

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 248**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2013 PCT/NL2013/050073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2013 E 13709575 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2812011**

54 Título: **Diferenciación de células NK ex vivo de células hematopoyéticas CD34+**

30 Prioridad:

08.02.2012 EP 12154554

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

06.07.2020

73 Titular/es:

**GLYCOSTEM THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Kloosterstraat 9
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**SPANHOLTZ, JAN y
DOLSTRA, HARMEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 771 248 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

Diferenciación de células NK *ex vivo* de células hematopoyéticas CD34+

5 La invención se refiere al campo de la biología médica moderna. En particular, la invención se refiere a tecnología de células madre. Más en particular, la invención se refiere a la generación *ex vivo* de células NK a partir de dichas células. Las células NK pueden, por ejemplo, usarse en el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas crónicas. La invención también se refiere a una tecnología particular de células madre postembrionarias y/o adultas y la generación de células NK a partir de cultivos de tales células.

10 Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos innatos que exhiben funciones citotóxicas e inmunorreguladoras tras la activación. En general, estas funciones se correlacionan con dos fenotipos distintos positivos para CD56 de células NK, a saber, las células NK CD56^{brillante} productoras de citoquinas que se encuentran más prominentemente en los tejidos linfoides secundarios y las células NK CD56^{atenuada} residentes en la sangre que matan células infectadas por virus y transformadas¹⁻³. Ambos subtipos de células NK expresan un intervalo típico de receptores de activación e inhibición que equilibran su actividad. Se encuentra que las células NK CD56^{atenuada} exhiben una expresión superficial alta de KIR y CD16 (FcγRIII), la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por el receptor (ADCC), mientras que las células NK CD56^{brillante} carecen de la expresión de estos receptores pero revelan una expresión más intensa es decir, del receptor inhibidor CD94/NKG2A. Varias indicaciones llevaron al concepto de una maduración gradual de las células NK CD56^{brillante} hacia un fenotipo CD56^{atenuada} y la función de las células NK^{2, 4, 5}. Además, en relación con los sitios de unión de estos dos subconjuntos de células NK, se identificó una expresión diferente del receptor de quimiocina y las moléculas de adhesión. Mientras que las células NK CD56^{brillante} expresan exclusivamente CCR7 y exhiben niveles más altos, por ejemplo de CD62L, CCR1 y CCR4, 5, 6, 7, 8 y 9 que las células NK CD56^{atenuada}, otros receptores como CCR4 y CXCR1, 2, 3 y 4 así como CX3CR1 exhiben una expresión más fuerte en células NK CD56^{atenuada}^{2, 6, 7}.

25 Varias citoquinas exhiben efectos biológicos significativos en las células NK. Entre estas, se demostró que IL-12, que es producida principalmente por monocitos activados, macrófagos, células dendríticas y células B, induce la proliferación de células NK, la producción de citoquinas tales como IFN-γ y mejora la citotoxicidad^{8, 9}. Además, se ha demostrado que IL-12 también influye en la expresión del receptor de las células NK. Los primeros estudios revelaron una inducción del fenotipo de células NK CD56^{brillante} por IL-12, que incluía una sobreexpresión de CD94 y CD62L y una modulación descendente de CD16¹⁰. Recientemente, también se mostró una sobreexpresión de NKG2A en células NK NKG2C⁺¹¹.

30 Las células NK se han descrito como efectores prometedores para la inmunoterapia adoptiva del cáncer^{12, 13}. Recientemente se estableció y caracterizó un sistema de diferenciación de células NK humanas *ex vivo*, que proporciona un producto de células NK auspicioso para terapias clínicas, especialmente debido a la disponibilidad, pureza, altas tasas de expansión y estado de activación de las células NK generadas junto con su actividad citotóxica^{14, 15}.

35 En la presente invención, se muestra que IL-12 afecta la diferenciación, la expresión del receptor y la función de las células NK generadas *ex vivo*, en particular de las células NK que se generan a partir de células madre hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas cultivadas *ex vivo*. Se encontró que IL-12 induce la expresión de CD62L, CD16 y KIR y un repertorio específico de receptores de quimiocinas junto con funciones y capacidades mejoradas correlacionadas en citotoxicidad, ADCC y migración de las células NK humanas diferenciadas *ex vivo*. El uso de IL-12, preferiblemente ya en una etapa en la que el cultivo no contiene cantidades detectables de células NK proporciona al producto celular NK terminado propiedades nuevas y/o mejoradas.

40 Para este fin, la invención proporciona un método para producir células NK, comprendiendo dicho método

- 45
- i- una muestra de células positivas para CD34 humanas que se proporcionan,
 - ii- expandir dichas células positivas para CD34 *ex vivo*,
 - 50 iii - cultivar células positivas para CD34 obtenidas en la etapa ii *ex vivo* en un medio de diferenciación de células NK,

dicho método caracterizado porque dicho medio de diferenciación de NK comprende entre 20 pg/mL y 20 ng/mL de IL-12.

55 Además se describe un método para producir células NK, comprendiendo dicho método

- i- proporcionar una muestra de células madre, células progenitoras o ambas, a partir de células de tejido postembrionario humano,
- ii- cultivar y expandir dichas células *ex vivo*,
- 60 iii- cultivar células madre, progenitoras o ambas obtenidas en la etapa ii *ex vivo* en un medio de diferenciación de células NK,

dicho método caracterizado porque dicho medio de diferenciación de NK comprende IL-12.

65 Las células madre hematopoyéticas humanas y las células progenitoras expresan típicamente el marcador de superficie celular CD34. Las fuentes de células madre hematopoyéticas y progenitoras tales como la médula ósea, la sangre periférica movilizada hematopoyética o sangre del cordón umbilical a menudo se tratan con purificación por afinidad

utilizando un anticuerpo específico para CD34 humano para enriquecer dichas células.

Las células positivas para CD34, las células madre hematopoyéticas o las células progenitoras pueden derivarse de la sangre, de la médula ósea o de otra fuente de células progenitoras hematopoyéticas postnatales. En una realización preferida, las células positivas para CD34, las células madre hematopoyética o las células progenitoras se derivan del tejido postembrionario humano. Preferiblemente, la muestra que contiene las células positivas para CD34 humanas, las células madre hematopoyéticas o las células progenitoras son una población celular enriquecida para las células positivas para CD34, preferiblemente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-CD34. Los ejemplos de fuentes de células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras que son adecuadas para usar en un método de la invención son: médula ósea, sangre periférica movilizada, tejido adiposo adulto (células madre mesenquimales), la sangre de un recién nacido, preferiblemente de sangre recolectada del cordón umbilical o la placenta, después de desconectarla del recién nacido. Actualmente, las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas se pueden obtener a partir de líneas de células madre que se han generado previamente. Actualmente es posible reprogramar células madre específicas de tejido, tales como las células madre de la piel, para producir células progenitoras comprometidas en el linaje hematopoyético. Incluso se ha demostrado que es posible reprogramar células diferenciadas, tales como las células de la piel, en células madre completamente funcionales que pueden producir una progenie de células progenitoras que se comprometen a producir una progenie diferenciada del linaje hematopoyético. Todas estas células madre son células madre hematopoyéticas adecuadas para la presente invención. Una fuente preferida de células madre hematopoyéticas es el tejido postembrionario humano hematopoyético y/o mesenquimal. Preferiblemente a partir de tejido humano obtenido de humanos posparto. Una fuente particularmente preferida es la sangre del cordón umbilical humano. Particularmente preferida es una fuente de sangre de cordón umbilical humano congelado. Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, las células positivas para CD34 se derivan de sangre de cordón umbilical humano. En una realización preferida, dicha muestra comprende una muestra de sangre de cordón umbilical humano. En una realización preferida, dichas células positivas para CD34 son células positivas para CD34 de la sangre del cordón umbilical de un ser humano. Una célula progenitora hematopoyética típicamente no expresa un marcador de células NK.

