herpes humano tipo 8 (VHH8), virus del herpes zoster (virus de varicela zóster (VVZ) o herpes zóster), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (HEV), virus de la gripe (p. ej., virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C o thogotovirus), virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus paragripal, virus del papiloma, virus de la rabia o virus de la rubéola.

En otros casos, dicho virus es una adenovirus especie A, serotipo 12, 18 o 31; adenovirus especie B, serotipo 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 o 50; adenovirus especie C, serotipo 1, 2, 5 o 6; especie D, serotipo 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 51; especie E, serotipo 4; o especie F, serotipo 40 o 41.

En algunos otros casos, el virus es virus Apoi (APOIV), virus Aroa (AROAV), virus bagaza (BAGV), virus Banzi (BANV), virus Bouboui (BOUV), virus Cacipacore (CPCV), virus de la isla Carey (CIV), virus Cowbone Ridge (CRV), virus del Dengue (DENV), virus Edge Hill (EHV), virus Gadgets Gully (GGYV), virus Ilheus (ILHV), virus de la meningoencefalomielitis del pavo de Israel (ITV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus Jugra (JUGV), virus Jutiapa (JUTV), virus kadam (KADV), virus Kedougou (KEDV), virus Kokobera (KOKV), virus Koutango (KOUV), virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur (KFDV), virus Langat (LGTV), Virus Meaban (MEAV), virus Modoc (MODV), virus de la leucoencefalitis del myotis de Montana (MMLV), virus de la encefalitis del valle del Murray (MVEV), virus Ntaya (NTAV), virus de la fiebre hemorrágica Omsk (OHFV), virus Powassan (POWV), Virus del Río Bravo (RBV), virus Royal Farm (RFV), virus Saboya (SABV), virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), virus Sal Vieja (SVV), virus San Perlita (SPV), virus Saumarez Reef (SREV), virus Sepik (SEPV), virus Tembusu (TMUV), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), virus Tyuleniy (TYUV), virus S de Uganda (UGSV), virus Usutu (USUV), virus Wesselsbron (WESSV), virus del Nilo occidental (WNV), virus Yaounde (YAOV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus Yokose (YOKV) o virus Zika (ZIKV).

En otros casos, los linfocitos TSNK, y opcionalmente el perfundido placentario y/o las células de perfundido, se administran a un individuo que tiene una infección vírica como parte de un régimen de tratamiento antivírico que incluye uno o más agentes antivíricos diferentes. Los agentes antivíricos específicos que se pueden administrar a un individuo que tiene una infección vírica incluyen, pero no se limitan a: imiquimod, podofilox, podofilina, interferón alfa (IFN α), reticolos, nonoxinol-9, aciclovir, fanciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir, amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir y oseltaumavir; inhibidores de proteasa tales como indinavir, nelfinavir, ritonavir o saquinavir; inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa tales como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina o zidovudina; e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos tales como nevirapina o efavirenz.

6.8.5. Administración

La determinación del número de células, p. ej., células de perfundido placentario, p. ej., células nucleadas de perfundido placentario, linfocitos citolíticos naturales combinados y/o linfocitos citolíticos naturales aislados, p. ej., linfocitos TSNK, y la determinación de la cantidad de un compuesto inmunomodulador, p. ej., un compuesto inmunomodulador en el apartado 6.2.1, anterior, o talidomida, se pueden realizar independientemente una de la otra.

6.8.5.1. Administración de células

En algunos aspectos, se usan linfocitos TSNK, p. ej., se administran a un individuo, en cualquier cantidad o número que dé como resultado un beneficio terapéutico detectable para el individuo, p. ej., una cantidad eficaz, en donde el individuo tiene una infección vírica, cáncer o células tumorales, por ejemplo, un individuo que tiene células tumorales, un tumor sólido o un cáncer sanguíneo, p. ej., un paciente con cáncer. Dichas células pueden administrarse a dicho individuo mediante números absolutos de células, p. ej., se puede administrar a dicho individuo a aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} o 1×10^{11} linfocitos TSNK.

En otros aspectos, se pueden administrar linfocitos TSNK a dicho individuo mediante números relativos de células, p. ej., se puede administrar a dicho individuo a aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} o 1×10^{11} linfocitos TSNK por kilogramo del individuo. Los linfocitos TSNK se pueden administrar a dicho individuo según una relación aproximada entre un número de linfocitos TSNK, y opcionalmente células de perfundido placentario y/o linfocitos citolíticos naturales distintos de los linfocitos TSNK, y un número de células tumorales en dicho individuo p. ej., un número estimado). Por ejemplo, los linfocitos TSNK pueden administrarse a dicho individuo en una proporción de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 o 100:1 con respecto al número de células tumorales en el individuo. El número de células tumorales en dicho individuo puede estimarse, p. ej., contando el número de células tumorales en una muestra de tejido del individuo, p. ej., muestra de sangre, biopsia o similar. En aspectos específicos, p. ej., para tumores sólidos, dicho recuento se realiza en combinación con la formación de imágenes del tumor o tumores para obtener un volumen tumoral aproximado. En un aspecto específico, se administran al individuo un compuesto inmunomodulador o talidomida, p. ej., una cantidad eficaz de un compuesto inmunomodulador o talidomida, además de los linfocitos TSNK, opcionalmente células de perfundido placentario y/o linfocitos citolíticos naturales distintos de los linfocitos TSNK.

En algunos aspectos de la descripción, el método para suprimir la proliferación de células tumorales, p. ej., en un individuo; el tratamiento de un individuo que tiene una carencia de linfocitos citolíticos naturales; o el tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o el tratamiento de un individuo que tiene cáncer, p. ej., un individuo que tiene células tumorales, un cáncer sanguíneo o un tumor sólido, comprende poner en contacto las células tumorales o administrar a dicho individuo una combinación de linfocitos TSNK y uno o más perfundidos de placenta y/o células de perfundido de la placenta. En otros aspectos de la descripción, el método además comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, un compuesto inmunomodulador o talidomida.

En un aspecto de la descripción, por ejemplo, el tratamiento de un individuo que tiene una insuficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo (p. ej., una insuficiencia en el número de linfocitos NK o en la reactividad de linfocitos NK a un cáncer, tumor o células infectadas por virus); o el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer o una infección vírica, o la supresión de la proliferación de células tumorales, comprende poner en contacto

dichas células tumorales, o administrar a dicho individuo, linfocitos TSNK enriquecidos con células de perfundido placentario aisladas o perfundido placentario. En algunos ejemplos, aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más linfocitos TSNK por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más linfocitos TSNK, se enriquecen con alrededor de, o al menos aproximadamente, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células aisladas de perfundido placentario por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células de perfundido placentario aisladas. En otros ejemplos, aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o más linfocitos TSNK por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más linfocitos TSNK se enriquecen con aproximadamente, o al menos aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 ml de perfundido, o aproximadamente 1 unidad de perfundido.

En otro aspecto de la descripción, el tratamiento de un individuo que tiene una insuficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; el tratamiento de un individuo que tiene cáncer, el tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o la supresión de la proliferación de células tumorales, comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, linfocitos TSNK, en donde dichas células se enriquecen con células de placenta adherentes, p. ej., células madre de placenta adherentes o células multipotentes, p. ej., células de placenta adherentes al plástico de cultivo de tejido CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺. En algunos ejemplos, los linfocitos TSNK se enriquecen con aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 o más células madre de placenta adherentes por mililitro, o 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células de placenta adherentes, p. ej., células madre de placenta adherentes o células multipotentes.

En otro aspecto de la descripción, el tratamiento de un individuo que tiene una insuficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; el tratamiento de un individuo que tiene cáncer; el tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica o la supresión de la proliferación de células tumorales, se lleva a cabo utilizando un compuesto inmunomodulador o talidomida en combinación con linfocitos TSNK, en donde dichas células se enriquecen con medio acondicionado, p. ej., medio acondicionado por células de placenta adherentes al plástico de cultivo de tejido CD34⁺, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, p. ej., 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,1, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml de medio de cultivo acondicionado con células madre por unidad de perfundido, o por 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} linfocitos TSNK. En algunos aspectos, las células de placenta adherentes al plástico de cultivo histórico son células de placenta adherentes multipotentes descritas en la patente de EE.UU. n° 7.468.276 y la publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2007/0275362. En otro aspecto de la descripción, el método además comprende poner en contacto las células tumorales, o administrar al individuo, un compuesto inmunomodulador o talidomida.

En otro aspecto de la descripción, el tratamiento de un individuo que tiene una insuficiencia en los linfocitos citolíticos naturales del individuo; el tratamiento de un individuo que tiene cáncer, el tratamiento de un individuo que tiene una infección vírica; o la supresión de la proliferación de células tumorales, en donde dichos linfocitos TSNK se enriquecen con células de perfundido placentario, las células de perfundido se ponen en contacto con interleucina-2 (IL-2) durante un período de tiempo antes de dicha puesta en contacto. En algunos ejemplos, dicho período de tiempo es aproximadamente, al menos, o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48 horas antes de dicho contacto.

Los linfocitos TSNK, y opcionalmente el perfundido o las células de perfundido, se pueden administrar una vez a un individuo que tiene una infección vírica, un individuo que tiene cáncer o un individuo que tiene células tumorales, durante el trascurso del tratamiento contra el cáncer; o puede administrarse varias veces, p. ej., una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas, o una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36 o más semanas durante el tratamiento. En ejemplos en los que se usan células y un compuesto inmunomodulador o talidomida, el compuesto inmunomodulador o talidomida, y las células o el perfundido, pueden administrarse al individuo juntos, p. ej., en la misma formulación; por separado, p. ej., en formulaciones separadas, aproximadamente al mismo tiempo; o pueden administrarse por separado, p. ej., en diferentes programas de administración o en diferentes momentos del día. Asimismo, en ejemplos en los que se usan células y un compuesto antivírico o compuesto anticancerígeno, el compuesto antivírico o compuesto anticancerígeno, y las células o el perfundido, se pueden administrar al individuo juntos, p. ej., en la misma formulación; por separado, p. ej., en formulaciones separadas, aproximadamente al mismo tiempo; o puede administrarse por separado, p. ej., en diferentes programas de administración o en diferentes momentos del día. Los linfocitos TSNK, y el perfundido o las células de perfundido, pueden administrarse independientemente de si los linfocitos TSNK, el perfundido o las células de perfundido se han administrado al individuo en el pasado.

7. Ejemplos

7.1. Ejemplo 1: Recuperación de células madre hematopoyéticas del perfundido placentario humano y de la sangre del cordón umbilical

El perfundido placentario humano (PPH) y las células de sangre de cordón umbilical (UCB) se purificaron generalmente usando Ficoll o cloruro de amonio para obtener todas las células nucleadas (TNC). Las TNC se usaron después en un procedimiento de selección positiva para aislar células CD34⁺ usando perlas anti-CD34 y RoboSep según el protocolo del fabricante (StemCell Technologies, Inc.). En este experimento, las células CD34⁺ se aislaron con una pureza superior al 90%. Alternativamente, el equipo de enriquecimiento de células progenitoras humanas EasySep® (StemCell Technologies, Inc.) se usó en un procedimiento de selección negativa para reducir las células asignadas del linaje mediante el uso del cóctel de enriquecimiento de células progenitoras humanas con anticuerpos monoclonales contra los siguientes antígenos de la superficie celular humana: CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y Glucoforina A. Utilizando la selección negativa, se recuperaron el 90% de células CD34⁺ de las materias primas. La composición celular de las HSC recuperadas se resumió en la Tabla 1.

TABLA 1

Composición celular de células madre hematopoyéticas enriquecidas (HSC). Se calculó la desviación típica para medias de población para 3 donantes.

	% de la media	STDEV
Lin-CD34 ⁺	75,1	6,2
Lin-CD34 ⁻ CD38 ⁻	9,8	2,4
Lin-CD34 ⁻ CD133 ⁺	0,9	0,2
Lin-CD34 ⁻ CD117 ⁺	7,2	0,5

7.2. Ejemplo 2: Crecimiento y diferenciación sin células sustentadoras de células madre hematopoyéticas en linfocitos citolíticos naturales

Se cultivaron células CD34⁺ en las siguientes formulaciones de medio durante hasta 48 días, y se tomaron alícuotas de células para evaluar el recuento de células, la viabilidad celular, la caracterización de la diferenciación de linfocitos citolíticos naturales y la evaluación funcional.

