

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 169**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010 PCT/SE2010/050333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10110734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10756430 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2411507**

54 Título: **Expansión de células NK**

30 Prioridad:

26.03.2009 US 163590 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**CELLPROTECT NORDIC PHARMACEUTICALS
AB (100.0%)
Hildebergsvägen 6
117 62 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

ALICI, EVREN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 763 169 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

Expansión de células NK

Campo técnico

5 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación se refiere a cultivos de células e inmunoterapia, en particular, a la expansión a gran escala y activación simultánea de células NK y linfocitos T de tipo NK para usos terapéuticos. Las células se expanden en un sistema de cultivo automatizado cerrado, por ejemplo, mediante el uso de un biorreactor.

Antecedentes de la invención

10 El uso de inmunoterapia celular contra el cáncer ha sido investigado a fondo desde la introducción de las células linfocíticas activadas por linfoquinas (LAK) a mediados de la década de 1980 (**Grimm EA.** y col., **1982**; **Rosenberg S., 1985**).

15 Uno de los enfoques más experimentados ha sido la transferencia adoptiva de efectores citotóxicos alogénicos o autólogos con potencial citolítico de células de tumor para desencadenar un efecto injerto-contra-tumor (GvT). Entre las diversas poblaciones de efectores que tienen un posible efecto anti-tumor, las células citolíticas naturales (NK) y los linfocitos T de tipo NK destacan por su alta capacidad citotóxica (**Sutlu T y Alici E., 2009**).

20 Las células NK y T de tipo NK están presentes normalmente solamente en un bajo número en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las preparaciones de células efectoras, como las células LAK. Por lo tanto, se han desarrollado procedimientos que implican componentes en conformidad con las buenas prácticas de fabricación actuales (BPFa) que permiten la expansión de células NK policlonales y linfocitos T de tipo NK en matraces de cultivo de células utilizando PBMC de donantes sanos (**Carlens S.** y col., **2001** y el documento US 10/242.788), así como pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (**Guyen H.** y col., **2003**), y mieloma múltiple (MM) (**Alici E.** y col., **2008**). Se ha demostrado que estas células ejercen actividad citotóxica específica contra células de tumor humano frescas y en modelos experimentales de tumores humanos (**Guimaraes F.** y col., **2006**) lo cual abre la posibilidad de evaluarse en situaciones clínicas. Sin embargo, el cultivo en matraz convencional es laborioso y complicado, por lo que limita el número de células que se pueden manejar en la práctica.

25 Los protocolos desvelados anteriormente (p.ej., **Miller JS.** y col., **1994**; **Pierson BA.** y col., **1996**; **Luhm J.** y col., **2002**; **Klingermann HG** y **Martinson J., 2004**) dirigidos a la preparación de células efectoras también incluyen etapas como separación de precursor de NK o CD56 antes del cultivo y el uso de células alimentadoras o componentes incompatibles con las BPFa. Estas desventajas hacen que los protocolos anteriores estén por debajo de ser óptimos y no son viables para dar soporte a estudios clínicos grandes.

30 Asimismo, la expansión de células NK en matraces de cultivo de células presenta el riesgo inherente de la exposición a agentes externos y contaminación. Si bien el riesgo se reduce al mínimo en entornos de laboratorios BPFa, el uso de sistemas automatizados cerrados es preferente definitivamente ya que suministra cantidades suficientes de células.

35 Dado que las células hematopoyéticas son relativamente sensibles al cizallamiento, es razonable asumir que procedimientos de alta cizalla son inconvenientes para la expansión *ex vivo* (**Nielsen, 1999**). Siendo así, es improbable que los biorreactores de tanque en agitación (**Pierson.** y col., **1996**) o los sistemas de cultivo de perfusión, que se basan en filtros externos y un alto caudal, proporcionen una alta eficiencia.

40 Existen muchos enfoques prometedores para el tratamiento de cáncer con inmunoterapia basada en células NK y linfocitos T de tipo NK. Sin embargo, la expansión *ex vivo* y la activación de estas células efectoras en virtud de sistemas cerrados compatibles con las BPFa son factores cruciales para facilitar un uso clínico frecuente.

45 Asimismo, otros investigadores también han realizado tentativas de expandir y/o activar células NK *ex vivo* y se han investigado las opciones de tratamiento utilizando células NK purificadas/en reposo, altamente purificadas o a corto plazo y activadas a largo plazo. Estos estudios han notificado que las infusiones de células NK se toleran perfectamente y son parcialmente eficaces. No obstante, los protocolos utilizados para la preparación de células efectoras incluyen por lo general etapas adicionales, tales como la separación de precursores de NK o CD56 antes del cultivo y el uso de células alimentadoras y/o componentes incompatibles con las BPFa. Estas desventajas hacen que los protocolos estén por debajo de ser óptimos para la producción BPFa y no son viables para dar soporte a estudios clínicos grandes.

50 Una evaluación exhaustiva de los informes mencionados demuestra la necesidad de un procedimiento automatizado para la expansión *ex vivo* optimizada de células NK. Un problema asociado a los cultivos en matraz convencionales tiene que ver con el aumento a escala, es decir, el número de células está limitado debido al complicado manejo de los matraces. Además, el riesgo de infecciones es bastante alto, ya que el sistema está expuesto al entorno cada vez que se cambian los medios o se dividen las células. Otros problemas que hay que resolver están relacionados con el desarrollo de un procedimiento para la expansión de células efectoras que sea rentable, fácil de manejar y

55

que incluya unos componentes de calidad BPFa bien definidos. Preferentemente, el sistema de cultivo también está desprovisto de productos animales y células alimentadoras.

Carswell y col. (2000, *Biotechnol. Bioeng.*, 68: 328-338) se refiere al cultivo de linfocitos T humanos en biorreactores en agitación para aplicaciones de inmunoterapia celular.

5 Meehan y col. (2008, *Cytotherapy*, 10: 30-37) se refiere a un modelo clínico para expansión *ex vivo* de múltiples poblaciones de células efectoras para terapia celular adoptiva.

Hillman y col. (1994, *Cell Transplant.*, 3:263-271) se refiere a la expansión de linfocitos activados obtenidos de carcinoma de células renales en un biorreactor hueco automatizado.

10 Hillman y col. (1992, *Biotherapy*, 5:119-129) es un artículo de revisión acerca de la inmunoterapia adoptiva y el desarrollo y futuro de los procedimientos de inmunoterapia contra el cáncer.

Knazek y col. (1990, *J. Immunol. Methods*) se refiere a un procedimiento para cultivar linfocitos infiltrantes de tumor humano en biorreactores de fibra huecos.

Sumario de la invención

15 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación se refiere a un sistema cerrado para la expansión y activación simultánea de células citotóxicas naturales (NK) y linfocitos T de tipo NK, para su uso como productos de terapia celular. En particular, la invención desvela un procedimiento para la expansión a gran escala y activación simultánea a gran escala de células NK con el fenotipo CD3⁻ CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺ tal como se define en las reivindicaciones, en el que las células expandidas presentan una mayor citotoxicidad en comparación con las células cultivadas utilizando procedimientos convencionales, como matraces, en las mismas condiciones o en condiciones similares. El procedimiento de la invención se desvelará con más detalle en la descripción, los ejemplos no exhaustivos y en las reivindicaciones.

20 Los autores de la invención han investigado la viabilidad de la expansión de células NK a gran escala utilizando sistemas cerrados. Se han evaluado dos sistemas cerrados diferentes (bolsas de cultivo de células y un biorreactor automatizado) en comparación con los matraces de cultivo de células convencionales con el uso de PBMC de donantes sanos y pacientes con MM, con el objeto de desarrollar un protocolo compatible con BPFa automatizado que permite la producción a gran escala de células NK para su uso en inmunoterapia.

25 Los autores de la invención han completado con éxito a la vez una evaluación segura de este producto celular en una situación alogénica en un ensayo clínico en fase I con pacientes con cáncer (**Barkholt L. y col., 2009**).

30 En el presente documento se describe un procedimiento para la expansión a gran escala y se proporciona la activación simultánea de ciertos tipos de células, en el que se utiliza un sistema de cultivo de células cerrado y en el que las células expandidas obtenidas según dicho procedimiento presentan una mayor citotoxicidad, tal como se determina a través de pruebas de citotoxicidad *in vitro*. Preferentemente, los tipos de células son células citotóxicas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁻CD56⁺ y/o linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺CD56⁺.

35 De acuerdo con una divulgación, el procedimiento comprende las etapas de adición de dichas células a dicho sistema cerrado que comprende un medio de crecimiento suplementado con suero, interleuquina-2 (IL-2) y anticuerpos anti-CD3; la expansión de dichas células dentro de dicho sistema con agitación y el calentamiento hasta que: al menos un 35 % de la población de células expandidas comprende células NK y linfocitos T de tipo NK activados, y dichas células expandidas presentan una mayor citotoxicidad, tal como se determina en las pruebas de citotoxicidad *in vitro*.

40 De acuerdo con una realización del procedimiento descrito, se selecciona el suero del grupo que consiste en suero humano y suero autólogo. El medio se suplementa con aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 U/ml de IL-2, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 y aproximadamente 1 a aproximadamente 40 % de suero.

45 La agitación y el calentamiento, de acuerdo con otra realización, se realizan en las siguientes condiciones: una temperatura de aproximadamente 36 – 40 °C; una concentración de CO₂ de aproximadamente 4,7 - 5,1 %; y un balanceo suave a una velocidad y un ángulo que permita que las células se adhieran a la superficie del sistema de células cerrado. El balanceo se realiza a una velocidad de balanceo de aproximadamente 4-8/min y a un ángulo de balanceo de aproximadamente 4-8 °.

50 La expansión se realiza preferentemente hasta que el número total de células se ha expandido al menos aproximadamente 10 veces más o hasta que al menos aproximadamente 50 % de la población de células expandidas comprende células NK activadas y linfocitos T de tipo NK, respectivamente.

La muestra de células utilizada para expandir dichas células puede ser una muestra de sangre periférica, líneas celulares o sangre periférica estimulada con citoquinas. La muestra de células puede ser una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En una divulgación, la muestra de células se recoge de una persona sana.

5 En una divulgación, la muestra de células se recoge de un enfermo portador de tumor, preferentemente, que tiene un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumores hematológicos y tumores sólidos. En el contexto de la presente invención, las células son de una muestra de sangre periférica de un enfermo portador de tumor. En el grado en que se divulguen otras muestras de células, se incluyen meramente con fines de referencia.

De acuerdo con otra realización, las células consisten predominantemente en células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁻CD56⁺.

La concentración de células que se añade inicialmente al sistema de células cerrado es preferentemente aproximadamente 0,5 x 10⁶ a aproximadamente 2 x 10⁶ /ml de medio de crecimiento.

10 En una realización de la invención, el procedimiento comprende además la etapa de añadir al día un volumen del medio suplementado con suero e IL-2 que corresponde a aproximadamente 50 % del volumen de cultivo total y descartar aproximadamente el mismo volumen de medio de crecimiento/día desde el sistema de células cerrado, en el que dicha etapa se lleva a cabo cuando ha aumentado la densidad celular total con al menos aproximadamente 50 % de la densidad celular inicial.

15 Preferentemente, dicha etapa se lleva a cabo cuando la densidad celular total ha aumentado al menos aproximadamente un 300 % de la densidad celular inicial, pero en la que se cambiado aproximadamente 75 % del volumen de cultivo total.

20 Alternativamente, dicha etapa se lleva a cabo cuando la densidad celular total ha aumentado al menos aproximadamente un 500 % desde la densidad celular inicial, pero en la que ha cambiado aproximadamente un 100 % del volumen de cultivo total.

De acuerdo con otra realización más aún, que se puede combinar libremente con una o más de las realizaciones desveladas, se incuban las células durante al menos aproximadamente 10 días.

De acuerdo con una realización el sistema de células cerrado es una bolsa pre-esterilizada.

De acuerdo con otra realización, el sistema de células cerrado es un biorreactor.