Una célula madre hematopoyética se define por su capacidad de reponer todos los tipos de células sanguíneas y su capacidad de autorrenovación. Se sabe que una pequeña cantidad de células madre hematopoyéticas puede expandirse para generar una gran cantidad de células madre hematopoyéticas hijas. Una célula progenitora hematopoyética es una célula que, al igual que una célula madre, tiene una tendencia a diferenciarse en un tipo específico de célula, pero ya es más específica que una célula madre y se la empuja a diferenciarse en su célula "objetivo". Una diferencia entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse (autorrenovarse) indefinidamente, mientras que las células progenitoras solo pueden dividirse un número limitado de veces. Otra diferencia es la expresión de marcadores de superficie. Las células madre generalmente carecen de marcadores de superficie que son prominentes en las células progenitoras o células diferenciadas derivadas de ellas. Sin embargo, en humanos, tanto las células madre hematopoyéticas como las células progenitoras hematopoyéticas expresan el marcador de superficie celular CD34.

Estudios anteriores indicaron la potencia de IL-12 para modular la maduración hacia una célula NK citotóxica y productora de IFN- γ ¹⁶. El término maduración se usa típicamente para el cambio de una célula NK inmadura a una forma más madura. En la técnica, esto a veces también se denomina diferenciación, sin embargo, para la presente invención, el término diferenciación se usa para reflejar la producción de una célula que expresa un marcador típico de células NK, a partir de una célula precursora que no expresa un marcador típico de células NK. En los últimos años, los pacientes con disfunciones en las vías de señalización de IL-12 revelaron la necesidad del cebado de células NK a través de IL-12 para la adquisición de actividad funcional ¹⁷. La adquisición de funciones de células NK citotóxicas y productoras de IFN- γ por IL-12 se correlacionó con la expresión inducida del factor 1 de regulación de IFN (IRF-1) y los genes de perforina ^{18, 19}. En la presente invención, se encontró que IL-12 ya tiene una función cuando se agrega a un cultivo que comprende células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras. Sin limitarse a la teoría, se cree que IL-12 no solo es eficaz en células NK maduras e inmaduras, sino también en células precursoras de las mismas que no expresan un marcador típico de células NK tales como CD56, NKG2A, KIR o NKp46.

El cultivo se inicia típicamente con una etapa de expansión. En esta etapa, se incrementa el número de células positivas para CD34, células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas o una combinación de las mismas. Actualmente, hay varios métodos diferentes disponibles para expandir las células positivas para CD34, las células madre hematopoyéticas, las células progenitoras hematopoyéticas o una combinación de las mismas. Dichos métodos incluyen, entre otros, cultivo en presencia de SCF (factor de células madre), TPO (trombopoyetina), IGF-2 (factor 2 de crecimiento similar a la insulina), FGF-1 (factor 1 de crecimiento de fibroblastos), Angptl-2 (proteína 2 similar a angiopoyetina); cultivo en presencia de SCF, TPO; cultivo en presencia de SCF, ligando de flt-3 (FLT-3L), interleuquina 6 (IL-6) e IGF-2; y cultivo en presencia de SCF, TPO e IGF-2 ^{20, 21}. Los métodos de expansión de CD34⁺ adicionales clínicamente aplicables utilizaron las combinaciones de SCF, TPO, FLT-3L, Interleuquina 3 (IL-3), IL-6 en combinación con el ligando de Notch inmovilizado (Delta1^{ext-IgG}) ²² o compuestos sintéticos pequeños tales como la familia de los antagonistas del receptor de los hidrocarburos arilo, tal como, entre otros, StemRegenin 1 (SR1) en combinación con SCF, TPO, FLT-3L e IL-6 ²³.

La etapa ii de un método de la invención se realiza preferiblemente en un medio de cultivo que comprende tres o más de factor de células madre (SCF), ligando de flt-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleuquina-7 (IL-7) y tres o más del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleuquina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y la proteína inflamatoria de macrófagos de tipo 1 alfa (MIP-

1 alfa). En una realización particularmente preferida, la etapa ii se realiza en un medio de cultivo que comprende el factor de células madre (SCF), el ligando de fit-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleuquina-7 (IL-7); y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleuquina-6 (IL-6). En una realización preferida, dicho medio de cultivo comprende además LIF y MIP-1 alfa. Las cantidades de citoquina añadidas son convencionales en la técnica, se presentan cantidades preferidas en los ejemplos, pero las desviaciones del 10% en la cantidad son muy aceptables y están dentro del alcance de la presente invención. Las cantidades típicas para las citoquinas son TPO: 25 ng/mL; FLT-3L: 25 ng/mL; SCF: 25 ng/mL e IL-7: 25 ng/mL. Para el GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-1 alfa se presenta una cantidad baja, las cantidades típicas son GM-CSF: 10 pg/mL, G-CSF: 250 pg/mL, LIF: 50 pg/mL, MIP-1 alfa: 200 pg/mL e IL-6: 50 pg/mL.

La etapa ii se realiza preferiblemente en un medio de cultivo que comprende heparina, preferiblemente heparinas de bajo peso molecular (LMWH). Las LMWH se usan en clínica, por ejemplo, como anticoagulantes en enfermedades que presentan trombosis o profilaxis de la trombosis. Las LMWH son cadenas cortas de polisacárido. Las LMWH se definen como heparina o sales de heparina que tienen un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2000-10000 Dalton, preferiblemente entre 5000 y 8000 Dalton y más preferiblemente aproximadamente 8000 Dalton, siendo preferiblemente al menos el 60% de las cadenas menor que la longitud promedio de la cadena. Cuando el promedio de heparina de bajo peso molecular es de aproximadamente 8000 Dalton, se prefiere que al menos el 60% de todas las cadenas tengan un peso molecular inferior a 8000 Dalton. Las LMWH pueden obtenerse mediante diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan diversos métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de heparina de bajo peso molecular. A continuación se proporciona una lista no limitativa. Se puede obtener una heparina de la invención de un mamífero u otro organismo tal como caracoles, alternativamente, las heparinas se sintetizan sintéticamente o semisintéticamente. Un ejemplo de esto último es la producción de heparina en bacterias tales como, entre otras, la heparina K5 por *E. coli*. Las modificaciones de heparina tales como, entre otras, acilación, desulfuración y fosforilación también se consideran heparina como se define en esta invención. Los ejemplos no limitantes pero preferidos de tales modificaciones son LMWH completa o parcialmente desulfatada, LMWH completa o parcialmente desulfatada y completa o parcialmente Re-N-acetilada, LMWH completa o parcialmente desulfatada y completa o parcialmente Re-N-sulfatada, sustancia L4 o LMWH completa o parcialmente desulfatada y completa o parcialmente Re-N-fosforilada. Se prefieren las preparaciones de LMWH en las que al menos el 60% de todas las cadenas tienen un peso molecular inferior a 8000 Da. Estas pueden obtenerse por diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan diversos métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de heparina de bajo peso molecular. A continuación se proporciona una lista no limitativa.