Medio NK1: GBGM (medio de crecimiento a base de Glycostem, Glycostem n° en cat. CCT-SCB500, Clear cell technology) enriquecido con pen/estrep (n° en cat. 15140, Gibco), 20 ng/ml SCF (n° en cat. 255-SC, R & D Systems), 10 ng/ml de ligando de Flt3 (n° en cat. 308-FK, sistema de R & D), 20 ng/ml de TPO (n° en cat. 288-TP, R & D Systems), 20 ng/ml de IL-7 (n° en cat. 207-IL, R & D Systems), 200 UI/ml de IL-2 (n° en cat. 202-IL, R & D Systems) y 10 ng/ml de IL-15 (n° en cat. 247-IL, R & D Systems).

Medio NK2: DMEM (n° en cat. MT-10-013-CV, Fisher): F12 de Ham (n° en cat. BW12-615F, Fisher) como 1:2 enriquecido con L-Glutamina 2 mM (n° en cat. 25030, Invitrogen), 1% pen/estrep, 20% de suero AB humano (n° en cat. 100-512, Gemcell), 5 ng/ml de selenito de sodio (n° en cat. S9133, Sigma), etanolamina 50 nM (n° en cat. E0135, Sigma), β-mercaptoetanol 25 M (n° en cat. 21985, Invitrogen), 20 mg/ml de ácido ascórbico (n° en cat. 47863, Sigma), 5 ng/ml de IL-3 (n° en cat. 203-IL, R & D Systems), 20 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de ligando de Flt3, 20 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15.

Medio NK3: X-vivo 20 (n° en cat. BW04-448Q, Fisher) enriquecido con pen/estrep, suero AB humano al 10% (n° en cat. 100-512, Gemcell) y 500 UI/ml de IL-2.

Medio NK2A: GBGM enriquecido con 10% de suero AB humano, 1% pen/estrep, 20 ng/ml SCF, 10 ng/ml de ligando de Flt3, 20 ng/ml de TPO, 20 ng/ml de IL-7, 200 UI/ml de IL-2, 10 ng/ml de IL-15 y 1,5 UI/ml de heparina (n° en cat. H3149, Sigma).

Medio NK2B1: DMEM: F12 de Ham como 1: 2 enriquecido con L-glutamina 2 mM, 1% pen/estrep, 20% de suero AB humano, 5 ng/ml de selenito de sodio, etanolamina 50 μM, β-mercaptoetanol 25 μM, 20 μg/ml de ácido ascórbico, 5 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de ligando de Flt3, 20 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15.

Medio NK2B2: DMEM: F12 de Ham como 1:2 enriquecido con L-glutamina 2 mM, 1% pen/estrep, 20% de suero AB humano, 5 ng/ml de selenito de sodio, etanolamina 50 μM, β-mercaptoetanol 25 μM, 20 μg/ml de ácido ascórbico, 200 UI/ml de IL-2, 20 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de ligando de Flt3, 20 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15.

Medio NK2C: RPMI1640 (n° en cat. 22400105, Invitrogen) enriquecido con 10% de SFB (n° en cat. SH30070.03, Hyclone), L-glutamina 2 mM, 1% de pen/estrep, 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de ligando de Flt3, 100 UI/ml de IL-2, 20 ng/ml de IL-7 y 20 ng/ml de IL-15.

Medio NK2D: Medio exento de suero (StemSpan, n° en cat. 09650, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) enriquecido con glucocorticoide sintético dexametasona 1 μM (Dex, n° en cat. D4902, Sigma, St Louis, MO), 40 ng/ml de factor 1 de crecimiento insulinoide (IGF-1, n° en cat. 291-G1-250, R & D Systems, Minneapolis, MN), 100

ng/ml de SCF, 40 µg/ml de lípidos (mezcla de lípidos rica en colesterol; n° en cat. C7305-1G, Sigma, St Louis, MO), 5 ng/ml de IL-3, 200 UI/ml de IL-2, 20 ng/ml de IL-7 y 20 ng/ml de IL-15.

5 Las células recogidas en diferentes puntos de tiempo se lavaron dos veces con RPMI1640 (exento de fenol) y FBS al 5%, se marcaron con anticuerpos conjugados con fluorescencia (Tablas 2 y 3) durante 15 min a 4°C, y se analizaron por citometría de flujo (FACSCanto, BD) y el programa informático de citometría FlowJo (Tree Star).

Tabla 2
Anticuerpos utilizados para marcado celular

10

Anticuerpo HSC-NK FACS		
Elemento	Proveedor	Nº en cat.
FITC anti-hu CD3	BD	555332
APC-Cy7 anti-hu CD3	BD	557832
APC anti-hu CD5	BD	555355
PE anti-hu CD7	BD	555361
FITC anti-hu CD16	BD	555406
PE-Cy5 anti-hu CD16	BD	555408
PE anti-hu CD56	BD	555516
PE-CY5 CD56 (N-CAM)	BD	555517
PE CD94	R&D	FAB-1058P
APC anti-hu CD117	BD	550412
PE anti-hu CD226	BD	559789
Isotype FITC IgG1 de ratón	BD	340755
Isotype PE IgG1 de ratón	BD	340761
Isotype PerCP IgG1 de ratón	BD	340762
Isotype PE-CY7 IgG1 de ratón	BD	348798
Isotype APC IgG1 de ratón	BD	340754
Isotype APC-CY7 IgG1 de ratón	BD	348802
Isotype APC IgG2a de ratón	BD	555576
PE anti-hu KIR-NKAT2 (2DL3)	BD	556071
PE NKB1(3DL1)	BD	555967
APC NKG2D	BD	558071
APC NKp46	BD	558051
Simply Cellular Compensation beads	Bangs Labs	550

Tabla 3. Cuadro de caracterización de receptores de superficie de NK

	FITC	PE	PerCP	APC	APC-Cy7
Blanco					
Isotipo					
Cuadro 1	CD3	CD56	CD16		
Cuadro 2	CD16	NKB1	CD56	NKG2D	CD3
Cuadro 3	CD16	NKAT2	CD56	NKp46	CD3
Cuadro 4	CD16	CD94	CD56	CD117	CD3
Cuadro 5	CD16	CD226	CD56		CD3
Cuadro 6	CD16	CD7	CD56	CD5	CD3

15 *Ensayo de citotoxicidad utilizando marcaje PKH26/TO-PRO-3.* Las células tumorales diana se marcaron con PKH26 (n° en cat. PKH26GL, Sigma-Aldrich), un colorante que se inserta en la membrana plasmática celular mediante su resto alifático lipofílico, luego se colocaron en placas de cultivo histico de 96 pocillos con fondo en U y se incubaron con linfocitos NK aumentados en varias proporciones efector-diana (E:D) en 200 µl de RPMI1640 enriquecido con 10% de FBS. Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C en 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se recogieron y se añadió a los cultivos TO-PRO-3 (Invitrogen n° en cat. T3605), una tinción de ADN impermeable a la membrana (concentración final 1 µM) seguido de análisis FACS. La citotoxicidad se expresó como el porcentaje de células muertas (PKH26⁺ TO-PRO-3⁺) dentro de las células tumorales diana totales PKH26⁺.

20

25 *Optimización del aumento de células CD34⁺ y diferenciación en linfocitos NK.* Entre las formulaciones de medios probados, NK1, NK2 y NK3, el medio NK1 mostró un aumento de 500 veces el día 21 (D21). Ni el medio NK2 ni el NK3 mantuvieron la proliferación celular ni la diferenciación. Se realizó una optimización adicional del medio para el medio NK1 y los medios posteriores se denominaron NK2A, NK2B, NK2C y NK2D. Las células CD34⁺ cultivadas con medio NK2A mostraron un aumento de 105 veces el día 55 (D55). En base a los resultados de las veces de aumento, diferenciación y citotoxicidad del medio NK1, 2 y 3, se realizó el segundo lote de formulaciones de medio NK2A, NK2B, NK2C y NK2D y el día 55, se consiguió un aumento de 10⁵ veces (como se muestra en la Fig. 1). El

30

medio NK2B presentó un aumento de aproximadamente 3×10^4 veces. El cultivo en medio NK2C dio como resultado un aumento de 3×10^2 veces en 21 días, seguido de una disminución de la viabilidad celular. El medio NK2D no mantuvo las células durante todo el experimento.

5 El día 48 (D48), alrededor del 90% de los linfocitos NK en el medio NK2A eran $CD56^+CD3^-$. Dentro de la población $CD56^+CD3^-$, más del 98% de las células eran $CD56^+CD16^-$ (como se muestra en la figura 2), mientras que el 58% expresaban el receptor activador NKG2D, el 68% eran NKp46 y el 17% eran $CD226^+$ (como se muestra en las Tablas 4A y 4B).

10 Tablas 4A y 4B. Caracterización fenotípica de linfocitos NK aumentados el D48

4A: Fenotipo el D48							
NK2A		$CD56^+CD3^-$	$CD56^+CD16^-$	$CD56^+CD16^+$	NKB1	NKG2D	NKAT2
	Promedio	86,84%	98,44%	1,56%	3,38%	58,41%	1,69%
	Típico	4,50%	0,30%	0,30%	1,42%	5,88%	0,22%

4B: Fenotipo el D48: $CD56^+CD3^-$					
NKp46	CD94	CD117	CD226	CD7	CD5
67,92%	38,08%	80,53%	17,32%	34,43%	53,53%
5,43%	21,14%	14,27%	14,26%	8,48%	3,00%

15 Además, el 97,8% de las células cultivadas en medio NK2A y el 93,1% de las células cultivadas en medio NK2B fueron $CD56^+CD16^-$ el día 21 de cultivo.

7.3. Ejemplo 3: El cultivo de linfocitos NK en medio CNK mejora el aumento y la citotoxicidad de linfocitos NK

20 El día 27 (D27), las células $CD34^+$ cultivadas en medio NK2A se cultivaron más en uno de los siguientes medios:

- Medio en dos etapas, que comprende medio CNK y medio de mantenimiento. El medio CNK es IMDM (Invitrogen) enriquecido con 10% de FCS (Hyclone), 200 UI/ml de IL-2 (R & D Systems), 35 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina (Sigma-Aldrich), 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (Sigma-Aldrich), etanolamina 2×10^{-5} M (Sigma-Aldrich), 1 $\mu\text{g/ml}$ de ácido oleico (Sigma-Aldrich), 1 $\mu\text{g/ml}$ de ácido linoleico (Sigma-Aldrich), 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de ácido palmítico (Sigma-Aldrich), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de ASB (Sigma-Aldrich) y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA-P, Sigma-Aldrich). Los linfocitos NK $CD56^+CD3^-$ cultivados en medio NK2A se volvieron a poner en suspensión en $2,5 \times 10^5$ células vivas/ml en medio CNK en placas de 24 pocillos o frascos T tratados con cultivo celular. Se añadieron células PBMC alogénicas y células K562 (estirpe celular de leucemia mielógena crónica) tratadas con mitomicina C al medio CNK como células sustentadoras, hasta una concentración final de 1×10^6 por ml. Los linfocitos NK se cultivaron durante 5-6 días a 37°C en 5% de CO_2 . Después de 5-6 días y luego cada 3-4 días, se añadió al cultivo un volumen igual de medio de mantenimiento (IMDM con 10% de FCS, 2% de suero AB humano, antibióticos, L-glutamina y 400 unidades de IL-2 por ml).
- Medio NK2A (PDAC) con células madre placentarias adherentes al plástico de cultivo hístico $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ tratadas con mitomicina C como células sustentadoras;
- medio NK2A (MSC) con células madre mesenquimatosas (MSC) tratadas con mitomicina C como células sustentadoras; o
- medio NK2A sin células sustentadoras (FF) como referencia.