25 En el presente documento se desvela asimismo una suspensión de células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁻ CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺CD56⁺ que presentan una mayor citotoxicidad. La invención proporciona una suspensión de células NK con el fenotipo CD3⁻ CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺ tal como se define en las reivindicaciones, que se puede obtener a través del procedimiento reivindicado.

30 Preferentemente estas células presentan una mayor citotoxicidad, tal como se determina a través de pruebas de citotoxicidad *in vitro*, en comparación con células expandidas en matraces.

En una suspensión de células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁻CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺CD56⁺ de acuerdo con la invención, al menos 35 % y, preferentemente, al menos 50 % de la población de células expandidas, comprende células NK activadas.

35 En el contexto de la presente invención un biorreactor es un sistema de cámara automático reutilizable que puede referirse a cualquier dispositivo o sistema que soporta un entorno biológicamente activo. Dentro del ámbito de la invención descrita, el término biorreactor se refiere a un dispositivo o sistema previsto para cultivar células o tejidos en el contexto de cultivo celular. Un ejemplo no exhaustivo de un sistema de biorreactor es el sistema de biorreactor Wave 2/10 de GE-Healthcare, si bien los expertos en la materia apreciarán que existen biorreactores alternativos disponibles por otras fuentes, o podrán construir un biorreactor en el que se pueda realizar el procedimiento de la presente invención.

40 En el contexto de la presente invención un sistema cerrado es un sistema de cámara de crecimiento celular, que consiste en un sistema en una bolsa de cultivo de células central, en el que se puede hacer proliferar las células de forma eficiente y rápida *ex vivo*, sin ninguna otra etapa más de paso adicional.

45 El término "citotoxicidad" significa la calidad de ser tóxicas las células. Entre los ejemplos de agentes tóxicos se incluyen sustancias químicas o células inmunes como linfocitos citotóxicos como linfocitos T citotóxicos, células NK y linfocitos T de tipo NK. Las células NK y los linfocitos T de tipo NK destacan por su alta capacidad citotóxica.

50 Las personas expertas en la materia pueden determinar la citotoxicidad utilizando procedimientos disponibles. Una forma de determinar si las células presentan una mayor toxicidad es aplicar los análisis *in vitro* de citotoxicidad mediada por células contra células K562 utilizando el ensayo de liberación de Cr⁵¹ de 4 horas convencional. Alternativamente, se puede emplear el ensayo de granulación. Ambos procedimientos se desvelan en los ejemplos adjuntos.

En el contexto de la presente invención, las expresiones “activación” y “células NK activadas” se refieren a células NK que han recibido una señal de activación. Las células NK activadas son capaces de eliminar células con deficiencias en la expresión de MHC clase I.

5 El término “activación simultánea” de células NK y linfocitos T de tipo NK significa que se activan las células sustancialmente de forma simultánea, preferentemente en el mismo cultivo de células.

10 Dada su fuerte actividad citolítica y el potencial para la auto-reactividad, la actividad de linfocito citolítico natural (NK) está ajustadamente regulado. Para eliminar células con una falta de expresión de MHC clase I o una expresión anormal de MHC clase I, han de activarse las células NK. Las células NK deben recibir una señal de activación que puede entrar de diversas formas, siendo las más importantes de ellas las citoquinas, receptores Fc, receptores de activación e inhibidores.

15 En el contenido de la presente invención, la expresión “expansión celular” se refiere al cultivo de células que atraviesan una serie de etapas de división celular y por tanto expanden el número de células presentes en el cultivo. Por lo tanto, la expresión “expansión de células NK” se refiere al cultivo de células NK que atraviesan una serie de etapas de división celular y por tanto expanden el número de células presentes en el cultivo. La expresión “células NK expandidas” se refiere a células NK obtenidas a través de la expansión de célula NK. Más específicamente, en una realización, la expresión “células NK expandidas” se refiere a un grupo policlonal de células CD3⁻ CD56⁺ activadas crónicamente, así como linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺CD56⁺, expandidas en un entorno de calidad BPFa específico y un medio de calidad BPFa.

20 En el contexto de la presente invención el término “célula efectora” se refiere a una célula que realiza una función específica en respuesta a un estímulo, como pueda ser células en el sistema inmune. En una realización, las células efectoras son un tipo de linfocitos que tienen capacidad citotóxica (es decir, inducen la muerte de otras células). Otra realización son linfocitos comprometidos activamente en anticuerpos secretores. Entre los ejemplos no exhaustivos de células efectoras se incluyen células NK, linfocitos T y linfocitos T de tipo NK.

Breve descripción de los dibujos

25 Las Figuras 1 A-D son diagramas en los que se muestra una comparación del número de veces de expansión en matraces y bolsas (1A) y en matraz y biorreactor (1B) y la pureza del producto final en matraz y bolsas (1C) y en matraz y biorreactor (1D).

Las Figuras 2 A-C son diagramas en los que se muestra una comparación de fenotipos (A y B) y actividad citotóxica (C) de las células expandidas tras diferentes protocolos de expansión.

30 Las Figuras 3 A-D son diagramas en los que se muestra la expansión de cultivos celulares iniciados en el biorreactor en comparación con matraces.

Las Figuras 4 A-B son diagramas en los que se muestra la comparación funcional de células expandidas directamente en biorreactores y matraces, respectivamente.

35 La Figura 5 muestra la comparación fenotípica de células NK expandidas directamente en biorreactor y matraces, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

No definiéndose nada más, se pretende que cualquier término y terminología científica utilizada en el presente documento tenga el significado que entienden comúnmente las personas expertas en la materia a la que pertenece la presente invención.

40 Debe advertirse que, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas las formas en singular “un/a” y “el/la” incluyen los referentes en plural a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.

Asimismo, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar una desviación de +/- 2 % el valor dado, preferentemente +/- 5 % y lo más preferentemente +/- 10 % de los valores numéricos, cuando sea aplicable.

45 La expansión *ex vivo* y la reinfusión de células citolíticas naturales (NK) para pacientes afligidos con una enfermedad maligna ofrece un enfoque terapéutico potencialmente interesante y nuevo para combatir dicha enfermedad. Un prerrequisito es la posibilidad de expandir y utilizar células NK que satisfacen las demandas de uso clínico. Los autores de la presente invención han sido capaces sorprendentemente de expandir células NK a gran escala para aplicaciones clínicas, utilizando el procedimiento de la invención. Por tanto, se proporciona un sistema de cultivo cerrado automatizado en conformidad con las BPFa para la preparación poblaciones efectoras enriquecidas con células NK y linfocitos T de tipo NK a gran escala que se puede aplicar en situaciones clínicas.

50 Tal como se demuestra en los ejemplos más adelante, el procedimiento de la invención expande y activa células NK que tienen una capacidad citotóxica satisfactoria (es decir, inducen la eliminación de otras células). La citotoxicidad

de células NK hacia otras células puede medirse fácilmente, por ejemplo, a través del recuento de células tradicional antes y después de la exposición a células NK activas. Dichos procedimientos son muy conocidos entre las personas expertas en la materia.

5 La invención se ilustra con los siguientes ejemplos no exhaustivos. En la medida en el que los Ejemplos contengan materia objeto que se salga del ámbito de las reivindicaciones de la presente invención, se incluye meramente con fines comparativos.

Ejemplos

1. Expansión *ex vivo* de células NK y linfocitos T de tipo NK de sangre periférica

Materiales & Procedimientos

10 Muestreo y aislamiento de células mononucleares de sangre (PBMC)

Se obtuvieron capas leucocíticas, sangre periférica y productos de aféresis de donantes sanos o pacientes MM a través del banco de sangre del Karolinska University Hospital, Huddinge. El Comité de ética en investigación local aprobó el protocolo experimental.

15 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación de gradiente utilizando Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Noruega). Se lavaron PBMC dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) y se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano.

Medio de crecimiento y recuento de células

20 Para todos los sistemas se utilizó medio sin suero CellGro SCGM (CellGenix, Freiburg, Alemania) con la adición de 5 % de suero humano (Biowhittaker-Cambrex, Walkersville, MD, EE.UU.) y 500 U/ml rhIL-2 (Proleukin^R, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, EE.UU.) como medio de cultivo. Al comienzo del cultivo, se suplementó el medio con anticuerpo anti-CD3 monoclonal (Orthoclone OKT-3, Ortho Biotech, Raritan, NJ, EE.UU) a una concentración final de 10 ng/ml. Se evaluó el número de células total tiñendo las células con colorante azul tripano los días 0, 5-6, 9-10, 14-15 y 21 de cultivo. Se evaluaron los productos finales en cuanto a su seguridad, su pureza y su identidad (viabilidad celular y fenotipo). Se calcularon los recuentos de células absolutos multiplicando el número total de células con el porcentaje de estos subconjuntos determinado por citometría de flujo (BD FacsCalibur; BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

Expansión en matraces de cultivo de células

30 Las condiciones de cultivo para la expansión de células citotóxicas en matraces de cultivo de células ha sido optimizada previamente en PBMC de personas sanas (**Carlens S.** y col., **2001**). Brevemente, se cultivaron inicialmente PBMC en matraces T25 (TPP, Trasadingen, Suiza) a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Al cabo de cinco días, se repusieron los cultivos con medio fresco con 5 % de suero humano e IL-2 (500 U/ml), pero sin OKT-3, cada 2-3 días hasta el final del cultivo. Para prevenir la inhibición del contacto del crecimiento de células (**Heiskala M.** y col., **1987**), se transfirieron las células a matraces más grandes (T75 o T150: TPP, Trasadingen, Suiza) o se pasaron a múltiples matraces cuando fue necesario. Durante la reposición del medio, se ajustó la concentración de células a $0,5 \times 10^5$ células/ml hasta el día 10 y a 1×10^6 células/ml tras el día 10. Ocasionalmente, se congelaron ciertas porciones de las células para mantener el número de matraces manejable.

Expansión en el sistema de biorreactor Wave

40 El Biorreactor Wave es un sistema de cultivo de células, en el que se desarrollan las células dentro a una bolsa estéril, desechable, a temperatura y CO₂ controlados, que se coloca en una plataforma calentada oscilante. Los autores de la invención han utilizado un sistema de biorreactor Wave 2/10 (GE Healthcare, Somerset, NJ, EE.UU.). La experiencia anterior de los autores de la invención con este sistema ha demostrado una eficiencia por debajo de la óptima cuando se parte de volúmenes bajos y un número de células reducido. A pesar de ello, la cantidad de células en las muestras de sangre periférica de los donantes no permite el inicio directamente en el biorreactor. Por lo tanto, en los experimentos de optimización iniciales, los autores de la invención partieron de cultivos en matraces y transfirieron las células al biorreactor en torno al Día 5 cuando se alcanzó el número suficiente de células. Los cultivos de biorreactor este día partieron de 2×10^6 células/ml en 800 ml.

50 En los experimentos de validación final, se obtuvo una unidad completa de sangre periférica o producto de aféresis de los donantes y se iniciaron directamente los cultivos en biorreactores a partir del día 0. Las situaciones para el biorreactor fueron las siguientes en todos los casos: Temperatura 37 °C, CO₂: 5 %, flujo de aire: 0.1, velocidad de balanceo: 6/min, ángulo de balanceo: 6 °. Se extrajeron muestras de las células y se hizo el recuento cada día y no se realizó una posterior alimentación hasta que se alcanzó una densidad celular de 3×10^6 células/ml. A partir de entonces en adelante, se alimentó el cultivo con 500 ml de medio al día (50 ml/disparo). Cuando las células alcanzaron una densidad de 6×10^6 células/ml, se alimentó la alimentación a 750 ml/día y después a 1×10^7 células/ml, a 1000 ml/día.

Expansión en bolsas Vuelife™

Vuelife™ (American Fluoroseal Corporation, MD, EE.UU.) es una bolsa de cultivo de células estéril hecha de etileno-propileno fluorado que es inerte biológica, inmunológica y químicamente. Es altamente permeable a los gases y ópticamente transparente. Los cultivos en bolsas Vuelife se iniciaron con 5×10^5 células/ml en 60 ml de medio utilizando bolsas Vuelife de 72 ml. Se incubaron las bolsas en una incubadora humidificada a 37 °C y 5 % CO₂. Se añadió medio fresco cada 2-3 días para ajustar la concentración a 1×10^6 células/ml hasta el día 10 y de 2×10^6 células/ml tras el día 10. Se dividieron las células a bolsas más grandes cuando fue necesario.