La LMWH para uso en la presente invención se deriva preferiblemente de heparina estándar por despolimerización con UFH. La despolimerización oxidativa con peróxido de hidrógeno se usa en la fabricación de ardeparina (Normiflo®). La escisión desaminativa con nitrito de isoamilo se utiliza en la fabricación de certoparina (Sandoparin®). La escisión beta-eliminativa alcalina del éster bencilico de heparina se usa en la fabricación de enoxaparina (Lovenox®) y Clexane®. La despolimerización oxidativa con Cu²⁺ y peróxido de hidrógeno se usa en la fabricación de parnaparina (Fluxum®). La escisión beta-eliminativa por la enzima heparinasa se utiliza en la fabricación de tinzaparina (Innohep® y Logiparin®). La escisión desaminativa con ácido nitroso se usa en la fabricación de dalteparina (Fragmin®), reviparina (Clivarin®) y nadroparina (Fraxiparin®). Cuando está presente en un medio de cultivo, comprende preferiblemente aproximadamente 1-100, más preferiblemente aproximadamente 15-50 mg/L de LMWH.

La expansión de células positivas para CD34, células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas, o una combinación de las mismas, se puede determinar con una serie de pruebas diferentes para la presencia de células positivas para CD34, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas. Dichas pruebas incluyen pruebas de la presencia de la formación de colonias mieloides y/o linfoides *in vitro* y pruebas que miden la repoblación de linajes hematopoyéticos en ratones NOD-SCID que dan soporte a los análisis de citometría de flujo ²⁴.

La etapa de expansión ii se realiza preferiblemente durante un período de al menos 4 días. Más preferiblemente durante al menos 5 días, lo más preferiblemente durante al menos 6, 7, 8 o 9 días y en particular al menos 10 días.

Las células positivas para CD34, las células madre hematopoyéticas, las células progenitoras hematopoyéticas, o una combinación de las mismas obtenidas en el etapa ii, se cultivan en la siguiente etapa iii en un medio de diferenciación de células NK. Las células NK se pueden obtener cultivando las células obtenidas en el etapa ii, en un medio que comprende IL-3 (5 ng/mL), IL-7 (20 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), SCF (20 ng/mL) y FLT-3L (10 ng/mL) ²⁵ o SCF, Flt3-L, IL-7, IL-15, IL-21 y GM-CSF 20 ng/mL cada uno ²⁶ en combinación con células estromales o factor de células madre (SCF) (20 ng/mL), tirosina quinasa similar a FMS (FLT3-L) (20 ng/mL), interleuquina-7 (IL-7) (20 ng/mL), IL-15 (20 ng/mL) e IL-21 (20 ng/mL) ²⁷. En el contexto de la invención, los medios de diferenciación de NK anteriores se proporcionan con la condición de que comprendan además IL-12.

En una realización preferida de la invención, la etapa iii) se realiza con un medio de diferenciación de células NK que además de IL-12 comprende además uno o más de IL-2 e IL-15; y uno o más de IL-7 y SCF; y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-1 alfa. En otra realización preferida, el medio de diferenciación de células NK que comprende IL-12 comprende además uno o más de SCF, IL-2, IL-7 e IL-15 y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-1 alfa. En una realización particularmente preferida, el medio de diferenciación de células NK comprende además de IL-12, los factores SCF, IL-2, IL-7, IL-15, GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-1 alfa. En una realización preferida, dicho medio de

diferenciación de células NK comprende IL-15, SCF e IL-12 y uno o más de IL-2 e IL-7 y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-1 alfa.

5 En cuanto a la etapa iii, las cantidades de citoquina mencionadas en el presente documento que se agregan al medio desde el medio de diferenciación de células NK son convencionales en la técnica, se dan cantidades preferidas en los ejemplos, pero las desviaciones en la cantidad del 10% son bien aceptables y están dentro del alcance de la presente invención. Para IL-15 e IL-2, las cantidades son típicamente las siguientes: IL-15 (20 ng/mL), IL-2 (Proleukin® [Chiron]; 1000 U/mL). Un medio de cultivo es un medio de diferenciación de células NK si contiene al menos IL-15 o IL-2.

10 Parte de la etapa iii se puede realizar en un medio de cultivo que comprende LMWH. Sin embargo, esta etapa a menudo se realiza en ausencia de LMWH. Cuando se incluye LMWH en el medio de diferenciación de células NK, se prefiere que se incluya solo en los primeros días de la etapa iii, preferiblemente en los primeros 4 días de cultivo en la etapa iii. La etapa de cultivo de la etapa iii se realiza preferiblemente durante al menos 7 días, preferiblemente al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13 días. En una realización particularmente preferida, la etapa de cultivo de la etapa iii se realiza durante al menos 14 días.

20 El método para producir células NK como se reivindica en la presente invención se caracteriza porque el medio de diferenciación de células NK comprende entre 0,2 ng/mL y 20 ng/mL de IL-12. En una realización particularmente preferida, dicho medio de diferenciación de NK comprende entre 0,2 ng/mL y 2 ng/mL de IL-12. Sorprendentemente, se ha encontrado que una concentración más baja de IL-12 en un método de la invención da como resultado una mayor cantidad de células positivas para CD56. Este aumento en el número de células puede ser significativo como se indica en la Figura 2. Una concentración más baja también conduce a una pureza sorprendentemente más alta de las células recolectadas positivas para CD56. Un medio de diferenciación de células NK que comprende una mayor cantidad de IL-12 aparentemente da como resultado un número reducido de ciclos de replicación en un método de la invención. Un medio de diferenciación de células NK que comprende una cantidad inferior de IL-12 aparentemente da como resultado un aumento del porcentaje de células positivas para CD56 a partir de las células positivas para CD34 al inicio de la etapa de cultivo iii). Los inventores han descubierto que el porcentaje de células positivas para CD56 que también expresan otro marcador de células NK, tal como preferiblemente NKG2A, CD62L, CD16 y/o KIR, no se ve afectado significativamente a las concentraciones preferidas de IL-12.

30 La densidad celular es preferiblemente de $0,1 \times 10^6$ - 10×10^6 células/mL, más preferiblemente de $0,5 \times 10^6$ - 5×10^6 células/mL. En una realización particularmente preferida, la densidad celular es de 1×10^6 - 3×10^6 /mL. Se prefiere la densidad celular indicada para comenzar la etapa de cultivo de la etapa ii) y/o la etapa iii). Sin embargo, en una realización preferida, la densidad celular se ajusta al menos una vez durante el cultivo a la densidad indicada. En una realización particularmente preferida, la densidad celular se mantiene a la densidad indicada durante el cultivo. Teniendo en cuenta el aumento en el número de células, el ajuste o el mantenimiento de la densidad celular se logra aumentando el volumen del medio de cultivo durante el cultivo. El mantenimiento en este contexto significa mantener la densidad celular dentro del intervalo indicado.