45 El medio en dos etapas mejoró las veces de aumento de las células $CD34^+$ en comparación con NK2A (FF), NK2A (PDAC) y NK2A (MSC), especialmente entre el día 27 (D27) y el día 48 (D48). Véase la figura 3.

50 El día 35, la proporción de células $CD34^+$ ya había disminuido a aproximadamente 4%, mientras que la proporción de $CD56^+CD3^-$ había aumentado a aproximadamente 80% en el medio en dos etapas. El día 45 (D45), las células cultivadas en el medio en dos etapas mostraron la citotoxicidad más alta en comparación con los linfocitos NK cultivados en NK2A (FF), NK2A (PDAC) y NK2A (MSC) (como se muestra en la figura 3). La caracterización fenotípica el día 41 (como se muestra en la figura 5) mostró una expresión aumentada de NKp46 y CD226 en las células, lo que indica una posible explicación del aumento de citotoxicidad. El D41, la proporción de células $CD226^+$ aumentó de $0,9\% \pm 0,8\%$ en medio NK2A a $13\% \pm 4\%$ en medio en dos etapas; la proporción de linfocitos NKp46⁺ aumentó de $55,4\% \pm 8,7\%$ en medio NK2A a $80\% \pm 7,85\%$ en medio en dos etapas. El D48, la proporción de células $CD226^+$ aumentó de $17,3\% \pm 14,3\%$ en medio NK2A a $52,3\% \pm 11,64\%$ en medio en dos etapas; la proporción de linfocitos NKp46⁺ aumentó de $67,9\% \pm 5,4\%$ en medio NK2A a $86\% \pm 4\%$ en medio en dos etapas. No hubo diferencias significativas de expresión de NKG2D entre las condiciones probadas. Los cambios en la expresión de CD226 y NKp46 se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Expresión de CD226 y NKp46 en linfocitos NK cultivados en NK2A (FF) y medio en dos etapas el día 41 (D41) y el día 48 (D48). Se calculó la desviación típica para 3 donantes.

D41		NK2A (FF)	Dos etapas	5
CD226 %	Promedio	0,9%	13%	
	STDEV	0,8%	4%	
NKp46 %	Promedio	55,4%	80%	
	STDEV	8,7%	7,85%	
D48		NK2A (FF)	Dos etapas	10
CD226 %	Promedio	17,3%	52,3%	
	STDEV	14,3%	11,6%	
NKp46 %	Promedio	67,9%	86%	
	STDEV	5,4%	4%	15

7.4 Ejemplo 4: Comparación de linfocitos citolíticos naturales cultivados en medio en dos etapas y linfocitos citolíticos naturales procedentes de células madre embrionarias (CME)

20 Linfocitos NK cultivados en el medio en dos etapas se compararon con linfocitos NK procedentes de células madre embrionarias (CME), que se produjeron por el método de Woll *et al.*, *Blood* 113(4): 6094-6101 (2009). Específicamente, se observó una diferencia en los niveles de expresión de CD94 y CD117 durante el proceso de cultivo de ambos tipos de células. La figura 6 demuestra que la expresión de CD117 era alta en los linfocitos NK en dos etapas, o "+", desde el día 7 (D7) hasta el día 35 (D35), mientras que la expresión de CD94 aumentó gradualmente. En el día 35 (D35), aproximadamente el 44% de las células CD56⁺CD3⁻ (dos etapas) eran células CD94⁺CD117⁺, el 37,6% de las células CD56⁺CD3⁻ eran CD94⁺CD117⁺ y el 14,7% de las células CD56⁺CD3⁻ eran CD94⁺CD117⁻. Como tal, los linfocitos NK producidos por el método en dos etapas son distinguibles de los linfocitos NK procedentes de las CME, 78% de las cuales permanecieron CD117^{low/-} desde el día 14 hasta el día 35 del cultivo. Esta diferencia en la expresión de CD117 es útil porque los linfocitos NK CD117⁺ son citotóxicos para con estirpes celulares tumorales de diversos tejidos, como se describe en el ejemplo 6, más adelante.

Estos resultados sugieren que la progresión de la diferenciación de los linfocitos TSNK es diferente de la de los linfocitos NK procedentes de CME, y que los linfocitos TSNK se distinguen de los linfocitos NK procedentes de CME.

35 7.5. Ejemplo 5: Los PDAC aumentan las veces de aumento de los linfocitos citolíticos naturales cultivados en medio NK2A

Para evaluar el efecto de las células madre placentarias adherentes a plástico CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ (mencionadas en este ejemplo como PDAC) sobre la diferenciación de células madre hematopoyéticas (HSC) a linfocitos citolíticos naturales, las HSC se estimularon con las PDAC tratadas con mitomicina C o células madre mesenquimatosas (MSC) procedentes de médula ósea en una relación de 10:1 PDAC/MSC:HSC el día 0 y el día 21, mientras que se usó un cultivo exento de sustentadoras como referencia. Se usó medio NK2A como medio de cultivo. Se descubrió que los PDAC incrementan el número de veces de aumento de los linfocitos NK cultivados en comparación con el medio solo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la citotoxicidad entre las células cultivadas con o sin la capa sustentadora. Las células tratadas con MSC mostraron las mayores veces de aumento, pero la menor citotoxicidad, como se muestra en la figura 7.

7.6. Ejemplo 6: Actividad citotóxica de linfocitos NK aumentados empleando medio en dos etapas

50 Este ejemplo demuestra que los linfocitos NK producidos a partir de células CD34⁺ aumentadas y diferenciadas usando el proceso en dos etapas descrito anteriormente son citotóxicos para estirpes celulares tumorales.

Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). El ensayo de liberación de LDH se realizó usando el equipo de ensayo de citotoxicidad no radioactivo CYTOTOX 96® (Promega, n° en cat. G1780). En este ensayo, se usaron linfocitos NK cultivados procedentes de perfundido placentario humano (PPH) compatible para el donante y unidades de sangre de cordón umbilical (unidades de Combinaciones) como células efectoras, mientras que se usaron determinadas células de estirpe celular tumoral como células diana. De las tres unidades utilizadas en este estudio, el porcentaje de células PPH fue del 56,6% ± 28,3%. Las células efectoras y las células diana se colocaron en placas de cultivo hístico de 96 pocillos con fondo en U y se incubaron a diversas relaciones efector-diana (E:T) en 100 µl de RPMI 1640 sin rojo de fenol (Invitrogen, n° de catálogo 11835-030) enriquecido con 2 % de suero AB humano (Gemini, n° cat. 100-512). Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Después de la incubación, se transfirieron 50 µl de sobrenadante a la placa de ensayo enzimática, se detectó la actividad de LDH tal como lo proporcionaba el fabricante, y se midió la absorción a 490 nm en un lector de ELISA (Synergy HT, Biotek). La citotoxicidad se calculó según la siguiente ecuación: % citotoxicidad = (muestra - efector espontáneo - objetivo espontáneo)/(objetivo máximo - objetivo espontáneo) * 100, donde "efector espontáneo" es una referencia para la liberación espontánea de LDH de las células efectoras; "objetivo espontáneo" es una referencia para la

liberación espontánea de LDH de las células diana; y "objetivo máximo" es una referencia para la liberación máxima de LDH cuando esencialmente se lisan el 100% de las células.

5 *Aislamiento de células CD34⁺ de perfundido placentario humano (PPH) y células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical (UCB).* Se purificaron células de PPH y UCB usando Ficoll o cloruro de amonio para obtener las células nucleadas totales (TNC). Las TNC se usaron luego en un procedimiento de selección positiva para aislar células CD34⁺ usando perlas anti-CD34 y RoboSep siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (StemCell Technologies, Inc.). En este experimento, se aislaron células CD34⁺ con más del 90% de pureza.

10 *Estudio de sensibilidad de las células tumorales a linfocitos NK cultivados en dos etapas.* Estirpes celulares tumorales (tabla 1), incluidos cáncer de mama humano (HCC2218), adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29), leucemia mielógena crónica (LMC) humana, leucemia mieloide aguda (LMA) humana, glioblastoma humano (LN-18 y U-118MG), mieloma múltiple humano (U266), linfoma histiocítico humano (U937) y retinoblastoma humano (WERI-RB-1) se cultivaron junto con linfocitos NK en dos etapas. Los linfocitos NK cultivados en dos etapas incluyeron los cultivados en medio NK2A durante 21 días, luego los cultivados en medio CNK durante 21 días, y los cultivados en medio NK2A durante 28 días y luego en medio CNK durante 14 días. La citotoxicidad de los linfocitos NK se midió mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) después de un cultivo conjunto de 4 horas. A una relación efector a diana (E:T) de 10:1, esta última generalmente presentó una citotoxicidad más alta que el primero (tabla 6). De las estirpes celulares tumorales, LN-18 fue la más sensible a la destrucción mediada por NK, seguido de K562, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 y U266.

Por lo tanto, los linfocitos TSNK mostraron citotoxicidad significativa para con varias estirpes de células cancerosas. Además, parece que la citotoxicidad de NK se puede mejorar prolongando el período de cultivo en medio NK2A de 21 días a 28 días.

25

Tabla 6. Citotoxicidad de linfocitos TSNK cultivados dirigidos a estirpes celulares tumorales

Estirpes tumorales	Medio NK2A de 21 días + Medio CCT NK de 21 días		Medio NK2A de 28 días + Medio CCT NK de 14 días	
	Promedio de citotoxicidad, %	STDEV	Promedio de citotoxicidad, %	STDEV
HCC2218	15,65 (n = 1)		11,89 (n = 3)	10,2
HT-29	20,52 (n = 3)	9,3	33,42 (n = 3)	20,2
K562	69,63 (n = 3)	27,6	80,04 (n = 3)	25,4
KG-1	5,67 (n = 3)	3,4	15,41 (n = 3)	9,2
LN-18	99,00 (n = 3)	0,0	99,00 (n = 3)	0,0
U-118MG	23,12 (n = 3)	6,9	49,16 (n = 2)	15,8
U266	2,21 (n = 1)		5,07 (n = 2)	3,3
U937	46,44 (n = 2)	19,3	51,58 (n = 2)	23,2
WERI-RB-1	25,30 (n = 2)	4,7	36,79 (n = 2)	11,3

*n: número de donantes

30 *Caracterización por microARN de células CD34⁺ en perfundido placentario humana (PPH) y células CD34⁺ en sangre del cordón umbilical (UCB).* Las células de PPH y UCB CD34⁺ purificadas de donantes compatibles se sometieron a preparación de microARN (miARN) usando un equipo de aislamiento de miARN MIRVANA™ (Ambion, n° de cat. 1560). Las células CD34⁺ (0,5 a 1,5 x 10⁶ células) se rompieron en un tampón de lisis desnaturalizante. Las muestras se sometieron a extracción con ácido-fenol + cloroformo para aislar ARN muy enriquecido para especies pequeñas de ARN. Se añadió etanol al 100% para llevar las muestras a etanol al 25%. Cuando esta mezcla de lisado/etanol se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio, se inmovilizaron especies de ARN grandes, y las especies de ARN pequeñas se recogieron en el filtrado. La concentración de etanol del filtrado se aumentó luego a 55%, y la mezcla se hizo pasar a través de un segundo filtro de fibra de vidrio donde los ARN pequeños se inmovilizaron. Este ARN se lavó varias veces y se eluyó en una solución de baja concentración iónica. La concentración y pureza del ARN pequeño recuperado se determinó midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm. Los miARN se encontró que eran exclusivos para las células CD34⁺ PPH en todos los donantes evaluados (n = 3) incluidos ash-miR-380, ash -miR-512, ash -miR-517, ash -miR-518c, ash -miR-519 b, y ash -miR-520a.