2. Análisis de subconjuntos de linfocitos y fenotipificación por citometría de flujo

Materiales & procedimientos

Se analizó el fenotipo y porcentaje de células de subpoblaciones por citometría de flujo los días 0, 5-6, 9-10, 14-15 y 20 de cultivo aplicando procedimientos normales con mAbs conjugados con fluorocromo contra CD3, CD14, CD19, CD45 y CD56.

En los experimentos de optimización iniciales, se sometieron las células el Día 0 y las células el Día 20 en cada una de las condiciones de expansión a un análisis inmunofenotípico más detallado. Para evitar la variabilidad entre una y otra adquisición, se descongelaron todas las muestras congeladas simultáneamente para una caracterización fenotípica detallada del subconjunto de células NK por citometría de flujo. Este panel incluyó mAbs conjugados con fluorocromo contra los siguientes antígenos superficiales CD11a (HI111), CD3 (UCHT-1), CD7 (M-T701), CD14 (MOP9), CD16 (3G8), CD19 (HIB19), CD25 (M-A251), CD27 (MT271), CD56 (B159), CD57 (NK-1), CD226 (DX11), NKB1 (DX9) y CD62L (DREG56) adquiridos de BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.; CD244(2B4) (C1.7), NKG2D (ON71), NKp30 (Z25), NKp44 (Z231), NKp46 (BAB281), de Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EE.UU.; NKG2A (131411), NKG2C (134591), KIR2DL1 (143211), KIR2DL3 (180701) de R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.

Todos los teñidos de anticuerpos para citometría de flujo se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo. Se lavaron las células una vez con PBS y se incubaron con cantidades apropiadas de anticuerpo a 4 °C durante 30 min. Se lavaron las células marcadas con PBS y se fijaron en 4 % PFA antes de la adquisición de datos. Se llevó a cabo la adquisición de datos en un FACSCalibur (BD) o CyFlow ML (Partec GmbH, Munster, Alemania) y se analizaron los datos con un software CellQuest o Flo-Max. Para el análisis, se utilizaron ventanas de análisis SSC/FSC apropiadas en torno a la población de linfocitos CD14⁺CD19⁻. Se seleccionaron las células NK como la población CD3⁺CD56⁺. Se seleccionaron los linfocitos T de tipo NK y los linfocitos T como poblaciones CD3⁺CD56⁺ y CD3⁺CD56⁻ respectivamente.

Para cada uno de los receptores de superficie de célula analizados, se calcularon los valores de intensidad de fluorescencia media (FFI) para las muestras del Día 0 y el Día 20. Para estimar el cambio en la expresión del receptor, los autores de la invención calcularon las relaciones MFI (MFI día 20/MFI día 0) para cada receptor. Cuando la MFI para las muestras del día 20 fue mayor que para el día 0, la relación MFI fue mayor de 1, lo cual indica el grado relativo de regulación positiva en ese receptor. Igualmente, una relación MFI por debajo de 1 se interpretó como una regulación negativa en la expresión de ese receptor.

3. Evaluación de citotoxicidad mediada por células

Materiales & procedimientos

Se evaluó la capacidad citotóxica del producto final *in vitro* con un ensayo de liberación de Cr⁵¹ de 4 horas convencional contra células K562 (Aktas E. y col., 2009; Alter, G. y col., 2004). Brevemente, se marcaron células diana K562 con 100 µCi de Cr⁵¹ durante 1 hora a 37 °C, se lavaron dos veces con PBS y se re-suspendieron en un medio RPMI. Se colocó un total de 3×10^4 células diana en 100 µl de medio RPMI por triplicado en placas de 96 pocillos con fondo en V- y se incubaron durante 4 horas con 100 µl de células efectoras en concentraciones apropiadas para obtener relaciones de efector: diana de 1:3 a 10:1. Se hizo el recuento de partes alícuotas de sobrenadantes utilizando un sistema de recuento Packard Cobra Auto-Gamma Serie 5000 (Meridien, CT, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de liberación de Cr⁵¹ específica de acuerdo con la fórmula: porcentaje de liberación específica = [(liberación experimental – liberación espontánea) / (liberación máxima – liberación espontánea)] x 100.

Análisis de desgranulación de células NK

Se co-incubaron productos de expansión con células diana K562 en una relación de 1:1 en un volumen final de 200 µl en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 37 °C y 5 % CO₂ durante 6 h. Se añadió mAb anti-CD107a conjugado con fluorocromo o el control isotipo IgG1 correspondiente al inicio del ensayo. Al cabo de 1 hora de incubación, se añadió monensina (GolgiStop, Becton Dickinson) a una dilución de 1:100. Se realizó el teñido superficial incubando células con mAb anti-CD3 y anti-CD56 durante 30 minutos sobre hielo. A continuación, se lavaron las células, se resuspendieron en PBS y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

4. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis de datos, la preparación de gráficos y las comparaciones estadísticas con el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. CA, EE.UU.).

RESULTADOS

Evaluación de bolsas de cultivo de células y biorreactor para la expansión de células NK

5 En una tentativa de utilización de un sistema de cultivo cerrado para la expansión de células NK, los autores de la invención compararon inicialmente las bolsas de cultivo de células con matraces utilizando PBMC de donantes sanos. En la Figura 1A se muestra el número de veces de expansión de células en masa así como de células NK y T de tipo NK de cada donante al final del periodo de expansión. La expansión de células en masa media fue 530 veces en bolsas mientras que el matraz produjo una media de expansión 1 110 veces más. La expansión de NK en bolsas pareció impresionante cuando se comparó con el matraz, especialmente, en tres de cada cinco donantes. Sin embargo, cuando se tuvo en cuenta el porcentaje de células NK en el producto final (Figura 1C), se observó que la expansión en bolsas no se correlaciona con la expansión en matraces y podría resultar en una pureza de células NK inferior al final. El producto final en bolsas tuvo una media de 31 % de células NK mientras que el porcentaje de NK medio en el producto final del matraz fue 53 %.

15 En la búsqueda de un sistema de expansión cerrado que tenga como resultado un rendimiento comparable o correlacionado con los matraces, los autores de la invención evaluaron el uso de un sistema de biorreactor automatizado en comparación con la expansión en matraces, utilizando PBMC de donantes sanos. Los autores de la invención observaron la expansión de células en masa (expansiones medias: matraz 770 veces, biorreactor 77 veces) al mismo tiempo que las células NK se expandían preferentemente y aumentaban su participación en la población en ambas condiciones. Si bien el número de veces de expansión (Figura 1B) en células NK fue inferior que en los matraces en cuatro de los cinco donantes, los porcentajes de estas subpoblaciones en el producto final fueron más comparables y correlacionadas con la expansión en matraz (Figura 1D). El producto final de los protocolos de expansión tuvo una media de 38 % células NK en el biorreactor mientras que había 44 % de células NK y 16 % en matraces.

25 Cuando se comparó con los resultados de las bolsas antes mencionados, el porcentaje de células NK en el biorreactor fue superior al de las bolsas, incluso a pesar del hecho de que este grupo de donantes había producido una pureza de células NK peor en la expansión en matraz. En conjunto, los resultados expuestos indican que el número de veces de expansión de células NK es mejor en bolsas, mientras que la pureza es ligeramente superior en el biorreactor.

30 Debido al uso de diferentes conjuntos de donantes y la alta variabilidad de un individuo a otro en la expansión de células NK, no fue posible observar directamente las eficiencias relativas de los sistemas en bolsa y biorreactor. Debido al hecho de que dos de los cinco donantes en estos diferentes grupos fueron realmente los mismos individuos (donantes 1 y 2), los autores de la invención tuvieron la oportunidad de comparar directamente la eficiencia de expansión. Aunque tuvo una menor tasa del número de veces de expansión, el biorreactor tuvo un porcentaje comparable de células NK en el producto final (64 %) cuando se comparó con el matraz (74 %) que fue mayor que las bolsas (47 %). En el caso de los linfocitos T de tipo NK, los porcentajes fueron muy próximos a 5 % en los tres sistemas.

40 Se sometieron los productos de expansión de estos dos donantes a un análisis fenotípico adicional con el fin de observar el patrón de cambio en la expresión de receptor. Si bien, hubo una variabilidad de un individuo a otro, según lo habitual, los cambios en los niveles de expresión del receptor en los diferentes productos finales fueron muy similares (Figura 2A y 2B). Se puede observar claramente que el grado de regulación positiva y negativa en un receptor dado es el mismo independientemente del protocolo de cultivo utilizado.

45 Para aclarar si las células NK en los productos finales de diferentes sistemas retienen el mismo estado de activación y presentan una citotoxicidad comparable, los autores de la invención evaluaron la actividad citotóxica de los productos finales frente a la línea celular K562 sensible a NK (Figura 2C). Los autores de la invención no observaron ninguna diferencia significativa entre las actividades citotóxicas de las preparaciones de células expandidas en diferentes condiciones. Estos resultados aseguran que los procedimientos en cuestión son todos suficientes para producir preparaciones de células con una mayor capacidad citotóxica.

Validación de proceso de expansión de células NK en el biorreactor

50 Una vez demostrada la viabilidad del uso del biorreactor para el proceso de expansión, los autores de la invención continuaron con la validación del proceso de expansión en el biorreactor en condiciones BPFa utilizando productos de aféresis o sangre periférica unitaria completa para iniciar el cultivo directamente en el biorreactor desde el día 0. Se utilizó la PBMC de dos donantes sanos y dos pacientes MM para este proceso de validación. Con fines comparativos, se expandió el material de partida, PBMC, en paralelo utilizando matraces. La Figura 3 presenta las curvas de expansión de células en masa y subpoblaciones de linfocitos para todos los donantes en biorreactor y en matraces. El número total de células alcanzado fue mucho mayor en las expansiones en biorreactor, con una pureza media de 37,5 % mientras que la pureza fue 43 % en matraces. Aunque la pureza de las células NK fue ligeramente superior en los biorreactores, el número final de células NK alcanzado es suficientemente impresionante para

facilitar el uso clínico de células NK expandidas en situaciones de inmunoterapia contra el cáncer.

Células NK expandidas en biorreactor despliegan una capacidad citotóxica superior

En los experimentos expuestos, en los que la expansión se inició en matraces y posteriormente se transfirió a biorreactores, los autores de la invención no detectaron ninguna diferencia en la capacidad citotóxica o el fenotipo de los productos finales cuando se comparó con expansiones en matraz. Cabe destacar que los autores de la invención observaron que cuando se inició la expansión directamente en biorreactores, la actividad citotóxica del producto final contra células K562 fue notablemente superior cuando se comparó con el producto final de expansiones en matraz en 3 de los 4 donantes (Figura 4A). Para examinar mejor este fenómeno, los autores de la invención llevaron a cabo ensayos de desgranulación contra células K562 y midieron el porcentaje de células de desgranulación en cada subpoblación de linfocitos (Figura 4B). Sorprendentemente, los autores de la invención observaron que el grado de desgranulación observado en la fracción de células NK desde las expansiones en biorreactor fue significativamente mayor que la de células NK de expansiones en matraz en los 4 donantes. Igualmente, la desgranulación de la fracción de linfocitos T de tipo N fue significativamente mayor en 3 de los 4 donantes. En conjunto, estos resultados indican que el proceso de expansión llevado a cabo en el biorreactor se realiza mejor por lo que respecta a elevar la capacidad citotóxica de células NK.

En una tentativa para explicar la diferencia de la capacidad citotóxica de los productos finales desde expansiones en biorreactor y en matraz, los autores de la invención realizaron una caracterización fenotípica detallada de las células NK por citometría de flujo multicolor. La Figura 5A muestra la expresión de varios receptores de superficie en células NK desde las expansiones en biorreactor y matraz y resume los resultados de todos los donantes y proporciona una imagen general de la comparación fenotípica entre el biorreactor y las expansiones de matraz. En general, las células NK del producto final parecen similares independientemente de qué sistema de expansión se utilice, con diferencias ligeras pero perceptibles en los niveles de expresión de CD11 b, NKG2D y NKp44. La regulación positiva de NKp44 es uno de los factores clave en la elevada capacidad citotóxica.