40 La etapa ii) de cultivo y la etapa iii) de cultivo se pueden realizar en un medio de cultivo que comprende 0% - 20% de suero. El medio de cultivo de la etapa ii) comprende preferiblemente de 0% a 20% de suero, más preferiblemente de 2% a 10% de suero. El medio de diferenciación de células NK de la etapa iii) comprende preferiblemente entre 0% - 20% de suero. En una realización preferida, el medio de diferenciación de células NK de la etapa iii) comprende entre 0% y 10% de suero. En una realización particularmente preferida, el medio de diferenciación de células NK de la etapa iii) comprende 0% - 2% de suero. En una realización preferida, dicho suero es suero humano.

50 Se describe adicionalmente una colección de células NK cultivadas obtenibles por un método para producir células NK de la invención. Las células obtenidas y recolectadas pueden usarse para fines de trasplante. Tal trasplante se realiza preferiblemente para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad humana, preferiblemente todas las enfermedades malignas tales como tumores, cáncer, leucemia, así como todas las enfermedades virales, también en situaciones de rechazo de trasplante sólido y enfermedades autoinmunes y pérdida del embarazo.

55 La invención proporciona además una colección *in vitro* de células derivadas de un método para producir células NK de la invención, en el que la colección de células consiste en células en las que al menos el 20% de las células positivas para CD56 expresan CD62L; al menos el 10% de las células positivas para CD56 expresan KIR; o al menos el 20% de las células positivas para CD56 expresan CD16.

60 En una realización preferida, la colección de células derivadas de un método para producir células NK de la invención consiste en células en las que al menos el 50% de las células positivas para CD56, positivas para NKG2A y positivas para CD33 son positivas tanto para KIR como para CD62L.

65 Se describe adicionalmente una colección de recipientes de almacenamiento para células de mamífero, en los que cada uno de dichos recipientes de almacenamiento contiene células derivadas de un cultivo de células madre, células progenitoras o ambas, de tejido postembrionario humano que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas, obtenibles por un método de la invención. Preferiblemente, dicha colección de recipientes de almacenamiento comprende al menos 5 recipientes que contienen cada uno al menos 4×10^8 células NK o células progenitoras NK o ambas. Preferiblemente, dichas células NK y/o células progenitoras NK comprenden marcadores de

superficie celular como se indica en el presente documento. Preferiblemente, dichos recipientes comprenden células recolectadas de un cultivo que fue iniciado por células de una sola fuente, es decir, un solo individuo humano. Típicamente, tales células son genéticamente idénticas. Esto tiene la ventaja de que el control de calidad se puede realizar en una muestra separada. Además, el almacenamiento en recipientes separados permite la administración secuencial del injerto a un humano que lo necesite. Si el individuo responde bien la administración de un injerto, se puede seleccionar un injerto posterior que tenga las mismas propiedades que el injerto con el que el individuo ya había sido tratado. Para este fin, la invención proporciona además un banco de células que contiene una pluralidad de células NK de acuerdo con la invención.

Las células NK o las células progenitoras de las mismas tienen diferentes propiedades dependiendo de la etapa de desarrollo o los marcadores de la superficie celular expresados por las células NK o progenitoras de las mismas. Las células NK que se producen con un método de la invención son particularmente citotóxicas y ejercen una citotoxicidad dependiente de anticuerpos más alta que las células NK producidas de manera diferente. Las células NK de la presente invención tienen una mayor expresión de CD62L que las células NK recién obtenidas y son más adecuadas para la unión de células NK a los ganglios linfáticos. Las células NK de la presente invención también invaden o entran en el tejido mejor que las células NK recién obtenidas. Las células NK de la presente invención también expresan más KIR y exhiben una función mejorada de las células NK en un entorno de donante no compatible con el ligando KIR con respecto al paciente. Las células NK obtenidas por un método de la invención también son particularmente adecuadas para la migración a sitios específicos en el cuerpo. Por ejemplo, las células NK de la presente invención albergan la médula ósea, los ganglios linfáticos, el hígado, el bazo y los pulmones.

La invención proporciona además un método *in vitro* para matar una célula cancerosa con células NK, dicho método caracterizado porque dichas células NK comprenden células NK de una colección de acuerdo con la invención. La invención proporciona además una colección de células NK de acuerdo con la invención, para uso en el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, dicho uso en el tratamiento del cáncer comprende además el tratamiento con un anticuerpo específico para un antígeno presente en las células de dicho cáncer. En una realización preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal terapéutico tal como Rituximab (anti-CD20), Trastuzumab (anti-Her2), Alemtuzumab (anti-CD52), Cetuximab (anti-EGFR), Evacizumab (anti-VEGFA), Panitumumab (anti-EGFR), Ofatumumab (anti-CD20), Gemtuzumab (anti-CD33), Ibritumomab (anti-CD20), Dacetuzumab (anti-CD40), Tremelimumab (anti-CTLA-4), Ipilimumab (anti-CTLA4), OX86 (anti-OX40), CT-011 (anti-PD1), BMS-663513 (anti-CD137), Daclizumab (anti-CD25) o Tositumomab (anti-CD20), en una realización particularmente preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20.

En una realización preferida, dicho cáncer es un cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de trompa de Falopio, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de cerebro. En una realización preferida, dicho cáncer de piel es un melanoma.

En una realización preferida, dicho cáncer es un cáncer de origen hematopoyético como leucemia tal como leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia monocítica aguda (AMOL) y linfomas tales como linfoma de Hodgkin y no Hodgkin y sus subtipos o mieloma múltiple.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Esquema del protocolo de diferenciación de células NK *ex vivo* establecido y modulado. Se muestra la expansión de células madre hematopoyéticas (HSC) *ex vivo* y modulada con IL-12 previamente establecida y el método de diferenciación de células NK. En el protocolo básico, las células UCB CD34⁺ se expandieron por SCF, IL-7, TPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, IL-6 y heparina de bajo peso molecular durante 10 días, seguido de la diferenciación de células NK CD56⁺ por reemplazo de TPO con IL-15 en el día 10 y Flt3L y la heparina de bajo peso molecular por IL-2 en el día 14. Para la modulación del sistema de cultivo con IL-12, en el día 10 se indujo en cultivo la diferenciación de células NK por IL-15 solamente (a) o por IL-15 e IL-12 (b). Las células crecieron hasta un total de al menos 28 días.