45 7.7. Ejemplo 7: Aislamiento de células CD34⁺ de UCB y PPH combinadas

Este ejemplo demuestra el aislamiento de células CD34⁺ a partir de sangre de cordón umbilical (UCB) y perfundido placentario humano (PPH) (Combo). Para evaluar la relación de agrupamiento UCB:PPH, se realizaron comparaciones una al lado de la otra de 3 relaciones de agrupamiento diferentes de la siguiente manera: (1) agrupamiento completo: 1 x UCB (volumen completo) + 1 x PPH (volumen completo); (2) agrupamiento parcial de PPH (33%): 1 x UCB (volumen completo) + 0,33 x PPH (1/3 de volumen de PPH); y (3) agrupamiento parcial de PPH (10%): 1 x UCB (volumen completo) + 0,10 x PPH (1/10 de volumen de PPH). Se ejecutaron un total de N = 3

50

réplicas experimentales. Se registraron las TNC iniciales y los volúmenes. Las muestras combinadas se purificaron a continuación para las células CD34⁺ y se determinó la pureza de CD34⁺ después de la descongelación. La relación de agrupación óptima se determinó gráficamente a continuación a partir de las gráficas de pureza de CD34⁺ después de la descongelación frente a fracciones volumétricas o de recuento celular (TNC) (como % de Combo). Como se muestra en la figura 8, el criterio de valoración pureza de CD34⁺ se correlaciona bien con el contenido volumétrico de PPH, pero no tanto con el contenido de PPH TNC. En general, 85% v/v de UCB, 15% v/v de PPH resultó ser la relación de combinación óptima para obtener células CD34⁺ con una pureza del 80% y superior.

7.8. Ejemplo 8: Comparación del cultivo de linfocitos NK usando medios a base de GBGM®

Este ejemplo demuestra la comparación de los procesos de cultivo de linfocitos NK utilizando dos medios a base de GBGM (el proceso en tres etapas y el proceso en dos etapas). Los dos procesos se resumen en la tabla 10. Ambos procesos utilizaron GBGM como medio basal para la diferenciación de linfocitos NK y células CD34⁺ de placenta en origen.

Tabla 7. Compendio de los procesos en tres etapas y en dos etapas

Procedimiento de cultivo	Procedimiento en tres etapas	Procedimiento en dos etapas
	<p>3 etapas, basado en GBGM, sin sustentadoras, 35 días</p> <ul style="list-style-type: none"> Etapa 1 (9 días): GBGM con suero AB humano al 10% (HS), heparina LWH, TPO, SCF, IL-7, Flt3L (25-27 ng/ml) Etapa 2 (5 días): GBGM con 10% de HS, heparina LWH, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15 (20-27 ng/ml) Etapa 3 (21 días): GBGM con 10% de HS, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15 (20-27 ng/ml), IL-2 (1.000 U/ml) <p>Uso de dosis bajas de citocinas (IL-6, LIF, G-CSF, GM-CSF, MIP 1a) de principio a fin, a 50-250 pg/ml</p>	<p>2 etapas, GBGM en 1ra etapa, con sustentadoras K562/PBMC, 35 días</p> <ul style="list-style-type: none"> Etapa 1 (21 días): GBGM con 10% de suero humano, heparina, TPO, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15, (10-20 ng/ml), IL-2 (200 U/ml) Etapa 2 (14 días): Proceso de crecimiento de CCT NK en medio CCT NK, IMDM con 10% de FBS, sustentadoras K562 + PBMC, IL-2 (200 U/ml). <p>Medios de reposición en etapa 2 con medio de mantenimiento de CCT NK, IMDM con 10% de FBS, 2% HS, IL-2 (200 U/ml)</p>

Los parámetros experimentales se describen de la siguiente manera:

Lotes de donantes:

- (1) células CD34⁺ de UCB reciente: N=6
- (2) células CD34⁺ de "Combo" reciente: N=2
- (3) CD34⁺ de "Combo" crioconservada: N=8

Escala: Placas multipocillos para T-25, hasta varios frascos T-75, de 1 a 80 ml en volumen de cultivo

Métodos de proceso:

- (1) Proceso en dos etapas
- (2) Proceso en tres etapas

Empleo de sustentadoras:

- (1) Sin sustentadoras
- (2) Con sustentadoras K562 y PBMC inactivadas, agregadas al cultivo el día 21

Densidad de siembra: 20.000-50.000 células/ml

Se generaron linfocitos CD34⁺ de UCB reciente o combinado reciente y se crioconservaron por los métodos descritos en los ejemplos 7, 10 y 11. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C, más de 90% de humedad y CO₂ al 5%. El crecimiento celular se controló durante todo el tiempo (recuento de células) y se realizaron intercambios de medio dos veces por semana para mantener las concentraciones de células dentro del intervalo de 5 × 10⁴ - 1 × 10⁶ por ml. La diferenciación se controló por análisis fenotípico los días 21 y 35. Cuando se usaron sustentadoras, el día 21 de cultivo de NK, se inactivaron con mitomicina-C (16 g/ml, 2 horas, 37°C) K562 cultivadas 3 días recientes y alo-PBMC después de descongelación y se añadieron a las condiciones del proceso en dos etapas a 1 × 10⁶ por ml. Los NK diferenciadoras se normalizaron a 0,5 × 10⁶ por ml. El día 35, después de realizar los recuentos de células finales, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo usando células K562 recién cultivadas y marcadas con PKH (relación E:T 10:1, 4 horas, 37°C) para evaluar la funcionalidad de NK.

Resultados

Las medianas de las veces de aumento de TNC para células CD34⁺ procedentes de UCB reciente empleando los dos procesos fueron comparables el día 35. El proceso en dos etapas parecía producir más veces de aumento de TNC que el proceso en tres etapas para células CD34⁺ procedentes del combo reciente. Las veces de aumento de TNC totales fueron comparables para las células CD34⁺ procedentes del combo después de la descongelación usando ambos procesos, pero fueron significativamente menores que los procedentes de UCB reciente o del combo reciente. En total, tanto el proceso en tres etapas como en dos etapas produjeron un rendimiento celular similar al final del cultivo.

El día 21, no hubieron diferencias notables de fenotipo en las células originadas a partir de UCB o Combo. El proceso en dos etapas dio como resultado un mayor porcentaje de linfocitos NK CD56⁺CD3⁻ (promedio 14,7%) que el proceso en tres etapas (promedio 6,1%). El grado de diferenciación (p. ej., nivel de CD56⁺CD3⁻) parecía ser dependiente del donante. El porcentaje tanto de poblaciones CD3⁺CD56⁻ (linfocitos T) como CD3⁺CD56⁺ (linfocitos tipo NKT) fue mínimo en todos los casos.

El día 35, se encontró que ambos procesos eran eficaces para diferenciar los linfocitos NK, como lo demuestran los niveles de pureza de CD56⁺CD3⁻ de alto criterio de valoración (87,2% y 90,1% para los procesos en dos y tres etapas, respectivamente). La adición de sustentadores en el proceso en dos etapas pareció mejorar la pureza fenotípica de NK (75,3% sin sustentadores, 87,2% con sustentadores), mientras que no se observó un beneficio observable de los sustentadores en la pureza de NK (90,1% sin sustentadores, 84,7% con sustentadores) con el proceso en tres etapas.

Los linfocitos NK cultivados mantuvieron su fenotipo CD16⁻ de principio a fin. El proceso en dos etapas parecía producir ligeramente más linfocitos CD56⁺CD3⁺ en ausencia de sustentadores (promedio de 11,2%) que las demás condiciones (<2%). La presencia de PBMC y sustentadores K562 en ambos procesos aumentó/activó significativamente determinados marcadores funcionales NK (NKp46, DNAM-1, CD94) en la población de linfocitos NK. En general, se encontró que los perfiles de expresión de marcadores de pureza y funcionales NK eran comparables entre los dos procesos, cuando las condiciones del sustentador son idénticas.

La funcionalidad de los linfocitos NK cultivados, determinada por el ensayo de citotoxicidad de K562 *in vitro* de 4 horas, resultó ser comparable entre los dos procesos cuando las condiciones del sustentador son idénticas. Los linfocitos NK activados por sustentador fueron muy eficaces para destruir las células K562 *in vitro*, con lisis específica media de 93,2% y 93,6% de lisis específica para los procesos en dos y tres etapas, respectivamente.

En resumen, se encontró que los procesos en dos etapas y en tres etapas producían un crecimiento, fenotipo (pureza y marcadores de activación), y funcionalidad *in vitro* comparables para linfocitos NK cuando se usaba la misma condición del sustentador. El proceso en dos etapas ofrece la facilidad y conveniencia de cultivar linfocitos NK en comparación con el proceso en tres etapas.

7.9. Ejemplo 9: Comparación del cultivo de linfocitos NK usando diversos medios basales

Este estudio tiene como objetivo evaluar la diferenciación y el aumento de los linfocitos NK procedentes de CD34⁺ utilizando diferentes medios basales.

Las condiciones experimentales se resumen en la tabla 11. Las células se cultivaron como se describe en el ejemplo 11. Todos los experimentos se prepararon a escala de placas multipocillos/frascos en T y se mantuvieron a 37°C, más de 90% de humedad e incubadora con CO₂ al 5%. El crecimiento celular se controló durante todo el tiempo (recuento de células) y se realizaron intercambios de medio dos veces por semana para mantener las concentraciones de células dentro del intervalo de 5×10^4 - 1×10^6 por ml. La diferenciación se controló por análisis fenotípico los días 21 y 35. El día 21, se inactivaron K562 recientes cultivadas 3 días y alo-PBMC después de la descongelación se inactivaron y se añadieron al cultivo de linfocitos NK en desarrollo a razón de 1×10^6 por ml. Los linfocitos NK se normalizaron a $0,5 \times 10^6$ por ml. El día 35, después de realizar los recuentos finales de células, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo utilizando células K562 recién cultivadas y marcadas con PKH (relación E:T 10:1, 4 horas, 37°C) para evaluar la funcionalidad de NK.

Tabla 8. Compendio de condiciones experimentales para la evaluación de varios medios basales

Donantes de CD34⁺	Donante 1 de UCB
Método del proceso de cultivo	Proceso en tres etapas
Sustentadores K562 y PBMC	• Con sustentadores @ día 21
Medio basal evaluado	• GBGM (referencia) • AIM-V • X-VIVO 10 • X-VIVO 15 • OpTmizer • Stemspan H3000 • Cellgro • DMEM:F12 • DMEM:F12 w/ 5 mM OAC (añadido al cultivo Delse el día 7 al día 35)
Densidad de siembra (día 0)	50.000/ml

5 Rendimiento del crecimiento

Stemspan H3000 y OpTmizer mostraron un rendimiento de crecimiento comparable (número de veces de aumento de TNC) a GBGM el día 35. Cellgro, X-VIVO 15, AIM-V, X-VIVO 10, DMEM:F12, DMEM:F12 con OAC 5 mM presentaron un rendimiento de crecimiento menor que GBGM.

10

Análisis fenotípico

El día 35 (criterio de valoración), GBGM produjo una pureza del 80% de los linfocitos CD56⁺CD3⁻. OpTmizer y Stemspan H3000 produjeron aproximadamente el 50% de pureza de los linfocitos CD56⁺CD3⁻. DMEM:F12 produjo aproximadamente un 35% de pureza de los linfocitos CD56⁺CD3⁻. Los medios AIM-V, X-VIVO 10, X-VIVO 15 y Cellgro produjeron aproximadamente < 30% de pureza de los linfocitos CD56⁺CD3⁻. Se encontró que la adición de OAC a medio basal DMEM:F12 durante el cultivo mejora en gran medida la pureza de NK del criterio de valoración; el porcentaje de CD56⁺CD3⁻ el día 35 de cultivo aumentó del 35% al 72%.

15

20 Citotoxicidad/Funcionalidad

Se descubrió que la adición de OAC 5 mM al medio basal DMEM:F12 durante el cultivo mejora en gran medida el estado de activación y la funcionalidad *in vitro* de los linfocitos NK. La adición de OAC también aumentó significativamente el nivel de marcadores de activación de NK NKp46, NKG2D, DNAM-1 y CD94. La funcionalidad *in vitro* (citotoxicidad de K562) de los linfocitos NK del día 35 aumentó sustancialmente también, de 21,4% a 97,1%.

25

En general, las propiedades de los linfocitos NK mejoraron significativamente a partir de la adición de OAC 5 mM.