Este estudio evalúa comparativamente el uso de matraces de cultivo de células, bolsas y un biorreactor para la expansión *ex vivo* de células NK y T de tipo NK que se originan de PBMC en masa de donantes humanos en un intento de investigar la viabilidad de producción de células efectoras de calidad BPFa en sistemas automatizados cerrados.

Los autores de la invención han notificado anteriormente un medio de cultivo en conformidad con las BPFa que promueve el enriquecimiento selectivo de células NK activadas en matraces de cultivos de células (**Carlens S. y col., 2001**). En este punto, los autores de la invención presentan la última etapa de optimización de un sistema de cultivo cerrado automatizado de calidad BPFa para la preparación de poblaciones efectoras enriquecidas con células NK a gran escala que se puede aplicar en situaciones clínicas (**Miller JS. y col., 1994; Luhm J. y col., 2002; Klingemann HG y Martinson J., 2004; Koehl U. y col., 2005**) y/o el uso de líneas de líneas de células alimentadoras (**Ishikawa E. y col., 2004; Torelli GF, y col., 2005**) se ha utilizado ampliamente para la expansión de células NK en informes anteriores. En este estudio, los autores de la invención no utilizan ninguna etapa de separación, sino que utilizan PBMC en masa para el cultivo, lo cual tiene como resultado una población de células enriquecida en células NK que está diferenciada de LAK (**Ramsdell FJ y Golub SH., 1987**) y linfocitos citolíticos inducidos por citoquina (CIK) (**Chan JK. y col., 2006; Lu PH y Negrin RS., 1994**) tanto por lo que respecta al contenido en células NK como en actividad anti-tumor (**Bordignon C. y col., 1999**).

Los autores de la invención han demostrado que los sistemas tanto en bolsa como en biorreactor proporcionan la expansión de células NK. Una comparación global de las tasas de expansión y la pureza del producto final entre los dos sistemas cerrados utilizados en este estudio revela que el sistema de biorreactor proporciona una cantidad suficiente de células NK con una mayor pureza y, además tiene muchos menos linfocitos T en el producto final cuando se compara con las bolsas.

Sorprendentemente, los autores de la invención han observado que la actividad de células NK es significativamente superior en los productos de expansión desde reactores, en comparación con los de matraces. La correlación de los niveles de expresión de recepción con la respuesta de células NK frente a K562 ha revelado que los niveles de expresión de CD132, CD25, CD57 y NKG2C se correlacionaron inversamente con la respuesta, mientras que los niveles de expresión de NKp30, NKp44 y NKp46 se correlacionaron directamente. Observar la correlación inversa con la expresión del receptor NKG2C de activación de linfocitos T es inhabitual pero tiene un escaso significado en este caso, ya que las células K562 diana son conocidas por la falta de expresión de su ligando HLA-E (**Khalil-Daher I. y col., 1999**). El análisis estadístico de receptores que se correlacionan con la respuesta de células NK ha revelado que NKp44 se correlaciona positivamente con la respuesta y se expresa a un nivel significativamente mayor en productos de biorreactor cuando se compara con expansiones en matraz. Esto puede explicar al menos en parte la observación de una alta capacidad citotóxica de los productos del biorreactor. A diferencia de otros NCR, NKp44 (**Vitale M. y col., 1998**) se expresa exclusivamente en células NK activadas y se regula positivamente tras la estimulación con IL-2 *in vitro* (**Biassoni R. y col., 2002**). Por tanto, en este caso, podría presentarse como un fabricante sustituto de hasta qué punto se está utilizando bien la IL-2 en el cultivo y cuál es el grado de activación de la población de células NK. Por lo tanto, una expresión elevada de NKp44 proporciona una significancia funcional para el procedimiento de expansión que se lleva a cabo en el biorreactor en lugar de en los matraces de cultivo de

células convencionales.

En lo que respecta a la práctica, los autores de la invención han observado que todos los sistemas en cuestión tienen ciertas ventajas y desventajas. La expansión en matraces de cultivos de células tiene el riesgo inherente de exposición a agentes externos y contaminación. Aunque se reduce al mínimo este riesgo en los entornos de laboratorio BPFa, el uso de sistemas automatizados cerrados es definitivamente preferente ya que proporciona suficientes cantidades de células. El inicio del cultivo en matraces no demanda un alto número de células, pero han de mantenerse las células dentro de una determinada concentración (**Heiskala M. y col., 1987**), la división en nuevos matraces durante la expansión termina en un número imposible de matraces que manejar. El cultivo también puede iniciarse con pocas células en bolsas pequeñas y tiene como resultado una buena expansión, pero la pureza de las células NK es inferior que la de otros sistemas y sigue siendo necesario dividir las células en más de una bolsa. A pesar de ello, la expansión en células puede optimizarse fácilmente en un laboratorio de cultivo de células normal, sin la necesidad de invertir en un equipo adicional. Se puede llevar a cabo más de una expansión simultáneamente utilizando bolsas con la única limitación del espacio de la incubadora, mientras que el biorreactor requiere una inversión extra para la compra de la máquina y se puede utilizar para una expansión cada vez.

El biorreactor es el procedimiento más práctico, ya que requiere un tiempo práctico mínimo. Sin embargo, el inicio de este sistema requiere muchas células y la velocidad de expansión es menor. El movimiento de balanceo continuo del biorreactor asegura un entorno de cultivo dinámico y homogéneo que proporciona muchas ventajas como puedan ser condiciones de cultivo uniformes, facilidad de muestreo y una mejor calidad de los procesos de control como puedan ser la medición del pH y el oxígeno disuelto. El uso de dichas condiciones de cultivo dinámicas es con la mayor probabilidad un importante factor que contribuye a la viabilidad de las células en crecimiento más concentradas en el biorreactor. Esto evita cualquier desperdicio del medio o componentes adicionales, lo cual reduce de forma espectacular el coste global del proceso. Al utilizar curvas de expansión promedio para cada protocolo, los autores de la invención han estimado que para adquirir un número similar de células NK, el sistema de biorreactor utiliza aproximadamente 1/10 veces componentes de medio utilizados para las bolsas y 1/25 veces componentes de medio utilizados para los matraces. El consumo de medios y citoquinas es incluso más (en torno a 2,5 veces más las bolsas) en los matraces.

Naturalmente, el uso de un sistema de biorreactor dinámico para el cultivo *ex vivo* exige evaluar con atención una serie de factores. Las células hematopoyéticas son relativamente sensibles a la cizalla y es razonable asumir que los procesos con alta cizalla son inadecuados para la expansión *ex vivo* (**Nielsen LK., 1999**). Por lo tanto es improbable que los biorreactores de tanque en agitación (**Pierson BA. y col., 1996**) o los sistemas de cultivo de perfusión en filtros externos o alto caudal proporcionen una alta eficiencia. Para conseguir el beneficio completo de un biorreactor, sería deseable utilizar un sistema de producción de tensión a baja cizalla con un filtro de perfusión interno para eliminar el medio (**Nielsen LK., 1999**) y el sistema de biorreactor utilizado en este estudio puede satisfacer estas expectativas.

Otro factor que se debe considerar con atención es el material utilizado en el entorno de cultivo. Únicamente algunos materiales pueden soportar el crecimiento de células hematopoyéticas eficientemente y factores como la limpieza, la esterilización y la reutilización afectan significativamente a su rendimiento (**Laluppa JA. y col., 1997**). Por tanto, el uso de materiales desechables y pre-esterilizados es preferente. Los sistemas tanto de bolsa como de biorreactor utilizados en este estudio son adecuados para la producción a este respecto.

Una diferencia observada fue una viabilidad de células ligeramente inferior en los productos finales de los cultivos en biorreactor y en bolsas cuando se compararon con los matraces. Esto es sobre todo probable debido al hecho de que continuamente se eliminan por lavado las células muertas del matraz cada 2-3 días cuando se cambia el medio al mismo tiempo que ningún procedimiento de este tipo implica un sistema cerrado. No obstante, siempre es posible utilizar una etapa de lavado de calidad BPFa al final del cultivo, antes de la administración.

Todos los sistemas en cuestión tienen ciertas ventajas y desventajas prácticas. La expansión de células NK en matraces de cultivo de células tiene el riesgo inherente de la exposición a agentes externos y contaminación. Si bien este riesgo se minimiza en los entornos de laboratorio BPFa, el uso de sistemas automatizados cerrados es definitivamente preferente ya que suministra suficientes cantidades de células. El cultivo en matraces puede iniciarse con un número muy reducido de células, pero dado que las células han de mantenerse dentro de una determinada concentración, la división en nuevos matraces durante la expansión termina por ser un número imposible de matraces que manejar.

El cultivo también puede iniciarse con pocas células en bolsas pequeñas y tiene como resultado una expansión muy buena, pero la pureza de las células NK y T de tipo NK es inferior que la de otros sistemas y sigue siendo necesario dividir las células en más de una bolsa. La expansión en bolsas puede optimizarse fácilmente en un laboratorio de cultivo de células normal, sin necesidad de invertir en un equipo adicional. Se puede llevar a cabo más de una expansión simultáneamente utilizando bolsas con la única limitación del espacio de la incubadora, en cambio el biorreactor puede utilizarse para una expansión cada vez.

En conclusión, los resultados presentados en el presente documento demuestran claramente que es posible producir grandes cantidades de células efectoras altamente activadas para su posible uso en situaciones

inmunoterapia adoptiva en un sistema de cultivo cerrado en condiciones BPFa.

Referencias

Aktas E. y col. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 2009, 254 pp. 149-54.

5 Alici E. y col. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMPcompliant components. *Blood* 2008, 111 pp. 3155-62.

Alter G. y col. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* 2004, 294 pp. 15-22.

10 Barkholt L. y col. Safety analysis of ex vivo expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a Phase I clinical study. *Immunotherapy.* 2009, 1 pp. 753-764.

Biassoni R. y col. Human natural killer receptors and their ligands. *Curr Protoc Immunol.* 2002; capítulo 14: Unidad 14 10.

Bordignon C. y col. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica.* 1999, 84 pp.1110-1149.

15 Carlens S. y col. A new method for in vitro expansión of cytotoxic human CD3⁻ CD56⁺ natural killer cells. *Hum Immunol.* 2001, 62 pp.1092-8.

Chan JK. y col. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study. *Clin Cancer Res.* 2006, 12 pp.1859-1867.

20 Grimm EA. y col. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 1982,155 pp.1823-1841.

Guimaraes F. y col. Evaluation of ex vivo expanded human NK cells on antileukemia activity in SCIDbeige mice. *Leukemia.* 2006, 20 pp. 833-839.

25 Guven H. y col. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia* 2003, 17 pp. 1973-80.

Heiskala M. y col. Mechanism of cell contact-mediated inhibition of natural killer activity. *J Immunol.* 1987, 139 pp.1414-1418.

Ishikawa E. y col. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res.* 2004, 24 pp.1861-1871.

30 Khalil-Daher I. y col. Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytolysis by itself. *J Reprod Immunol.* 1999, 43 pp.175-182.

Klingemann HG and Martinson J. Ex vivo expansión of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2004, 6 pp. 15-22.

35 Koehl U. y col. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr.* 2005, 217 pp. 345-350.

Laluppa JA. y col. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res.* 1997, 36 pp. 347-359.

Lu PH and Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺ CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1994, 153 pp.1687-1696.

40 Luhm J. y col. Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002, 11 pp. 651-7.

Miller JS. y col. Large scale ex vivo expansion and activation of human natural killer cells for autologous therapy. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14 pp. 555-62.

45 Nielsen LK. Bioreactors for hematopoietic cell culture. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999, 1 pp. 129-152.