Figura 2. Efectos de IL-12 sobre el fenotipo y la pureza de las células NK generadas *ex vivo*. Los efectos de altas y bajas dosis de IL-12 sobre el cultivo de generación de células NK *ex vivo* y el fenotipo de células NK se analizaron mediante citometría de flujo y recuento celular. En un análisis de valoración, el efecto de las concentraciones bajas (10 pg/mL) a altas (20 ng/mL) de IL-12 sobre la pureza de las células NK (A) y la expresión del receptor de células NK (B) se determinaron mediante recuento celular y análisis de citometría de flujo para la expresión de CD56 y la expresión de NKG2A, CD62L, CD16 y KIR en células CD56⁺. Los valores se muestran como media \pm la DE calculados a partir de pozos por triplicado para un experimento representativo en el día 22 del cultivo. (C) Se eligió una concentración de 0,2 ng/mL de IL-12 para experimentos adicionales y se analizó en el día 29 del cultivo para reducir las células cultivadas totales y la pureza de células NK CD56⁺ mediante recuento celular y citometría de flujo para células CD56⁺. El porcentaje medio \pm SEM para varios cultivos independientes (n) se muestra como se indica.

Figura 3. Comparación de la expresión del receptor correlacionada con la citotoxicidad y la unión en células NK diferenciadas *ex vivo* con y sin IL-12. El efecto de 0,2 ng/mL de IL-12 sobre la expresión de varios antígenos de células NK se determinó mediante análisis de

citometría de flujo en el día 29 de diferenciación *ex vivo*. Se muestran gráficos de puntos de citometría de flujo que representan la expresión de CD62L, KIR, CD16 y NKG2A en células CD56⁺ en el cuadrante (A), así como para CCR1, CCR6-8 y CD56 (B) para un cultivo representativo de diferenciación de células NK *ex vivo* inducido con y sin IL-12. La comparación estadística, determinada por análisis de citometría de flujo para 5 experimentos realizados independientemente de diferenciación de células NK *ex vivo* generadas con o sin 0,2 ng/mL de IL-12, se muestra para CD62L, KIR y CD16 como porcentaje medio \pm SEM (C).

Figura 4. Efecto de IL-12 sobre distintas etapas determinadas por CD33 y NKG2A de diferenciación de células NK. Se analizaron células NK *ex vivo* diferenciadas con o sin 0.2 ng/mL de IL-12 por su perfil de maduración con CD33 y NKG2A el día 28 de cultivo. Los gráficos comparativos de puntos de citometría de flujo que revelan la expresión de CD33 y NKG2A se muestran en los paneles superiores izquierdos que indican los cuadrantes para células CD33⁺/NKG2A⁻, CD33⁺/NKG2A⁺, CD33⁻/NKG2A⁺ y CD33⁻/NKG2A⁻ que se analizaron adicionalmente para determinar la expresión de KIR y CD62L en los paneles encuadrados en forma consecutiva. Se muestra un ejemplo representativo de 3 cultivos analizados.

Figura 5. Perfil de expresión de CD56 de células NK moduladas con IL-12 diferenciadas *ex vivo*. El nivel de expresión de CD56 en correlación con CD62L, NKG2A, KIR y CD16 se comparó en el análisis de citometría de flujo para células NK diferenciadas *ex vivo* CD56⁺ en el cuadrante con o sin modulación de IL-12 durante el cultivo. Se muestra un experimento representativo que reveló niveles de inducción fuertes particulares para CD62L, KIR y CD16.

Figura 6. Análisis de las capacidades adhesivas y migratorias de células NK diferenciadas *ex vivo* e inducidas por IL-12. (A) Comparación de células NK generadas *ex vivo*, que se generaron con o sin 0,2 ng/mL de IL-12, para la adhesión a células endoteliales linfáticas. Las células NK generadas *ex vivo* a partir del día 28 de cultivo se purificaron y posteriormente se usaron en ensayos de adhesión en células endoteliales linfáticas (LectTERT) o células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Se muestran los valores porcentuales medios \pm SEM calculados a partir de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

Figura 7. Capacidades citotóxicas de células NK diferenciadas *ex vivo* en correlación con la modulación de IL-12 durante el cultivo. Las células NK estimuladas con o sin IL-12 se cultivaron con K562 (barras de color gris claro) o KG1a (barras de color gris oscuro) a una relación efector:objetivo (relación E:T) de 1:1 durante la noche por 18 h. Los cocultivos se analizaron para determinar la citotoxicidad (A) o la desgranulación de CD107a (B).

Figura 8. Relación de la citotoxicidad mejorada dependiente de anticuerpos y modulación de IL-12 durante la generación de células NK *ex vivo*. Las células NK generadas *ex vivo* a partir del día 28 de cultivo con y sin inducción de 0,2 ng/mL de IL-12 se purificaron y posteriormente se usaron en ensayos de eliminación con liberación de europio. Las líneas celulares objetivo de células B 7221.221, REH, UoCB6, Nalm-6 y SEM se usaron en varias relaciones efector a objetivo y se marcaron previamente con el anticuerpo terapéuticamente usado Rituximab si está indicado. Los valores medios \pm DE calculados a partir de pozos por triplicado se muestran para un experimento representativo realizado.

Figura 9: las células UCB-NK en combinación con rhIL-15 median la respuesta antileucémica *in vivo*. Se inyectaron ratones NSG adultos en su fémur derecho con 10⁵ células K562 AML que expresaban luciferasa. Al día siguiente, los ratones fueron tratados con 20x10⁶ células UCB IL-12-NK en forma i.v. combinado con administración i.p. de IL-15 (0.5 μ g/ratón en forma i.p. cada 2-3 días durante 14 días), o recibieron PBS o IL-15 solos como control (n = 6 por grupo). La carga tumoral se controló mediante imágenes de bioluminiscencia desde el día 8 después de la inoculación de células de AML y luego cada 3-4 días. (A) BLI el día 15 después de la inyección de células tumorales. (B) Seguimiento de la carga tumoral *in vivo* por BLI, media \pm DE. (C) Tiempo hasta la primera detección del tumor. (D) Curva de supervivencia

Ejemplos

Materiales y métodos

Aislamiento de CBMC y enriquecimiento de células madre y progenitoras CD34⁺. Se obtuvieron muestras de sangre del cordón umbilical humano (UCB) al nacer después del parto normal a término completo y el consentimiento informado por escrito con respecto al uso científico y fueron suministradas por VivoCell Biosolutions AG (Graz, Austria) dentro de AKH Viena, Austria o del banco de sangre de cordón umbilical del Centro Médico Nijmegen de la Universidad Radboud (RUNMC, Nijmegen, Países Bajos). Las células mononucleares se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad (medio de separación de linfocitos LSM 1077, PAA Laboratories GmbH, Graz, Austria) y se marcaron con el reactivo CliniMACS CD34 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). La selección de células CD34⁺ se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y después del procedimiento de enriquecimiento, se recogió la fracción de células CD34⁺, y se analizaron el número y la pureza de células por citometría de flujo. Finalmente, las células UCB CD34⁺ obtenidas se usaron directamente para el bioproceso de generación de células NK.

Expansión y diferenciación *ex vivo* de células progenitoras CD34⁺. Las células UCB CD34⁺ se transfirieron a placas de cultivo y se expandieron y diferenciaron de acuerdo con el método de cultivo III como se describió anteriormente ¹⁵. En

resumen, las células UCB se marcaron con el reactivo CliniMACS CD34 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) y las células CD34⁺ se seleccionaron por aislamiento magnético (Separador Miltenyi MACS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recogieron células CD34⁺, se estableció el número y pureza de células mediante citometría de flujo y las células se usaron para la generación de células NK.