30 7.10. Ejemplo 10: Almacenamiento y crioconservación de linfocitos NK

Este ejemplo demuestra los métodos de almacenamiento y crioconservación de linfocitos NK. Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas del perfundido placentario humano (PPH) y las células sanguíneas del cordón umbilical aumentaron y se diferenciaron en linfocitos NK usando los protocolos descritos en los ejemplos previos. Las células se crioconservaron inmediatamente después de aislarse de PPH y sangre de cordón umbilical (el día 0) o durante la primera fase de crecimiento de los linfocitos NK (el día 9, día 14, día 21 o día 35 después del aislamiento).

35

Las células se crioconservaron en las siguientes formulaciones de crioconservación: Formulación 1 - medio dextrano crio: 5% de DMSO (Sigma Aldrich, D2650), 55% de dextrano (10% p/v en solución salina normal) (LMD al 10% en inyección de cloruro de sodio al 0,9%, Hospira), 40% de HAS (Octapharma); Formulación 2 – medio trehalosa crio: 5% de DMSO, 55% de trehalosa (10% p/v en solución salina normal), 40% de ASH; Formulación 3 - CryoStor® CS2 (BioLife Solutions); Formulación 4 - CryoStor® CS5 (BioLife Solutions); Formulación 5 - CryoStor®CS10 (BioLife Solutions); Formulación 6 - Medios de congelación sin suero (Sigma-Aldrich, n° en Cat. 6295); Formulación 7 - Medios de congelación con glicerol (Sigma-Aldrich, n° en Cat. C6039); o Formulación 8 - medios de congelación con DMSO y sin suero (Sigma-Aldrich, n° en Cat. 2639).

40

45

Las células recogidas en diferentes puntos de tiempo se lavaron varias veces con medio de cultivo o solución salina. Las células se centrifugaron a continuación para obtener gránulos de células. Los sobrenadantes se eliminaron, y los sedimentos celulares se pusieron en suspensión con medios de crioconservación a aproximadamente 1 x 10⁶-1,5 x 10⁷ o más células por mililitro. La suspensión celular se dividió en partes alícuotas en viales con septum de 1 ml o 2

50

ml y se incubó a 2-8°C durante aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, las células se congelaron en un congelador de velocidad de control (Thermo) a 0,5°C/min. Los viales congelados se transfirieron a un congelador criogénico para su almacenamiento en vapor de nitrógeno líquido. Los linfocitos NK crioconservados se pueden descongelar rápidamente en un baño de agua a 37°C con agitación suave en remolino de las muestras hasta que todo el hielo visible se derrita. Las muestras de células se pueden diluir con medios de cultivo precalentados.

7.11. Ejemplo 11: Almacenamiento y crioconservación de linfocitos NK

Este ejemplo demuestra otro método de almacenamiento y crioconservación de linfocitos NK. Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas del perfundido placentario humano (PPH) y las células sanguíneas del cordón umbilical aumentaron y se diferenciaron en linfocitos NK usando los protocolos descritos anteriormente. Las células se crioconservaron inmediatamente después de aislarse de PPH y sangre de cordón umbilical (el día 0) o durante la primera fase de crecimiento de los linfocitos NK (el día 9, día 14, día 21 o día 35 después del aislamiento).

Se preparó una solución de suspensión celular combinando Dextran-40 y ASH en la proporción de 60% v/v de Dextran-40, 40% de ASH (a partir de una solución al 25%) v/v).

Se preparó una solución de congelación 2x con 50% de Dextran-40 v/v, 40% de ASH (solución al 25%) v/v y 10% de DMSO v/v. Se agregó DMSO en primer lugar lentamente al Dextran-40 y se mezcló bien. Posteriormente, se añadió a la solución lentamente con mezcla una solución al 25% de ASH. La solución resultante se mezcló bien y se llevó a temperatura ambiente antes de su uso.

Procedimiento de crioconservación

El número de células se estimó y normalizó como una suspensión celular a 15×10^6 en solución de suspensión celular. Se determinó el volumen de la suspensión celular y se añadió lentamente un volumen igual de 2x solución de congelación recién preparada y se mezcló. El volumen final de la suspensión celular en la solución de congelación se registró y se distribuyó en varios viales. Se realizó la prueba de MycoAlert en sobrenadantes de cultivo guardados para detectar contaminación del micoplasma. Se realizó una prueba después de la descongelación en un vial de retención para determinar la viabilidad después de la descongelación, la recuperación celular y la caracterización celular.

7.12. Ejemplo 12: Análisis de linfocitos NK crioconservados/descongelados

Ensayo de viabilidad. Se descongelaron linfocitos NK crioconservados en diversas formulaciones como en el ejemplo 10 u 11. Las células se congelaron a la densidad de 2×10^6 - 3×10^7 células/ml. Se evaluó la viabilidad celular de linfocitos NK descongelados usando el contador de células automático Countess® (Invitrogen) los días 0, 3 y 18 después de la descongelación en comparación con células frescas o células precongeladas. En resumen, se mezclaron 10 µl de muestras de células con 10 µl de azul de tripano. Las mezclas de células se pipetearon en el portaobjetos de la cámara Countess®. El portaobjetos se insertó en el instrumento y se contaron las células. Las células después de congelación-descongelación presentaban una viabilidad celular de aproximadamente 80% a más de 90% de viabilidad, dependiendo de diferentes formulaciones de crioconservación.

Ensayo de Apoptosis. También se evaluó la apoptosis en linfocitos NK descongelados usando el equipo de ensayo Apoptosis BD AnnV/PI los días 0, 3 y 18 después de la descongelación. En resumen, se lavaron las células dos veces con 1x PBS frío y se volvieron a poner en suspensión en 1x tampón de unión (Equipo de Apoptosis BD Annexin V/PI número de pieza 556547 Composición del tampón de unión número de pieza 51-66121E HEPES 0,1 M/NaOH (pH 7,4), NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM. Para 1 × diluir 1 parte de tampón 10x para 9 partes de agua destilada). Se transfirieron 100 µl de suspensión celular que contenía aproximadamente 100.000 células a un tubo FACS. Se añadieron al tubo 100 µl de 1x tampón de unión, 5 µl de AnnV-FITC y 5 µl de PI-PE. El tubo se agitó en remolino suavemente y se incubó en la oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µl de tampón de unión 1x. Las muestras se analizaron en 1 hora. Las referencias utilizadas para configurar los cuadrantes y las entradas fueron células no teñidas, células teñidas solo con AnnV-FITC y no con PI, células teñidas solo con PI y no con AnnV. Las células apoptóticas se cuantificaron como un % de la población de casos seleccionados como "células" en el gráfico de dispersión de tamaño (FSC frente a SSC). Las células después de congelación-descongelación mostraron aproximadamente 5-25% de células apoptóticas muertas/fallecidas y 10-25% de células apoptóticas prematuras, dependiendo de diferentes formulaciones de crioconservación. En general, la formulación 1 (5% de DMSO, 55% de dextrano (10% p/v en solución salina normal), 40% de HAS), la formulación 2 (5% de DMSO, 55% de trehalosa (10% p/v en solución salina normal), 40% de ASH), la formulación 4 CryoStor® CS5 (BioLife Solutions) y la formulación 5 (CryoStor®CS10 (BioLife Solutions)) presentaban una viabilidad celular más alta y menos células apoptóticas en comparación con otras formulaciones.

7.13. Ejemplo 13: Evaluación del banco celular crioconservado en el proceso

Este ejemplo demuestra la evaluación del banco celular crioconservado en el proceso. El cultivo celular se inició con células CD34⁺ de UCB usando el método descrito por Spanholtz *et al.*, PLoS One. 5(2):e9221 (2010) usando HS-AB o FBS como fuente de suero. La concentración celular se determinó y ajustó, y el medio se repuso a medida que se

necesitaba. El día 7, 9, 10 o 14, se eliminaron aproximadamente $10^6 - 3 \times 10^6$ células del cultivo celular, se centrifugaron y se volvieron a poner en suspensión en medio de crioconservación (5,5% v/v de dextrano-40, 10% v/v de ASH, 5% v/v de DMSO). Las células se congelaron en un congelador de velocidad controlada y se transfirieron a un almacenamiento de nitrógeno en fase líquida para crioconservación. Aproximadamente 1 ml de células de cada vial se crioconservaron a una concentración que oscila entre 10^6 y 10^7 por ml. El cultivo restante se llevó adelante al criterio de valoración (día 35), denominado "reciente (sin crioconservación en el proceso)". Los análisis fenotípicos se realizaron los días 21, 28 y 35 del cultivo celular. La funcionalidad *in vitro* (citotoxicidad de K562, 10:1 E:T) se evaluó el día 35 (criterio de valoración) del cultivo.

El rendimiento después de la descongelación de las muestras de cultivo crioconservado en proceso (días 9 y 14) se evaluó de la manera siguiente. Los viales del banco de células se descongelaron rápidamente en el baño de agua a 37°C. Las células se diluyeron a continuación con medio RPMI-FBS, se centrifugaron, se volvieron a poner en suspensión y se sembraron en medios de cultivo. Cada una de las condiciones de cultivo se llevaron adelante después hasta el día 35, acumulativo desde el inicio del proceso de cultivo. Se hicieron análisis (recuento de células, viabilidad, análisis fenotípico, evaluación de la funcionalidad) de la misma manera que su homólogo "reciente".

Resultados

Todas las muestras crioconservadas en proceso los días 9, 10 y 14 produjeron excelente viabilidad después de la descongelación, independientemente del momento en el proceso o la concentración celular (96,2% -97,3% Trypan Blue negativo, 86,1% -93,2% Annexin-V negativo/TO-PRO-3 negativo). El banco en proceso no tuvo efectos negativos sobre la pérdida de rendimiento al final del cultivo (día 35). El rendimiento celular final entre el día 9 o 14 después de la descongelación y las condiciones "recientes" son comparables, con HS-AB o HS-AB como fuente de suero.

Se encontró que los perfiles fenotípicos de los linfocitos NK en maduración en momentos de los días 21/28/35 eran perfectamente comparables entre los cultivos "reciente" y "después de la descongelación", respectivamente. La pureza fenotípica (CD56⁺CD3⁻) resultó ser comparable también. La expresión de determinados marcadores funcionales de NK (CD94, NKG2D) fue ligeramente diferente debido a las variabilidades entre distintas series.

En el ensayo de citotoxicidad de K562, los días 9/14 los linfocitos NK cultivados después de la descongelación se descubrió que producen ~ 0-20% de lectura de lisis de K562 específica más baja en comparación con los linfocitos NK cultivados crioconservados no en proceso. Sin embargo, dado que los niveles de expresión de marcadores de superficie relevantes para la función citotóxica de NK (DNAM1, NKp46, NKG2D, etc.) no se redujeron simultáneamente, la tendencia necesitaría confirmarse con más donantes y repeticiones del ensayo. En general, la crioconservación en proceso los días 9/14 de cultivo tuvo un impacto mínimo en el resultado del proceso.

7.14. Ejemplo 14. Desarrollo del medio después de la descongelación para la administración de linfocitos NK.

Este ejemplo demuestra el desarrollo del medio después de la descongelación para la administración de linfocitos NK en animales. Los efectos de los medios inyectables y la densidad celular se probaron en la viabilidad de los linfocitos NK, la citotoxicidad, la recuperación celular y la formación de aglomerados. La viabilidad se evaluó mediante tinción con azul de tripano; la citotoxicidad se evaluó por FACS (relación 10:1 de NK:K562) y la formulación de aglomerados se evaluó por análisis microscópico. Los resultados se muestran en las tablas 9-12 para los diversos tipos de medios inyectables y densidad celular.