Pierson BA. y col. Production of human natural killer cells for adoptive immunotherapy using a computercontrolled

stirred-tank bioreactor. *J Hematother* 1996, 5 pp. 475-83.

Ramsdell FJ and Golub SH. Generation of lymphokine-activated killer cell activity from human thymocytes. *J Immunol*. 1987,139 pp.1446-1453.

5 Rosenberg S. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1985, 75 pp. 595-603.

Sutlu T and Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. 2009, 266 pp. 154-181.

10 Torelli GF. y col. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica* 2005, 90 pp. 785-792.

Vitale M. y col. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*. 1998, 187 pp. 2065-2072.

Documento US 10/242.7881

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para expansión a gran escala y activación simultánea de células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁺CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺, en el que dicha expansión y activación se lleva a cabo en un sistema cerrado y las células expandidas obtenidas presentan una mayor citotoxicidad tal como se determina a través de una prueba de citotoxicidad *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento:
- (i) proporcionar células de una muestra de sangre periférica de un enfermo portador de tumor;
- (ii) añadir las células a un biorreactor de bolsa de cultivo de células cerrada a una concentración de aproximadamente 0,5 x 10⁶ a aproximadamente 2 x 10⁶/ml de medio de cultivo de células suplementado con suero, interleuquina 2 (IL-2) y anticuerpos anti-CD3;
- 10 (iii) incubar y expandir las células de la etapa ii) con agitación en un movimiento de balanceo y calentamiento hasta que al menos 50 % de la población de células expandidas comprende células NK y linfocitos T de tipo NK activados; y
- (iv) recoger dicha suspensión de células expandidas de células NK y linfocitos T de tipo NK activados desde dicho biorreactor, en el que dichas células presentan una mayor citotoxicidad en comparación con células recién aisladas, tal como se determina según una prueba de citotoxicidad *in vitro*.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expansión de células se realiza hasta que el número total de células se ha expandido al menos aproximadamente 10-veces.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra de células es una muestra de sangre periférica estimulada con citoquinas.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra de células es una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las células se incuban durante al menos aproximadamente 10 días.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el suero se selecciona del grupo que consiste en suero humano y suero autólogo.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 6, en el que el medio está suplementado con aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 U/ml de IL-2, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 y aproximadamente 1 a aproximadamente 40 % de suero.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumores hematológicos y tumores sólidos.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que las células de la etapa (iv) consisten predominantemente en células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las células de la etapa (iv) con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺ expresan también NKp44 a un nivel más alto en comparación con células citolíticas naturales activadas con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺ obtenidos de las expansiones en matraz.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el biorreactor es un biorreactor Wave.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el movimiento de balanceo es a una velocidad y un ángulo que permiten que las células se adhieran a la superficie del sistema de células cerrado.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el balanceo se realiza a un ángulo de balanceo de aproximadamente 4-8 °.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el balanceo se realiza a una velocidad de balanceo de aproximadamente 4-8/min.
- 45 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el procedimiento se realiza a una temperatura de aproximadamente 36 a aproximadamente 40 °C, a una concentración de CO₂ de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 5,1 %.
- 50 16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la agitación y el calentamiento se realizan en las siguientes condiciones: una temperatura de aproximadamente 36 a aproximadamente 40 °C; una concentración de CO₂ de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 5,1 %; y un balanceo suave a una velocidad y un ángulo que permiten que las células se adhieran a la superficie del sistema de células cerrado.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la agitación y el calentamiento se realizan en las siguientes condiciones: una temperatura de aproximadamente 36 a aproximadamente 40 °C; una concentración de CO₂ de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 5,1 %; y a una velocidad de balanceo de aproximadamente 4-8/min y a un ángulo de balanceo de aproximadamente 4-8 °.

5 18. Una suspensión de células citolíticas naturales (NK) con el fenotipo CD3⁻ CD56⁺ y linfocitos T de tipo NK con el fenotipo CD3⁺ CD56⁺ que se puede obtener a través de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17,

10 en la que se han expandido y activado células citolíticas naturales y linfocitos T de tipo NK desde una muestra de sangre periférica de un enfermo portador de tumor, a través de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-17

y en la que las células citolíticas naturales con el fenotipo CD3⁻ CD56⁺ presentan una mayor citotoxicidad tal como se determina a través de una prueba de citotoxicidad *in vitro* cuando se comparan con células expandidas en matraces y expresan NKp44 a un mayor nivel cuando se comparan con células expandidas en matraces

15 y en la que al menos 35 %, preferentemente al menos 50 % de la población de células expandidas son células NK activadas.

19. Una suspensión de células de acuerdo con la reivindicación 18, para su uso en el tratamiento de cáncer.

20. Una composición farmacéutica que comprende la suspensión de células de acuerdo con la reivindicación 18, para su uso en el tratamiento de cáncer.