5 Las células UCB CD34⁺ se transfirieron a placas de cultivo y se expandieron y diferenciaron según el método de cultivo III como se describió anteriormente ¹⁵. En resumen, las células CD34⁺ se expandieron durante 10 días en GBGM® complementado con una dosis alta de los factores SCF (27 ng/mL, CellGenix, Friburgo, Alemania), IL-7 (25 ng/mL, Stemcell Technologies, Grenoble, Francia), TPO (25 ng/mL, Stemcell Technologies), Flt3L (25 ng/mL, CellGenix) y una dosis baja de los factores G-CSF (250 pg/mL, Stemcell Technologies), GM-CSF (10 pg/mL, Stemcell Technologies) e IL-6 (50 pg/mL, CellGenix) como se muestra en la Figura 1A. La diferenciación se indujo reemplazando TPO por IL-15 (20 ng/mL, CellGenix) el día 10 y Flt3L por IL-2 (1000 U/mL, Chiron, Múnich, Alemania). Durante los primeros 14 días de cultivo, se incluyó heparina de bajo peso molecular (25 mg/mL, Abbott, Wiesbaden, Alemania) en el medio de crecimiento. Las células crecieron hasta un total de al menos 28 días.

15 Para la inducción, se añadió rh-IL12 (Immunotools, Friesoythe, Alemania) desde el día 10 en adelante a una concentración de 0.2 ng/mL (si no se indica otra cosa).

Para estudios funcionales, las células NK generadas *ex vivo* se purificaron con microperlas de CD56 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se usaron directamente en ensayos funcionales.

Líneas celulares

20 La línea celular K562 (LGC Standards, Wesel, Alemania) se cultivó en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Invitrogen, Carlsbad CA, EE. UU.) que contenía 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y suero fetal de ternera al 10% (FCS; Integro, Zaandam, Los Países Bajos). Las líneas celulares de leucemia precursoras de células B humanas 721.221, SEM, REH, Nalm-6 y UoC-B6 se cultivaron en RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Viena, Austria) que contenía 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina (Laboratorios PAA) GmbH, Graz, Austria) y suero fetal de ternera al 10%.

30 Las células endoteliales linfáticas transfectadas de manera estable con hTERT (LectERT) fueron amablemente proporcionadas por el Prof. Dr. Dotscho Kerjaschki AKH Viena, Austria, cultivadas en medio DMEM (Invitrogen, Fisher Scientific GmbH, Viena, Austria) que contenía 50 U/mL de penicilina, Estreptomina 50 µg/mL (PAA Laboratories GmbH, Graz, Austria) y suero fetal de ternera al 20% y se seleccionaron con 100 µg/mL de higromicina (Invitrogen, Fisher Scientific GmbH, Viena, Austria).

35 Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUEVC) se aislaron como se describió anteriormente ²⁸ y se cultivaron en medio EGM-2 (Bio Whittacker, Lonza, Verviers, Bélgica).

Citometría de flujo

40 El número de células y la expresión de marcadores de superficie celular se determinaron por citometría de flujo. Para la tinción inmunofenotípica, las células fueron incubadas con reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi Biotec), incubadas con la concentración apropiada de anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C. Después del lavado, se midió la expresión usando un FACSCalibur y se analizó con el software CellQuestPro (ambos de BD Biosciences). Para determinar la pureza y el fenotipo de las células cultivadas se usaron los siguientes anticuerpos: clon CD3-FITC UCHT1 (Immunotools), clon CD56-APC NCAM16.2 (BD Biosciences), clon NKG2A-PE Z199.1.10 (Beckman Coulter), CD16-PE clon 3G8 (BD Biosciences), CD62L-FITC clon LT-TD180 (Immunotools), KIR-FITC clon 180704 (R&D Systems), CXCR3 (R&D Systems), CXCR4 (BioLegend), CXCR5 (R&D Systems), CCR1 (R&D Systems), CCR7 (R&D Systems), CCR6 (BioLegend).

Ensayo de adhesión

50 Las células NK generadas y purificadas *ex vivo* se transfirieron a células LectERT confluentes y se incubaron en RPMI-1640 durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador con movimiento tipo danza de vientre. Después de un lavado exhaustivo, las células se tripsinizaron, se tiñeron con CD56-APC y se analizaron como se describió bajo el título Citometría de flujo.

Ensayo de citotoxicidad

55 Los ensayos de citotoxicidad basados en citometría de flujo se realizaron como se describió anteriormente ^{14, 15}. En resumen, después de la incubación durante 4 horas o durante la noche a 37 °C, se recogieron 50 µL de sobrenadante y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior para medir la producción de citoquinas. Se recogieron las células en el volumen restante y se cuantificó el número de células objetivo viables mediante citometría de flujo. La supervivencia de las células objetivo se calculó de la siguiente manera: % de supervivencia = {[no. absoluto de células objetivo CFSE⁺ viables cocultivadas con células NK]/[no. absoluto de células objetivo CFSE⁺ viables cultivadas en medio]}*100%. El porcentaje específico de lisis se calculó de la siguiente manera: % de lisis = {100 - [% supervivencia]}. La desgranulación de células NK durante el cocultivo se midió mediante la expresión en la superficie celular de CD107a ²⁹. Después de 18 horas de incubación a 37 °C, se determinó el porcentaje de células CD107a⁺ por citometría de flujo.

65 Ensayo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos usando Rituximab

La actividad citotóxica dependiente de anticuerpos contra varias líneas celulares de leucemia precursora de células B humanas 721.221, SEM, REH, Nalm-6 y UoC-B6 se midió por triplicado dentro de un ensayo de eliminación con liberación de europio como se describió anteriormente ³⁰. Las células objetivo se marcaron con EuDTPA (dietilentriaminopentaacetato de europio), posteriormente se lavaron y se incubaron con 10 µg/mL de Rituximab (amablemente proporcionado por AKH Viena, Austria) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo, se incubaron 2 x 10³ células objetivo durante 4 h con células efectoras NK purificadas a diversas relaciones E:T en RPMI - 1640 sin rojo de fenol (PAA Laboratories, Pasching, Austria) complementado con FCS al 10%. La liberación máxima de EuDTPA se determinó mediante incubación con Triton X-100 al 1%. Los valores para la liberación específica de EuDTPA se determinaron con solución potenciadora Delfia (Perkin Elmer, Brunn am Gebirge, Austria) mediante fluorescencia liberada con el tiempo. La citotoxicidad específica se calculó como porcentaje específico de liberación de EuDTPA = (muestra media - liberación espontánea media)/(liberación máxima media - liberación espontánea media) x 100.