Tabla 9. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: RPMI + 10% de FBS; Medio inyectable: PBS +1% de FBS; Densidad celular: 10×10^6 células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	98,8%				
Viabilidad	74,3%	69,0%	66,1%	63,3%	62,4%
Citotoxicidad		60,3%		44,3%	
Aglutinación	ninguna				

Tabla 10. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: RPMI + 10% de FBS; Medio inyectable: PBS +1% de FBS; Densidad celular: 30×10 ⁶ células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	98,8%				
Viabilidad	74,3%	69,8%	66,5%	64,0%	63,6%
Citotoxicidad		51,8%		37,9%	
Aglutinación	ninguna				

5 Tabla 11. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: RPMI + 10% de FBS; Medio inyectable: Plasmalyte +1% de ASH; Densidad celular: 10×10 ⁶ células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	98,8%				
Viabilidad	74,9%	76,3%	72,0%	70,5%	69,4%
Citotoxicidad		59,4%		51,3%	
Aglutinación	ninguna				

10 Tabla 12. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: RPMI + 10% de FBS; Medio inyectable: Plasmalyte +1% de ASH; Densidad celular: 30×10 ⁶ células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	98,8%				
Viabilidad	74,9%	74,7%	71,2%	70,3%	69,9%
Citotoxicidad		61,2%		53,9%	
Aglutinación	ninguna				

15 Los resultados demostraron que los medios inyectables Plasmalyte + 1% de ASH mantenían los linfocitos NK con mejor viabilidad y citotoxicidad que los medios inyectables PBS + 1% FBS. La citotoxicidad también disminuyó con el tiempo una vez que las células se pusieron en suspensión en los medios inyectables. No se observó ningún efecto de densidad celular en la viabilidad y la citotoxicidad cuando las células se pusieron en suspensión en Plasmalyte + 1% de ASH. Los linfocitos NK también sedimentaron en los medios PBS + 1% de FBS o Plasmalyte + 1% ASH después de 1 hora; sin embargo, las células no parecían agregarse. Por último, no se observó una pérdida obvia de recuperación y viabilidad celular del proceso de congelación-descongelación.

20 7.15. Ejemplo 16: Desarrollo de medio después de la descongelación para administración de linfocitos NK

25 También se probaron los efectos de varias concentraciones de ASH sobre la viabilidad, la citotoxicidad, la recuperación celular y la formación de aglomerados de linfocitos NK. Se utilizaron los mismos métodos del ejemplo 19. Los resultados se muestran en las tablas 14-16 para los diversos tipos de medios inyectables y densidad celular.

Tabla 13. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: RPMI + 10% de FBS; Medio inyectable: Plasmalyte +1% de ASH; Densidad celular: 10×10 ⁶ células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	82,0%				
Viabilidad	75,6%	75,3%	74,5%	71,8%	71,5%
Citotoxicidad		64,4%		35,5%	
Aglutinación	ninguna				

30

Tabla 14. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: Plasmalyte +1% de ASH; Medio inyectable: Plasmalyte +1% de ASH; Densidad celular: 10×10^6 células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	102,4%				
Viabilidad	77,1%	77,5%	71,2%	72,4%	75,1
Citotoxicidad		61,48%		31,7%	
Aglutinación	ninguna				

5 Tabla 15. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: Plasmalyte +2,5% de ASH; Medio inyectable: Plasmalyte +2,5% de ASH; Densidad celular: 10×10^6 células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	91,6%				
Viabilidad	83,9%	82,6%	78,9,0%	79,0%	79,3
Citotoxicidad		71,7%		46,8%	
Aglutinación	ninguna				

10 Tabla 16. Recuperación celular, viabilidad, citotoxicidad y formación de aglomerados de condiciones específicas probadas

Medio de descongelación: Plasmalyte + 5% de ASH; Medio inyectable: Plasmalyte + 5% de ASH; Densidad celular: 10×10^6 células/ml					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Recuperación celular	81,2%				
Viabilidad	81,8%	80,7%	78,2%	78,3%	78,6
Citotoxicidad		64,8%		55,1%	
Aglutinación	ninguna				

15 Los resultados demuestran que la viabilidad se mantuvo mucho más de 4 horas después de la descongelación en los tres medios inyectables probados. Además, la citotoxicidad disminuyó con el tiempo en los tres medios inyectables. Sin embargo, el nivel de reducción fue menor en concentraciones más altas de ASH mientras que Plasmalyte + 5% ASH mantuvo la citotoxicidad más alta. También se observó que los linfocitos NK no se agregaban en los tres medios inyectables. En general, Plasmalyte parece ser un mejor candidato a medio inyectable que PBS.

20 7.16. Ejemplo 17: Cultivo de linfocitos NK sin IL-2

Este ejemplo demuestra el cultivo de linfocitos NK en ausencia de IL-2. El cultivo celular se realizó mediante el proceso en dos etapas descrito en el ejemplo 11. Se ensayaron cinco concentraciones diferentes de IL-2 en el primer medio: 0, 200, 500, 1000, 2000 U/ml.

25 Los resultados indican que el desarrollo de linfocitos NK en el cultivo no parecían responder a IL-2 en crecimiento. La pureza de los linfocitos NK no parecía depender de IL-2: los linfocitos NK se diferencian en el fenotipo $CD56^+CD3^-$ en ausencia de IL-2. La combinación de IL-7, IL-15 y SCF parecía ser suficiente para el desarrollo de linfocitos NK *in vitro*.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método en dos etapas *in vitro* para producir una población de linfocitos citolíticos naturales (NK) activados, que comprende:
- 5 (a) sembrar una población de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un primer medio que comprende interleucina-15 (IL-15), ligando tirosina cinasa 3 tipo Fms (Flt3-L), trombopoyetina (Tpo), factor de células madre (SCF) e interleucina-7 (IL-7), en donde dichos IL-15, SCF e IL-7 no están comprendidos dentro de un componente indefinido de dicho medio, de modo que la población aumenta, y un gran número de células madre o progenitoras hematopoyéticas dentro de dicha población de células madre o progenitoras hematopoyéticas se diferencian en linfocitos NK durante dicho aumento; y
- 10 (b) aumentar las células de la etapa (a) en un segundo medio que comprende interleucina-2 (IL-2), para producir una población de linfocitos NK activados;
- en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas son CD34⁺.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el primer medio además comprende interleucina-2 (IL-2) o heparina.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el primer medio además comprende suero bovino fetal o suero humano.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el SCF está presente a una concentración de 1 a 150 ng/ml en el primer medio.
- 20 5. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el Flt3-L está presente a una concentración de 1 a 150 ng/ml en el primer medio.
6. El método de la reivindicación 2, en donde la IL-2 está presente a una concentración de 50 a 1.500 UI/ml en el primer medio.
7. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la IL-7 está presente a una concentración de 1 a 150 ng/ml en el primer medio.
- 25 8. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la IL-15 está presente a una concentración de 1 a 150 ng/ml en el primer medio.
9. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde la Tpo está presente a una concentración de 1 a 150 ng/ml en el primer medio.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, en donde la IL-2 en la etapa (b) está presente a una concentración de 50 a 1.500 UI/ml en el segundo medio.
11. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el segundo medio además comprende células sustentadoras.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho segundo medio además comprende uno o más de entre suero de ternero fetal (FCS), transferrina, insulina, etanolamina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico, albúmina de suero bovino (ASB) y fitohemaglutinina.
- 35 13. El método de la reivindicación 1, en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas comprenden células madre o progenitoras hematopoyéticas de perfundido placentario humana y células madre o progenitoras hematopoyéticas del cordón umbilical, en donde dicho perfundido placentario y dicha sangre del cordón umbilical son de la misma placenta.
14. El método de la reivindicación 1, en donde los linfocitos NK son CD3⁺CD56⁺CD16⁻.
- 40 15. El método de la reivindicación 14, en donde los linfocitos NK son además CD94⁺CD117⁺, CD161⁻, NKG2D⁺, NKp46⁺ o CD226⁺.