Figura 1A

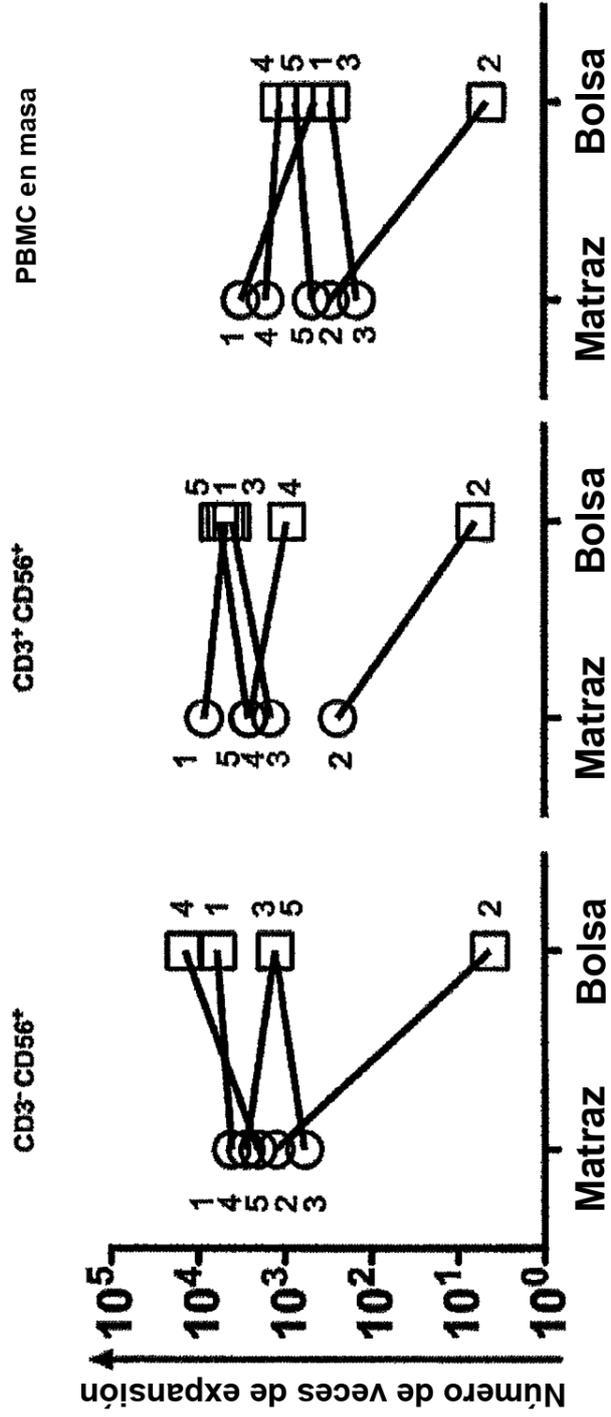


Figura 1B

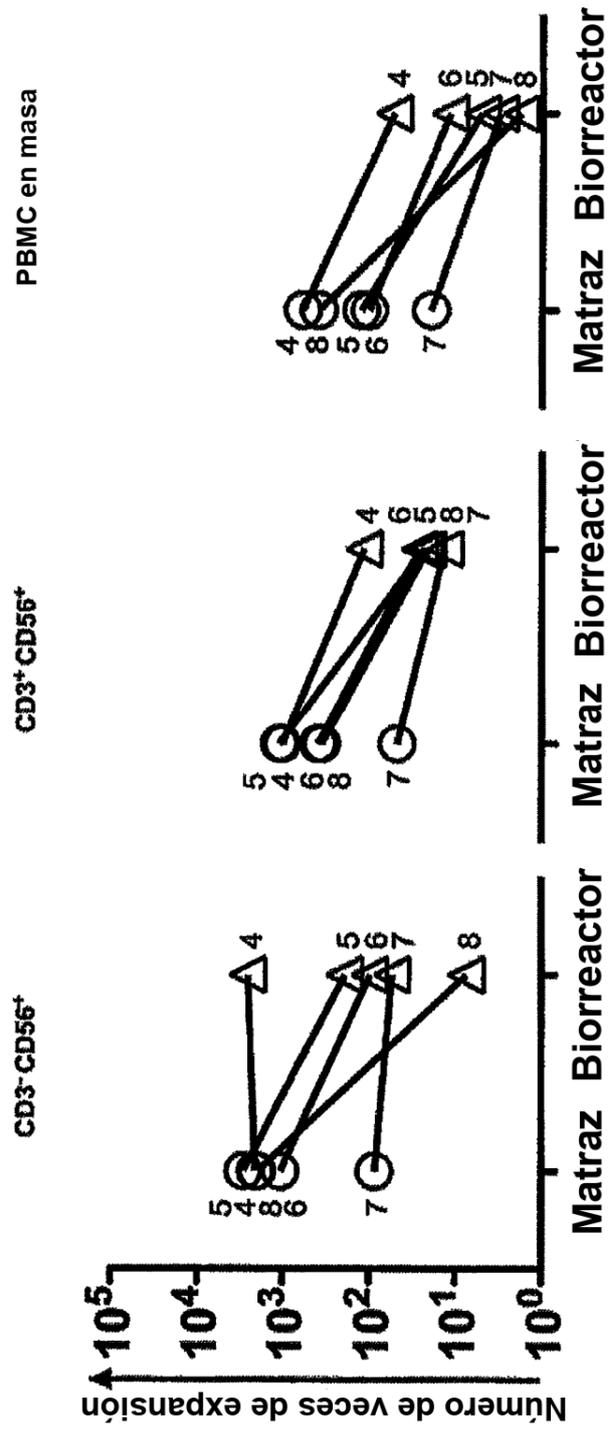


Figura 1C

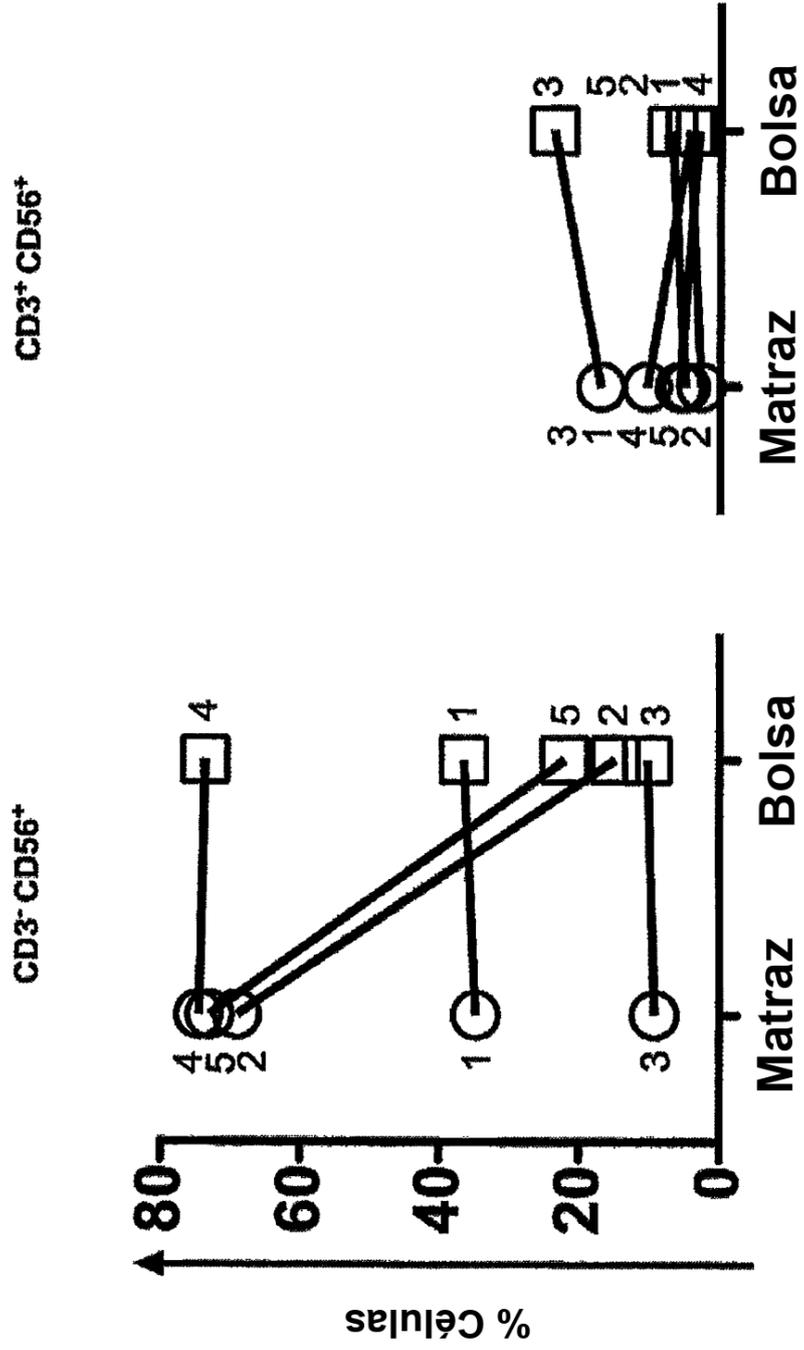


Figura 1D

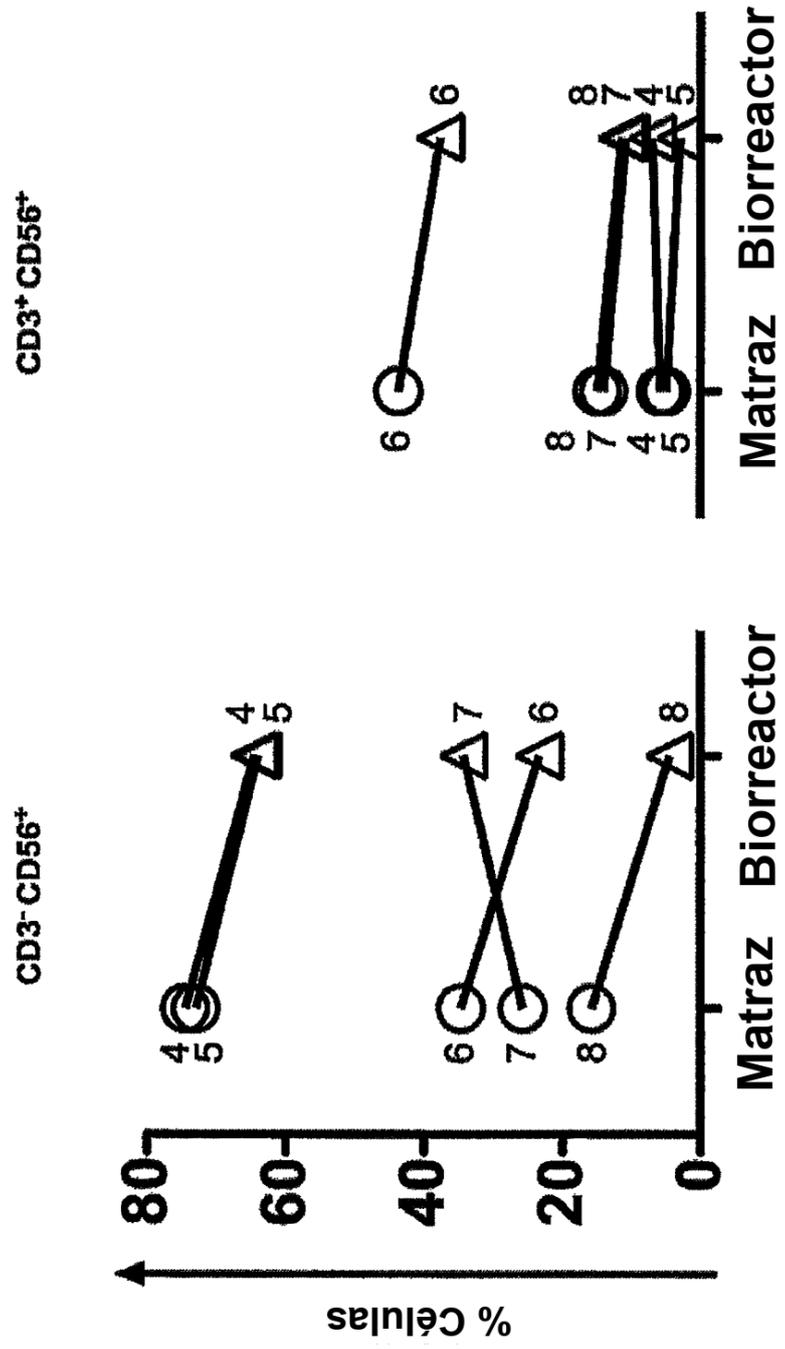


Figura 2A