15 Estadística

Los resultados de los experimentos realizados por triplicado se describen como la media ± desviación estándar de la media (DE). Los resultados de los experimentos individuales se muestran como la media ± el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Un valor p <0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

25 Una dosis baja de IL-12 mejora la expresión de los antígenos de células NK CD16, KIR y CD62L durante la diferenciación de células NK *ex vivo*

Inicialmente, el objetivo era analizar el impacto de varias citoquinas como IL-12, IL-18 o IL-21 en nuestro método de diferenciación de células NK humanas *ex vivo* recientemente establecido y caracterizado además del uso de IL-15 e IL-2 ^{14, 15}, para conducir a un fenotipo de células NK a la medida. Para las citoquinas IL-18 e IL-21 no se encontró una mejora significativa con respecto a la expansión o activación del producto de células NK generado *ex vivo* (datos no mostrados). Sin embargo, se encontró que dosis bajas de IL-12 podrían modificar significativamente el procedimiento de generación de células NK. Durante el cultivo, en el día 10 después de la expansión de las células madre hematopoyéticas, se añadieron simultáneamente IL-15 e IL-12 para inducir la diferenciación de células NK (Figura 1). Se analizó en detalle el efecto sobre la diferenciación de células NK de diferentes concentraciones de IL-12 que van desde 10 pg/mL a 20 ng/mL. El porcentaje de células NK dentro del sistema de cultivo disminuyó con concentraciones crecientes de IL-12 (Figura 2A), mientras que la expresión de CD62L, CD16 y KIR en células NK CD56⁺ se elevó con dosis más altas de IL-12 (Figura 2B). Este análisis de respuesta a la dosis reveló que una concentración de 0.2 ng/mL de IL-12 fue suficiente para mejorar significativamente la expresión del receptor de superficie en las células NK generadas *ex vivo*, pero no resulta en una pureza significativamente menor del producto final de células NK (Figura 2A). Una vez seleccionada la pureza de la concentración más óptima de IL-12 y otros experimentos revelaron, que el impacto general de 0.2 ng/mL de IL-12 en el sistema de cultivo revela una reducción tolerable en el recuento total de células en lugar de un impacto en la pureza misma de las células NK (Figura 2C).

Después de determinar la concentración óptima de IL-12, se analizó con más detalle el impacto de esta citoquina en el fenotipo de las células NK diferenciadas *ex vivo*. Debido al posible uso terapéutico de las células NK generadas *ex vivo*, se centraron las observaciones en receptores que están relacionados con la actividad citotóxica de las células NK y receptores que son relevantes para las capacidades de migración de las células NK. En primer lugar, IL-12 mejoró la expresión del receptor activador de citotoxicidad dependiente de anticuerpos FcγIII/CD16 y los niveles de expresión de KIR en comparación con las células NK generadas con el sistema de cultivo basal (Figura 3A). En segundo lugar, L-Selectina y un repertorio específico de receptores de quimioquinas de CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4 y CXCR5 exhibió una alta expresión en células NK diferenciadas *ex vivo* moduladas por IL-12 (Figura 3B). En resumen, el fenotipo general de las células NK moduladas con IL-12 durante la diferenciación *ex vivo* revela una generación a la medida de células NK que expresan CD62L, CD16, KIR, CCR1, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4 y CXCR5.

55 IL-12 fuerza una transición más rápida de células NK CD33⁺NKG2A⁻ hacia CD33⁺NKG2A⁺CD56⁺ de etapas de desarrollo dentro del cultivo de diferenciación de células NK *ex vivo*

Las células NK se dividen clásicamente en células NK CD56^{briante} y CD56^{atenuada}, y ambas exhiben una expresión especializada del receptor y funciones correlacionadas. La influencia de IL-12 en la expresión de CD62L y particularmente KIR y CD16 planteó la cuestión de si este fenotipo se correlaciona con una etapa más madura de diferenciación de células NK, ya que estos antígenos de células NK se expresan más prominentemente en células NK de sangre periférica CD56^{atenuada} maduras. Recientemente, se describieron los subconjuntos de desarrollo de células NK descritos por la expresión de CD33 y NKG2A ³¹. Cuando se comparó la composición de las etapas de desarrollo determinadas por la expresión de CD33 y NKG2A, se observó una mayor proporción de células NK CD33⁺NKG2A⁺ más maduras en IL-12 modulada (63%) que en cultivos normales (39%) pero un porcentaje menor de células NK CD33⁺NKG2A⁻ (23% frente a 46%) CD56⁺ (Figura 4). Además, la expresión mejorada de CD62L y KIR observada dentro de esta proporción ampliada

de células NK CD33⁺NKG2A⁺ enfatiza que una mayor proporción de las células NK generadas *ex vivo* inducidas por IL-12 residen en una etapa avanzada de desarrollo (Figura 4 , paneles en cuadrados).

En cultivos de diferenciación de células NK moduladas con IL-12 que exhiben niveles de inducción particularmente altos de CD62L, CD16 y KIR, también se pudo identificar una correlación con la aparición de un fenotipo CD56^{atenuada}. El análisis de citometría de flujo reveló que algunos cultivos exhibían células NK CD56^{atenuada} responsables de la expresión mejorada de CD62L, CD16 y KIR por las células NK CD56⁺ generadas *ex vivo* (Figura 5). Todos estos datos indican una diferenciación de células NK avanzada inducible por IL-12.

Ex vivo con células NK generadas por IL-12 muestran una función adhesiva mejorada en células endoteliales linfáticas

Las moléculas implicadas en la adhesión a los tejidos linfáticos, a saber, CD62L, y los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR6-8 que permiten la migración hacia los gradientes de quimioquinas, guiando así la migración a los tejidos, mostraron una expresión elevada en células NK moduladas con IL-12. Por lo tanto, se realizaron ensayos *in vitro* para examinar si el fenotipo de células NK inducidas por IL-12 se correlaciona con una mejor adhesión en respuesta a los tejidos linfoides (Figura 6). Los ensayos que comparan la adhesión a las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) o las células endoteliales linfáticas (LEC) mostraron que las células NK diferenciadas *ex vivo* inducidas por IL-12 se adhirieron significativamente mejor a las células LEC que a las HUVEC, mientras que las células NK moduladas por IL-12 no exhibieron ninguna adhesión mejorada a las células LEC en comparación con las HUVEC (Figura 6).

En resumen, estos datos revelan que la modulación de la diferenciación de células NK por IL-12 conduce a células NK con adherencia mejorada que podría ejercer ciertas capacidades migratorias que potencialmente permiten una mayor unión a diversos tejidos.