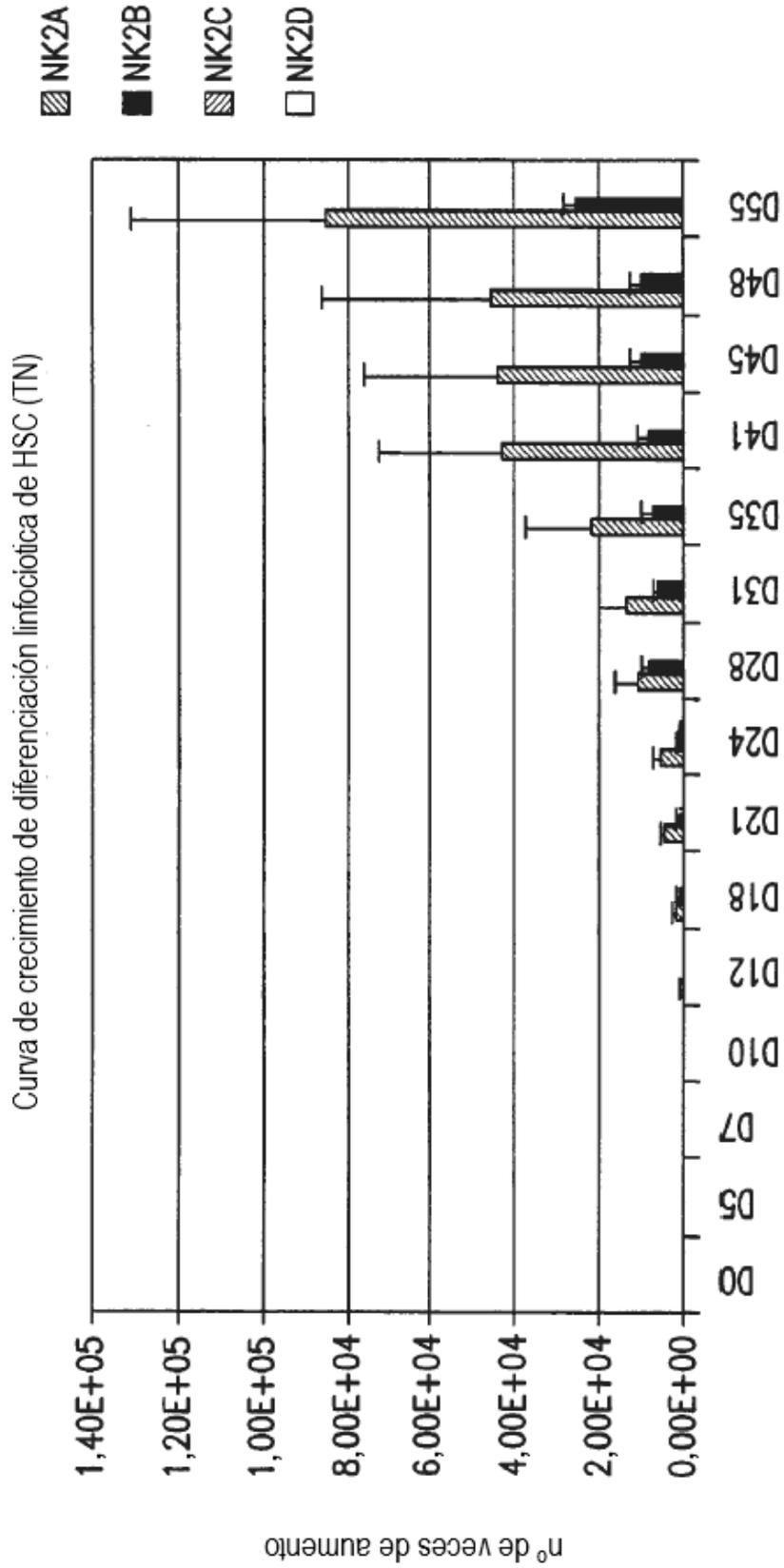


FIG. 1

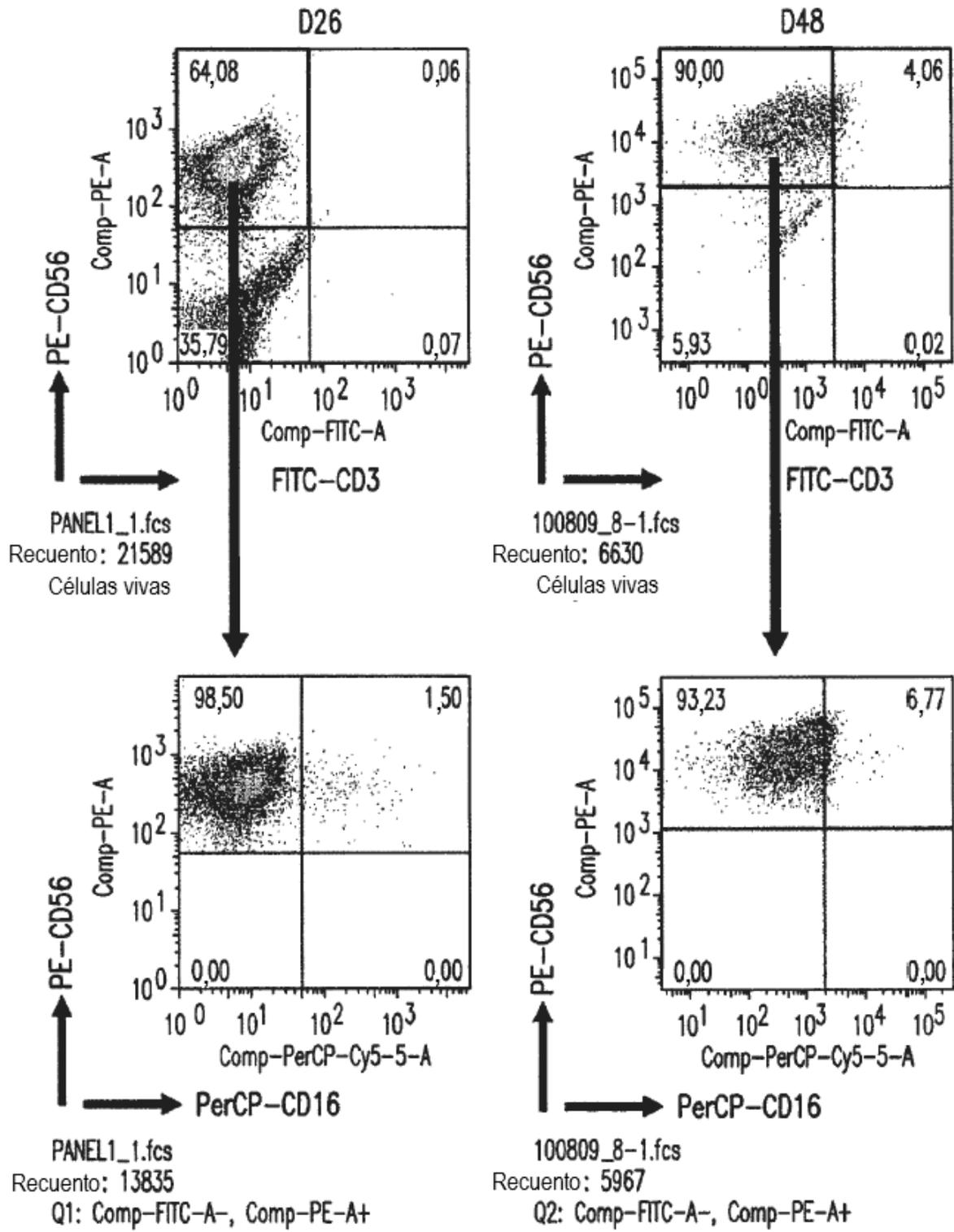


FIG. 2

Curva de crecimiento (Donante 1)