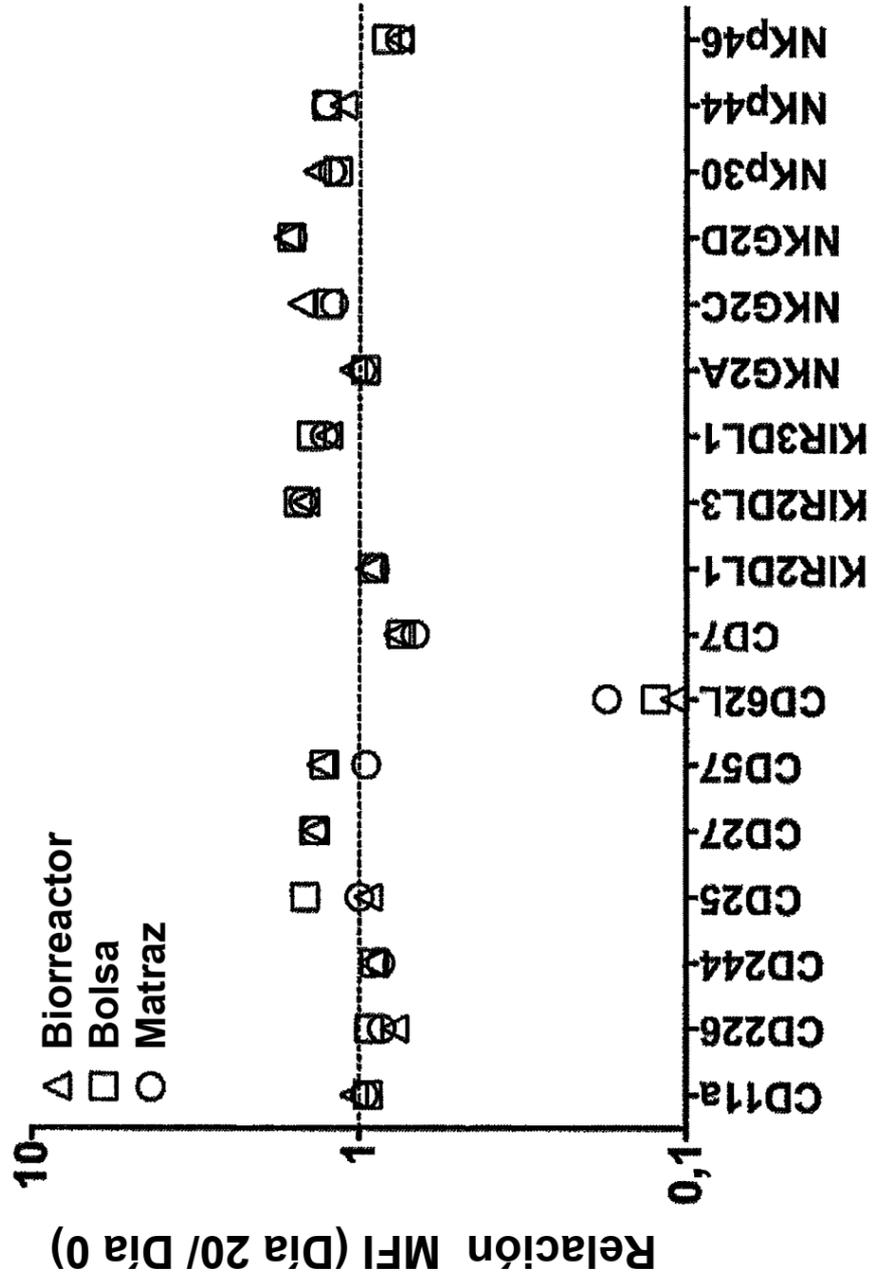


Figura 2B

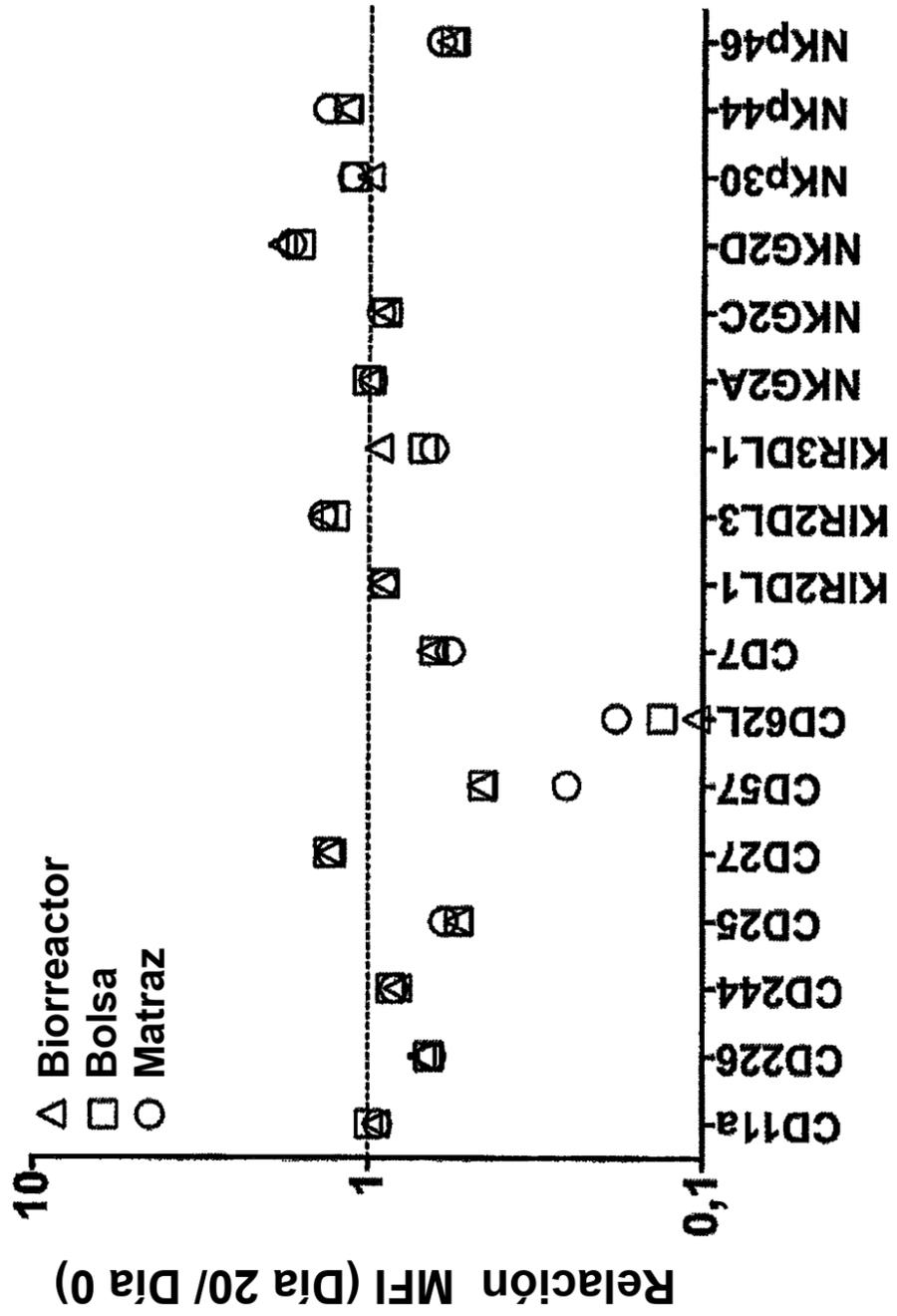


Figura 2C

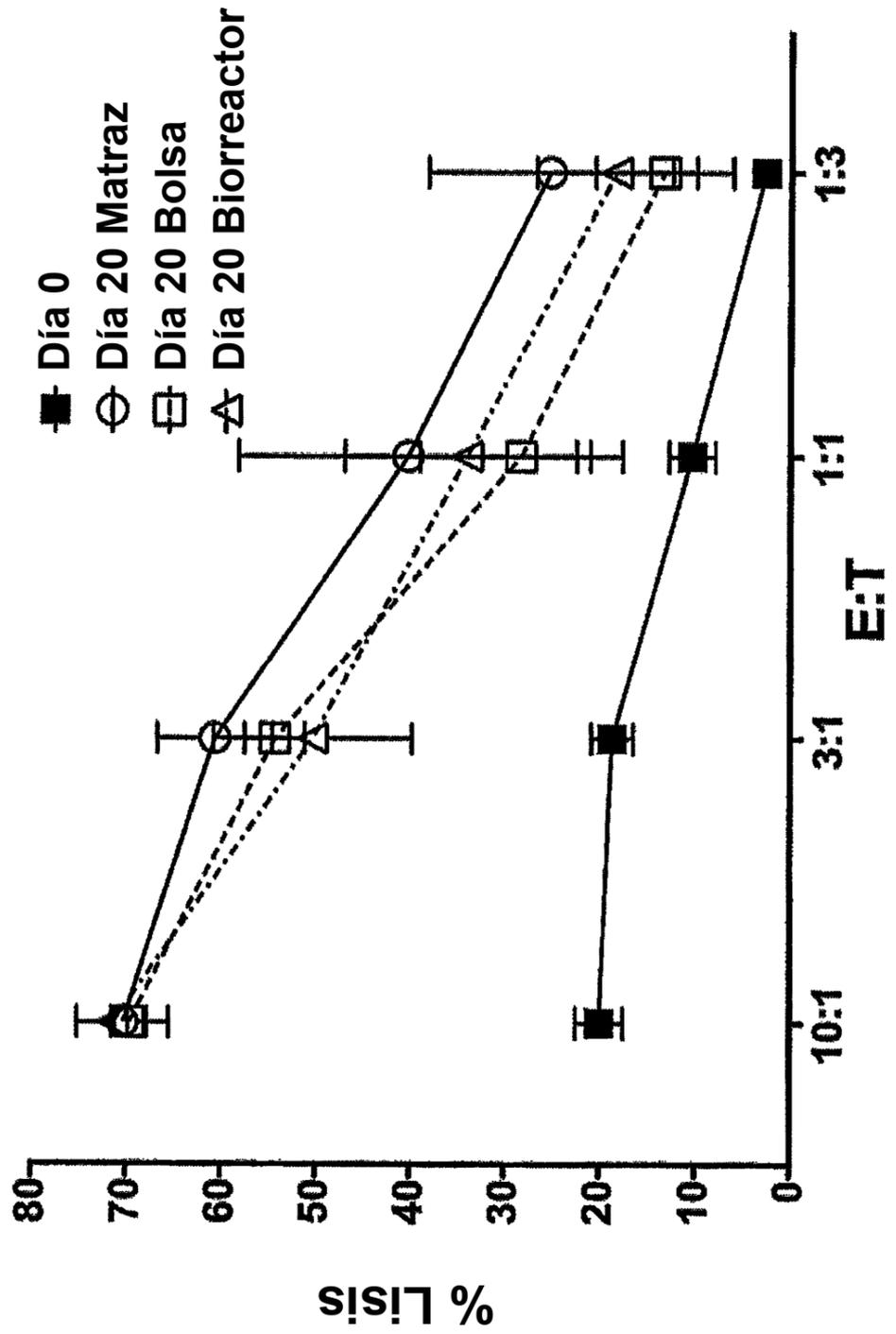


Figura 3A

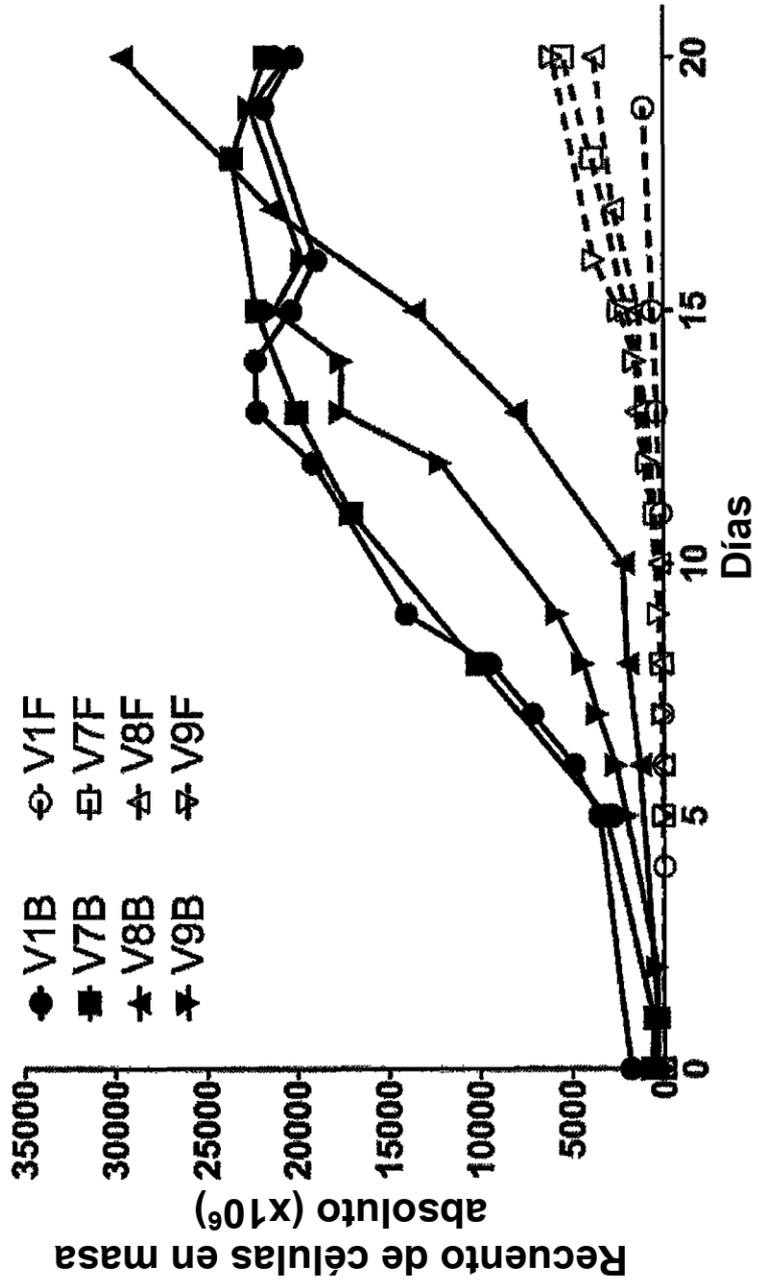


Figura 3B

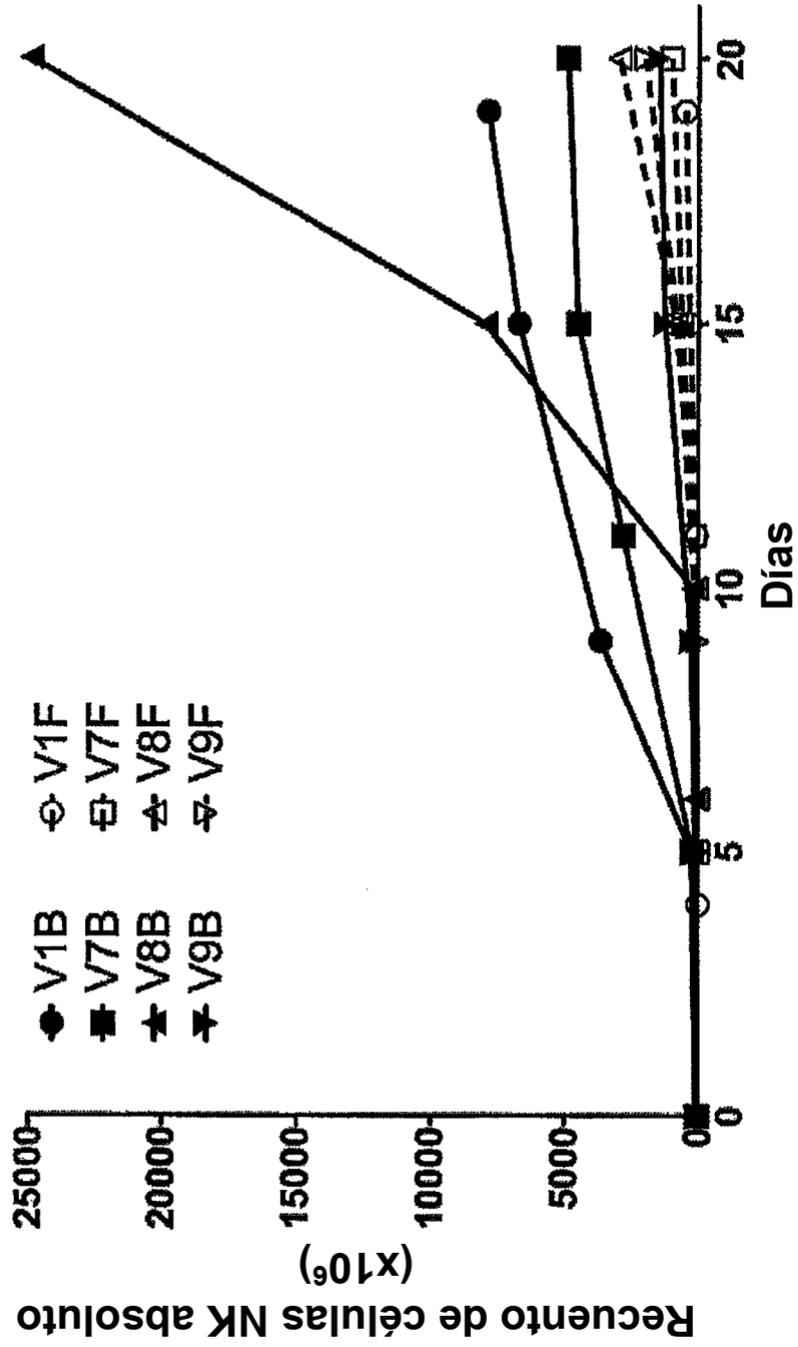


Figura 3C

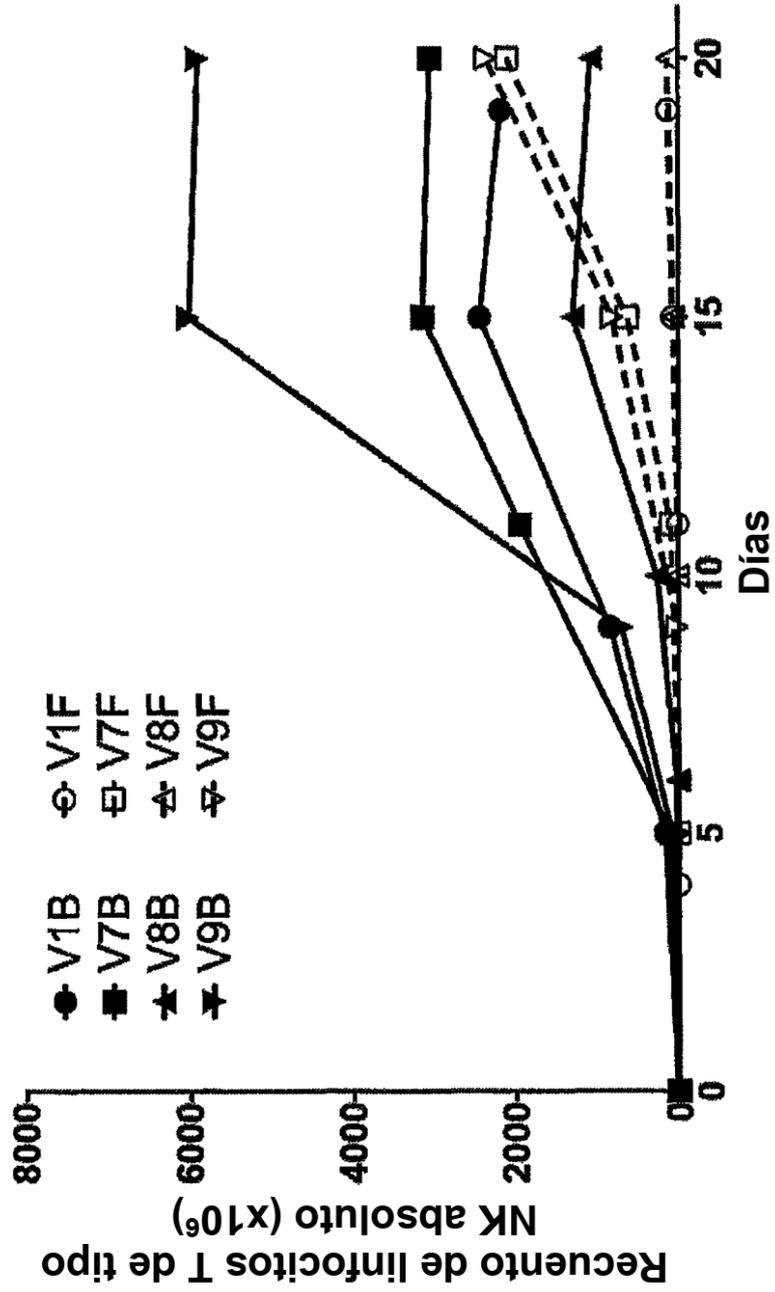


Figura 3D

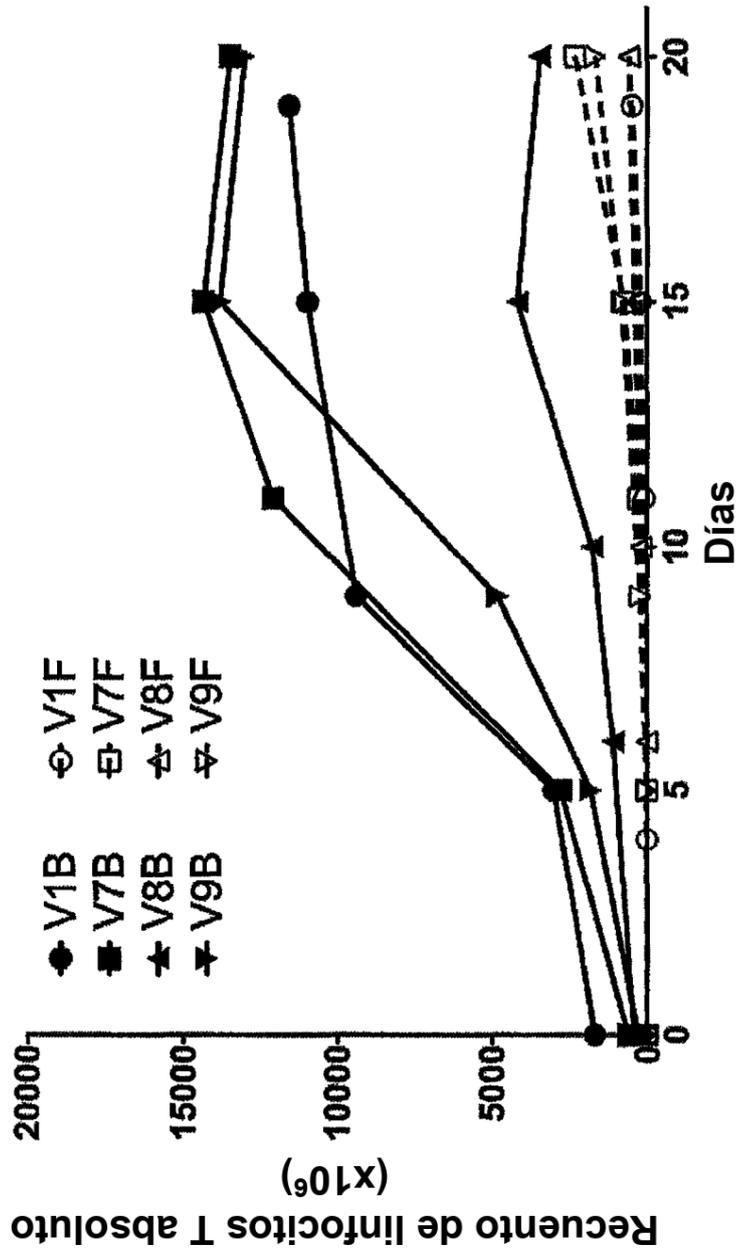


Figura 4A

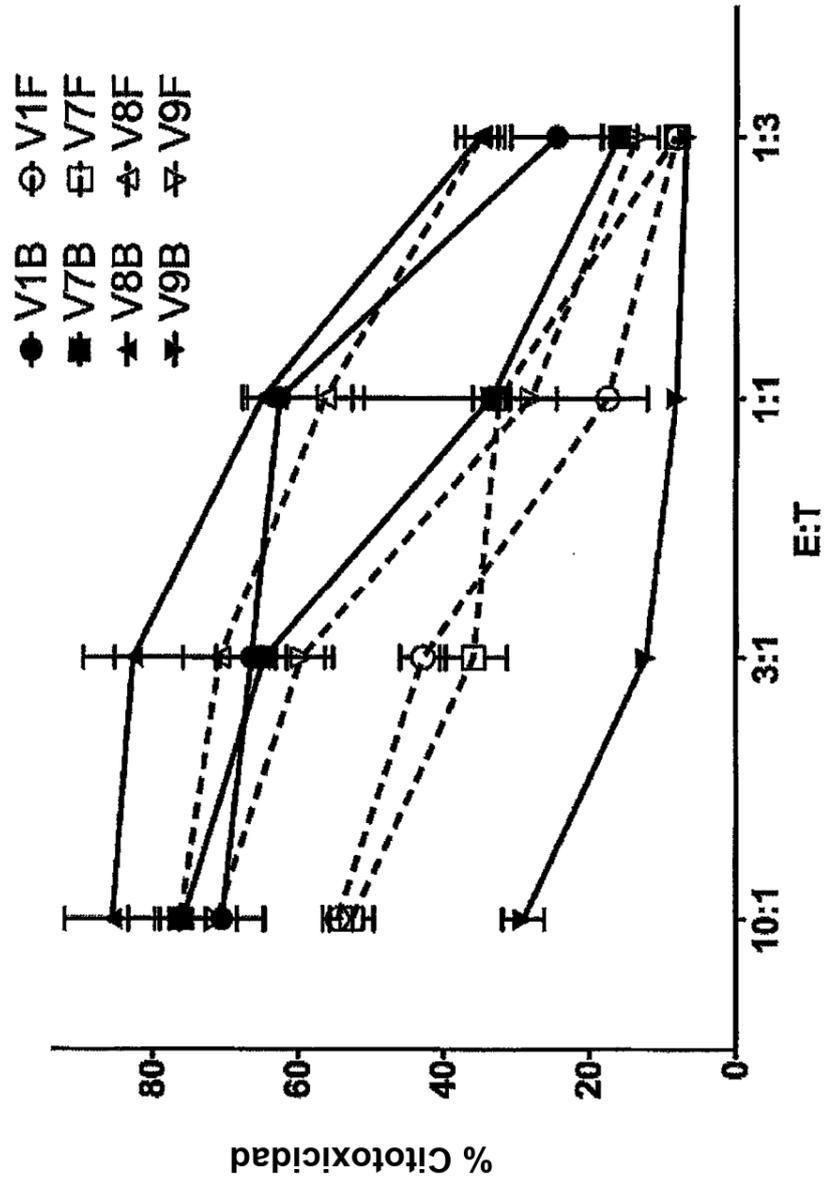


Figura 4B

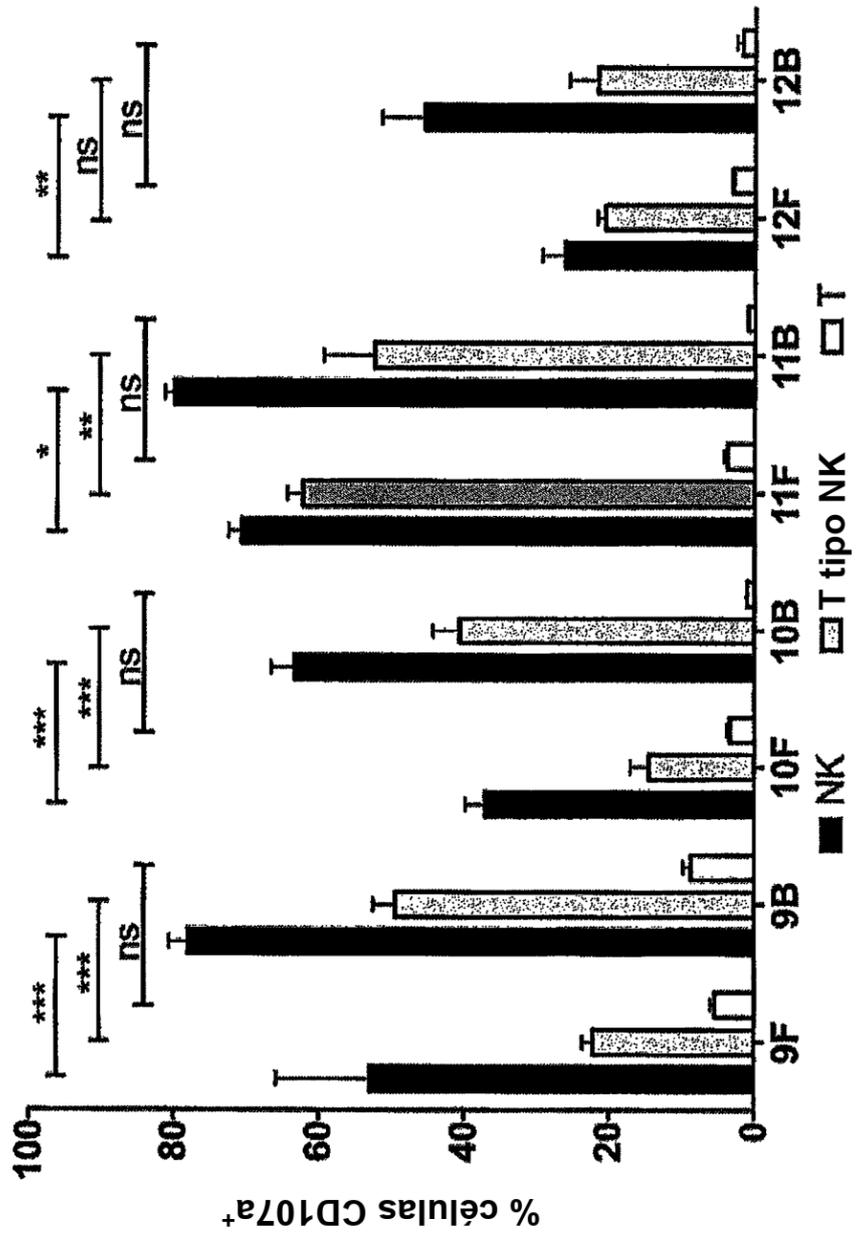


Figura 5