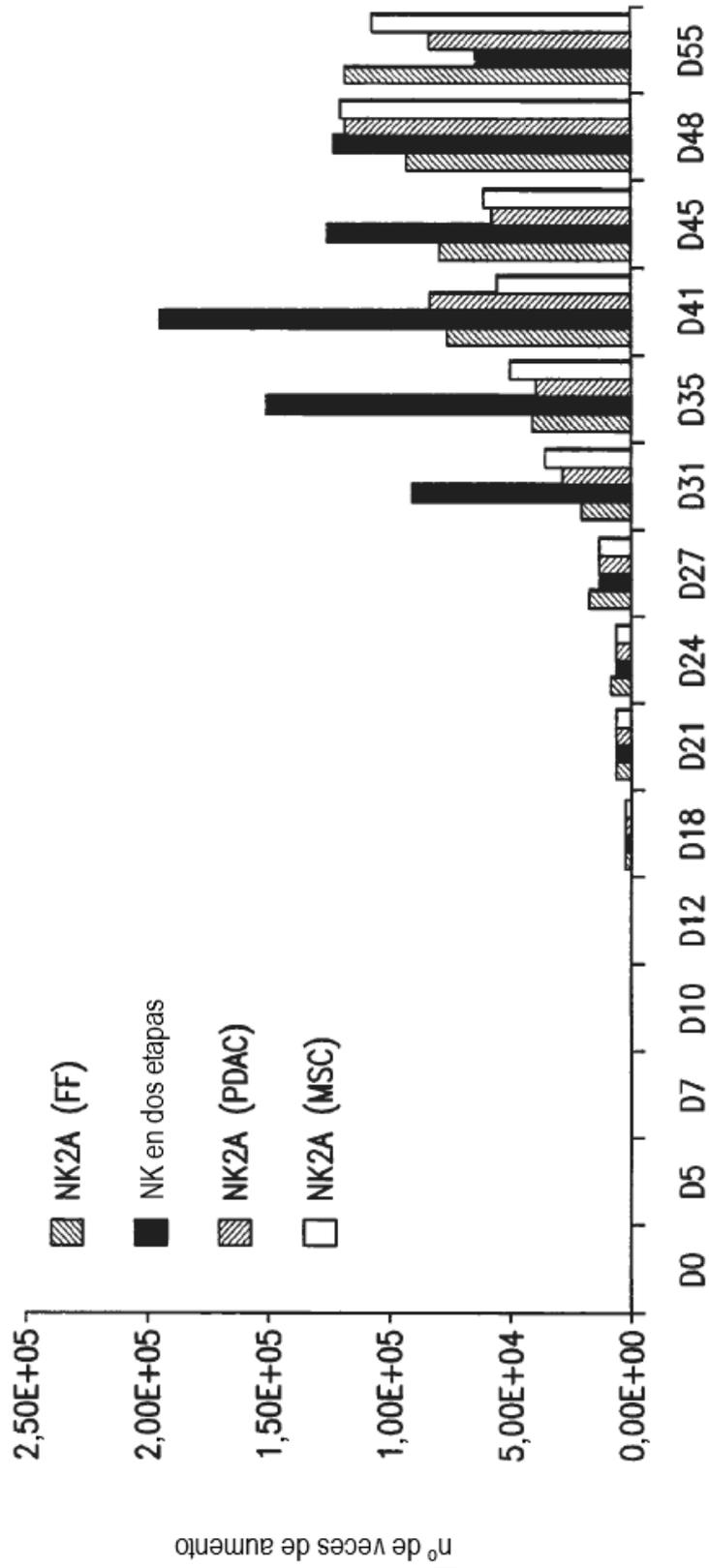


FIG. 3

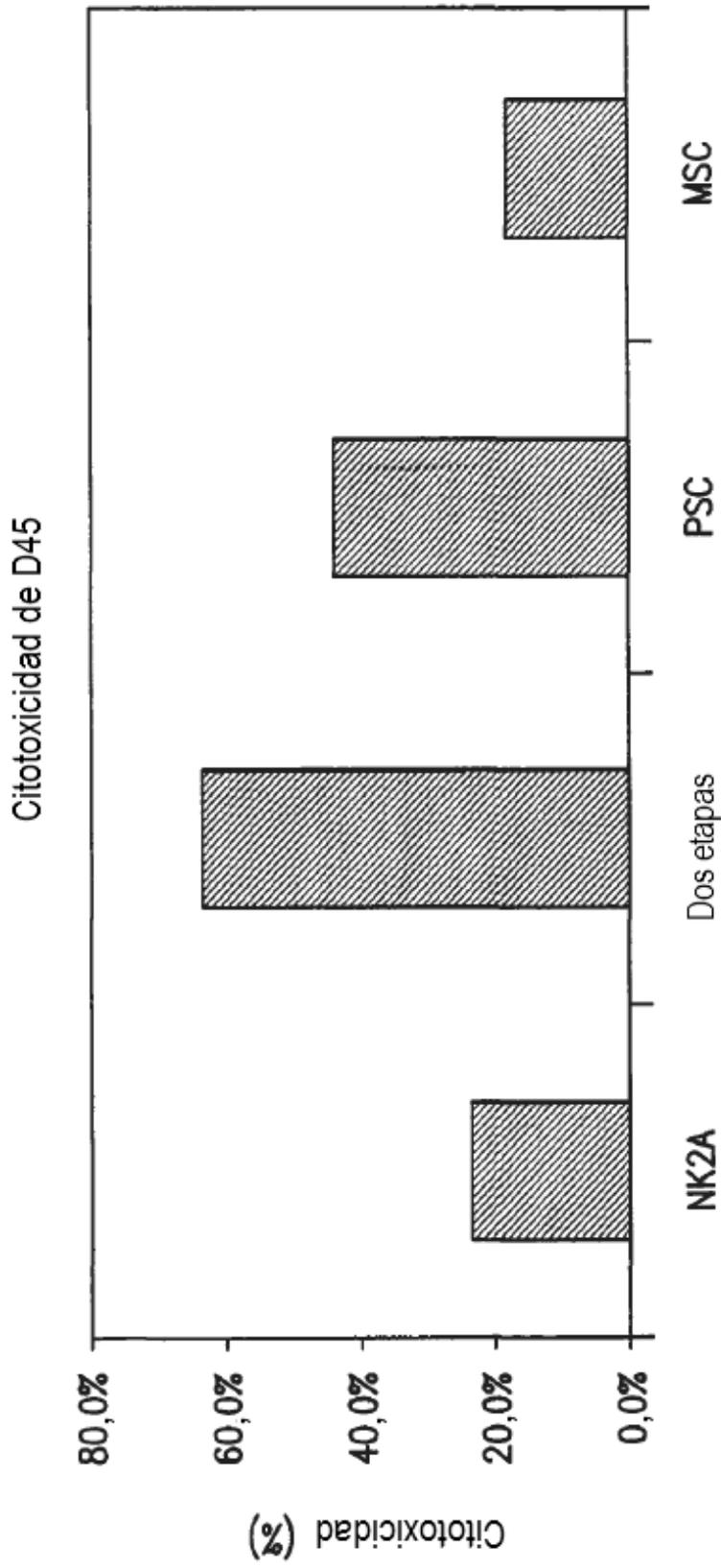


FIG. 4

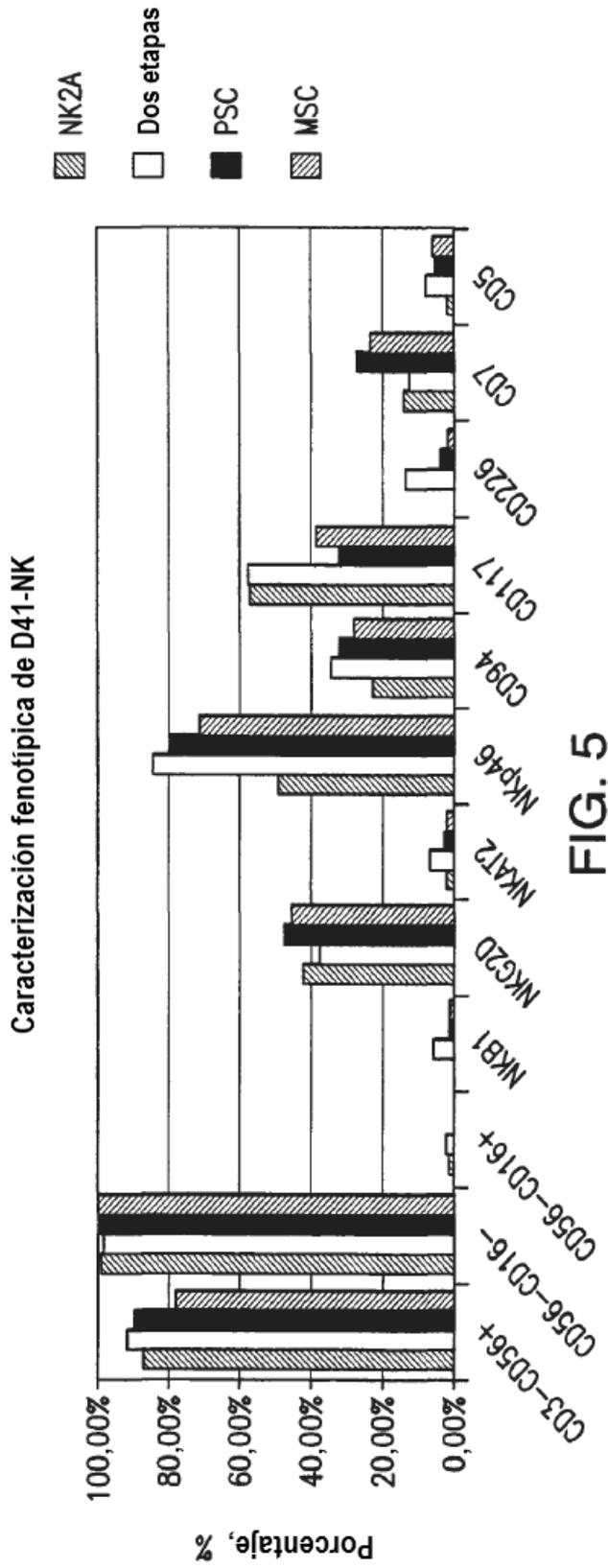


FIG. 5

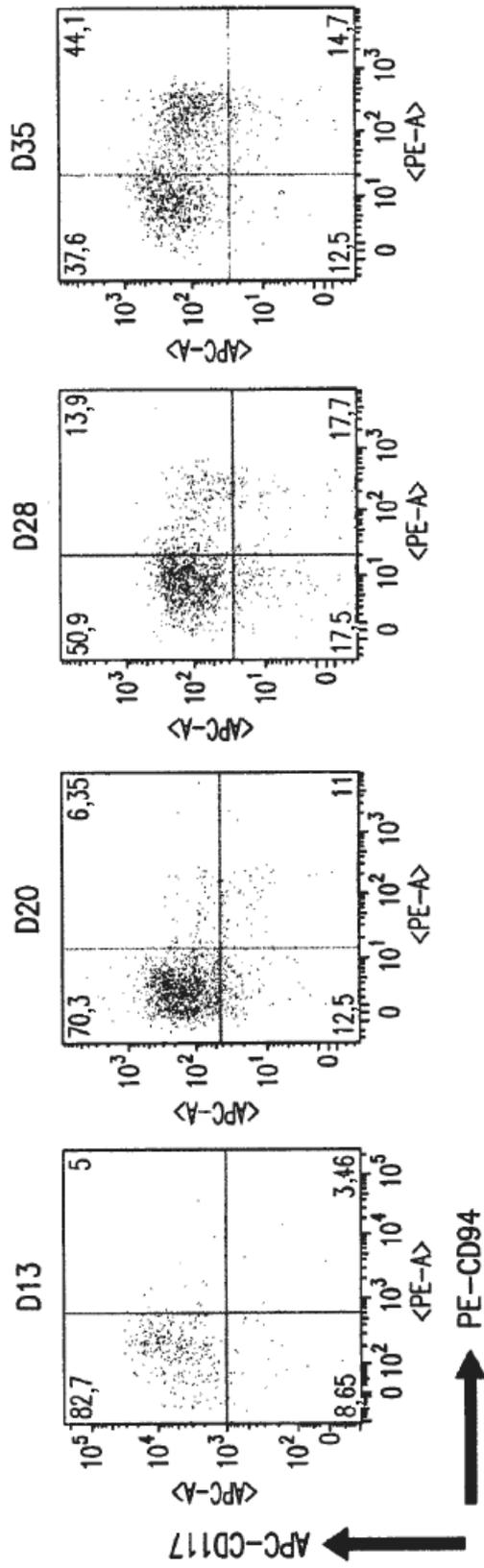
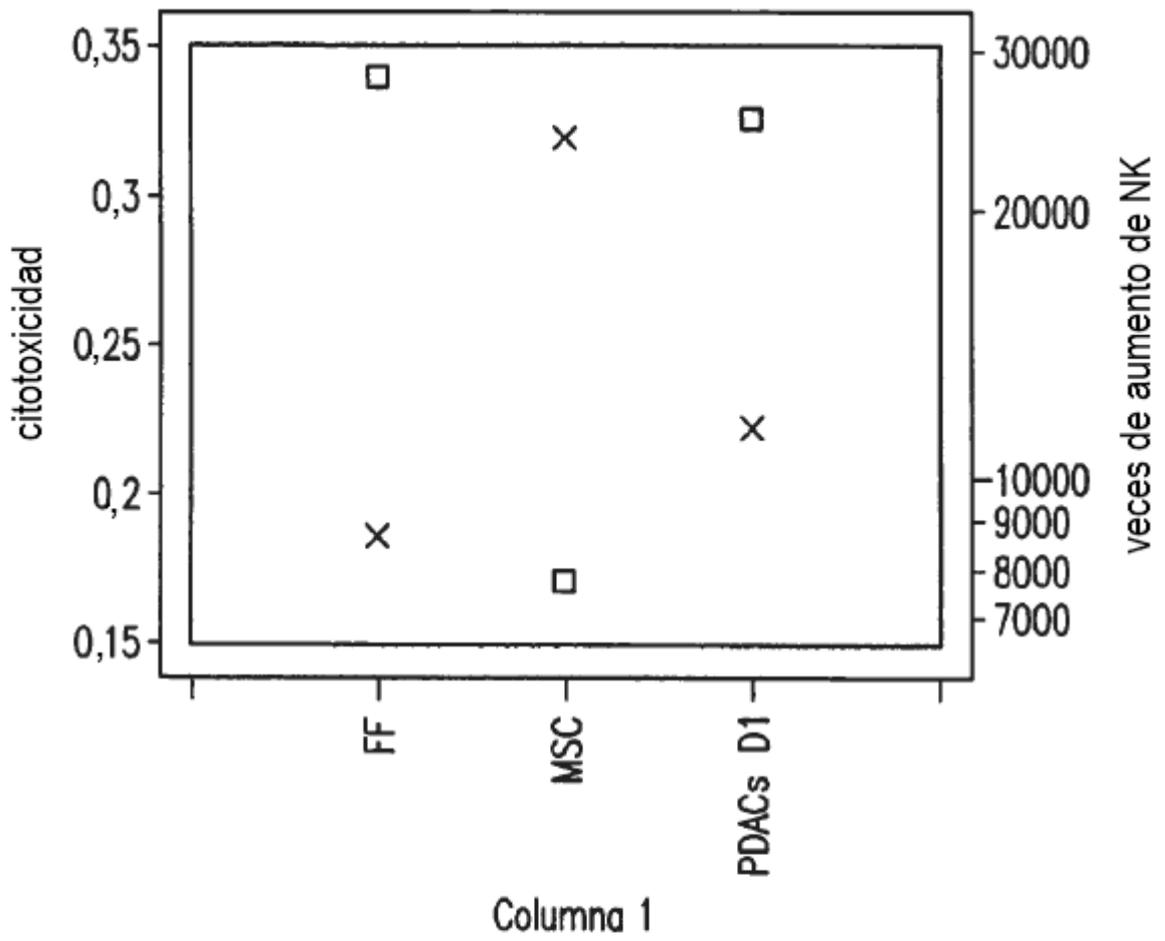


FIG. 6



Escala izquierda: □ citotoxicidad

Escala derecha: × veces de aumento de NK

FIG. 7

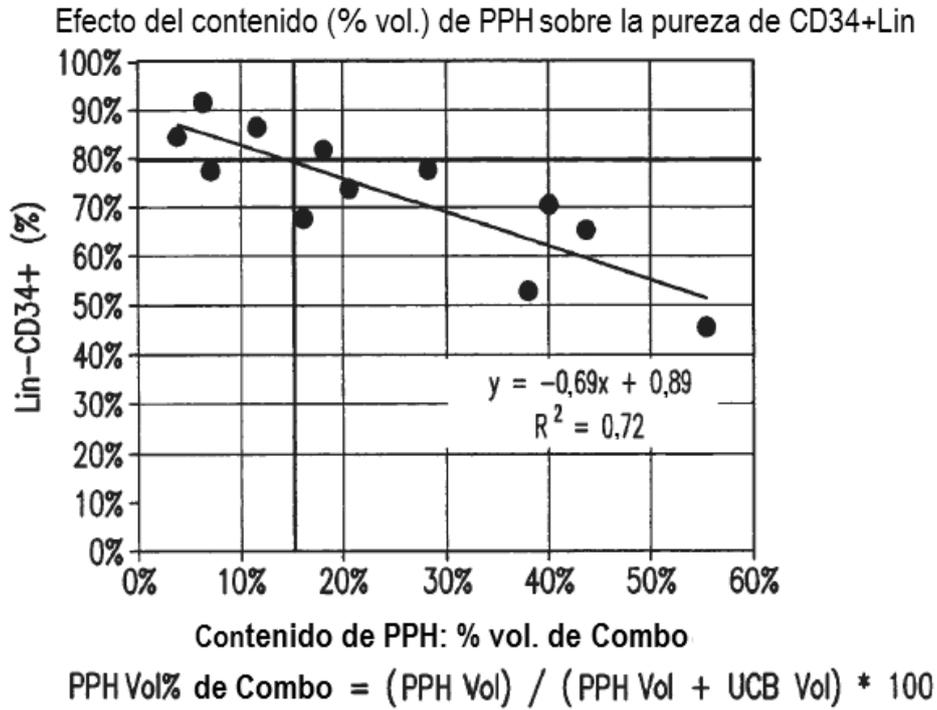


FIG. 8A

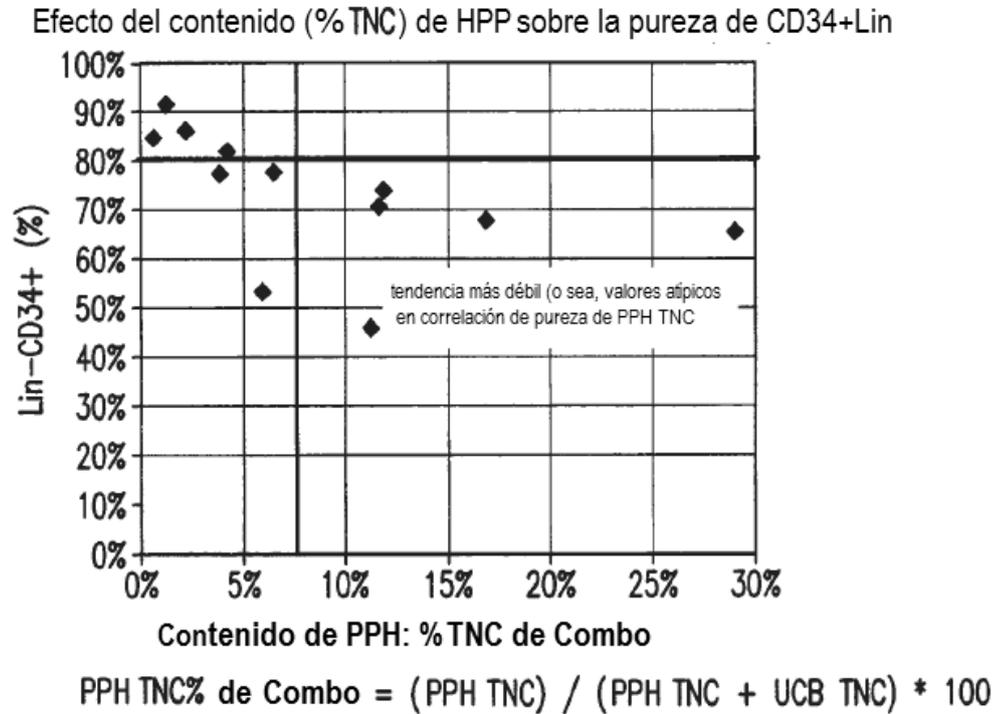


FIG. 8B