Las células NK generadas *ex vivo* modificadas por IL-12 ejercen una mayor capacidad de destrucción hacia objetivos de AML y revelaron reacciones mejoradas de citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Debido a la expresión KIR mejorada y la etapa de diferenciación avanzada de las células NK generadas *ex vivo* inducidas por IL-12, nuestro objetivo fue analizar si esto podría correlacionarse con la citotoxicidad mejorada en ensayos de destrucción *in vitro* (Figura 7). Los ensayos que combinan un análisis de la eficacia de destrucción y la actividad de CD107a contra la línea celular objetivo clásica K562 negativa para MHC clase I y la línea celular KG1a positiva para MHC clase I revelaron un mejor reconocimiento y actividad de las células NK generadas *ex vivo* moduladas por IL-12 en comparación con las no inducidas por IL-12 (Figura 7 A y B). La expresión mejorada de CD16 de las células NK diferenciadas bajo la modulación de IL-12 supone una influencia en su citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). La disponibilidad de anticuerpos terapéuticos contra muchos tumores malignos humanos diferentes planteó la cuestión de si el efecto de estos anticuerpos puede combinarse y potenciarse con la citotoxicidad de las células NK generadas *ex vivo* moduladas por IL-12. Por lo tanto, se comparó la eficacia de destrucción de células NK *ex vivo* generadas con o sin inducción por IL-12 por su eficacia de destrucción contra varias líneas de células B tratadas previamente con el anticuerpo terapéutico específico de células B Rituximab (Figura 8). Todas las líneas de células B probadas, a saber, 721.221, REH, SEM, Nalm-6 y UoC-B6, fueron significativamente mejor lisadas por las células NK cuando fueron tratadas previamente con Rituximab. Además, las células NK moduladas con IL-12 exhibieron mejores capacidades de destrucción contra todas las líneas de células B recubiertas con Rituximab que las células NK generadas *ex vivo* no inducidas con IL-12. Estos datos sobre la citólisis mejorada de células objetivo malignas tratadas con anticuerpos terapéuticos y *ex vivo* con células NK diferenciadas con IL-12 revelan un nuevo aspecto y funcionalidad de esta combinación de agentes terapéuticos. Por lo tanto, las células NK inducidas por IL-12 diferenciadas *ex vivo* revelan un impacto terapéutico presumible de estas células en combinación con los diversos anticuerpos terapéuticos disponibles.

Discusión

El sistema de diferenciación *ex vivo* recientemente establecido para la generación a gran escala de células NK humanas tiene un gran potencial para inmunoterapias adoptivas de cáncer ^{14, 15}. Sin embargo, una generación de células NK adaptada y modulada hacia fenotipos y funciones específicas facilitaría el uso terapéutico de estas células en una gama aún más amplia de tumores malignos. Por lo tanto, se han analizado varias citoquinas por su impacto en la diferenciación de células NK *ex vivo* y se ha encontrado que IL-12 es un modulador especialmente fuerte dentro de este proceso. Bajo la influencia de IL-12 durante la diferenciación de células NK *ex vivo*, las células NK generadas adquirieron una mayor expresión de los receptores KIR y CD16 relacionados con la citotoxicidad, así como CD62L y un repertorio específico de receptores de quimioquinas de los receptores CCR6, 7 y CXCR3-5 relacionados con las capacidades de unión y migración de células NK. Es importante destacar que la concentración optimizada de IL-12 garantizó la pureza del producto de células NK al tiempo que permitió un fenotipo mejorado de células NK correlacionado con funciones correspondientes mejoradas.

Estudios anteriores revelaron la imagen de que las células NK de sangre periférica inducidas por IL-12 (PBNK) adquieren la expresión CD56^{brillante} y exhiben células NK maduras y terminalmente diferenciadas, aunque hallazgos experimentales discordantes llevaron a esta idea. Por un lado, IL-12 indujo un fenotipo de célula NK CD56^{brillante} mediante sobreexpresión de CD94 y CD62L y una modulación descendente de CD16 ¹⁰. Por otro lado, se demostró que las células PBNK CD16⁺ CD56⁺ tratadas con IL-12 en combinación con IL-2 e IL-15 desarrollaron la expresión de CD16 junto con una expresión de CD56^{brillante} ³². Sin embargo, estos estudios destacaron el impacto de IL-12 en la expresión y función del receptor de

células NK. En contraste, otros han diseccionado subconjuntos de células NK humanas sobre la base de la expresión de CD56 y CD16 y sugirieron que las células NK CD56^{brillante} CD16⁺ representan una etapa intermedia de maduración de células NK entre células NK CD56^{brillante} CD16⁻ y CD56^{atenuada} CD16⁺ que ya exhiben capacidad funcional completa ³³. Recientemente, se identificaron distintas etapas de desarrollo de células NK humanas sobre la base de la expresión de CD33 y NKG2A ³¹. Por lo tanto, se puede fortalecer aún más la idea de que las células NK generadas *ex vivo* moduladas por IL-12 exhiben un fenotipo de células NK más maduras debido a la mayor proporción de células NK CD33⁺NKG2A⁺ y, al menos en cultivos con inducción especialmente alta del receptor, que surge de la subpoblación de células NK CD56^{atenuada}. Además, mientras que la expresión de CD16 y KIR y la mayor proporción de células NK CD33⁺NKG2A⁺ y CD56^{atenuada} favorece la idea de células NK más maduras, la inducción de CD62L por IL-12 durante la diferenciación de células NK *ex vivo* no es contradictorio. Un estudio reciente reveló que las células PBNK CD62L⁺ CD56^{atenuada} exhiben el repertorio funcional completo de la producción de citoquinas de células NK y la citotoxicidad y probablemente también representan una etapa intermedia de diferenciación de células NK hacia células NK CD56^{atenuada} (CD16⁺ KIR⁺) CD62L⁻ citotóxicas ³⁴.

CD62L es un receptor importante que guía a las células NK dentro y fuera de los ganglios linfáticos a través de interacciones con ligandos en vénulas endoteliales altas y por ejemplo, el ligando receptor de manosa (MMR) a lo largo del endotelio linfático aferente y eferente ^{35, 36}. Además de las moléculas de adhesión tales como CD62L, los receptores de quimioquinas específicos guían a las células NK hacia los tejidos linfoides y los sitios de inflamación de los tejidos a lo largo de gradientes quimiotácticos. Por lo tanto, también la inducción del repertorio de receptores de quimioquinas CCR1, 6-7 y CXCR3-5 en células NK generadas *ex vivo* inducidas por IL-12 hace que estas células tengan un potencial de funciones migratorias mejoradas, como ya podríamos evidenciar en ensayos *in vitro* para la adhesión a las células endoteliales linfáticas, que podrían ser aprovechables para terapias de leucemia linfoide, linfomas o tumores sólidos.

Los primeros estudios ya indicaron la potencia de IL-12 para modular la diferenciación hacia una célula NK citotóxica y productora de IFN- γ ¹⁶. En los últimos años, los estudios evidenciaron estos hallazgos en pacientes con disfunciones en las vías de señalización de IL-12 que revelaron la necesidad del cebado de células NK a través de IL-12 para la adquisición de actividad funcional ¹⁷. La adquisición de funciones de células NK citotóxicas y productoras de IFN- γ por IL-12 ya estaba correlacionada con la expresión inducida del factor 1 regulador de IFN (IRF-1) y los genes de perforina ^{18, 19}. En línea con esto, nuestros ensayos de destrucción *in vitro* contra la línea celular KGla positiva para MHC clase I y K562 negativa para MHC clase I confirmaron una actividad citotóxica mejorada de las células NK diferenciadas *ex vivo* inducidas por IL-12 y respaldan su posible impacto mejorado en terapias antitumorales.

Una característica de las células NK CD56^{atenuada} es la capacidad de lisar células objetivo recubiertas con anticuerpos, un fenómeno denominado citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) que está mediado a través del receptor CD16/Fc γ III. La expresión mejorada de CD16 de células NK diferenciadas *ex vivo*, bajo la influencia de IL-12, podría utilizarse en entornos terapéuticos que combinan la actividad citotóxica de células NK con anticuerpos terapéuticos contra células malignas. Los estudios ya revelaron el potencial y la importancia de, por ejemplo, el anticuerpo terapéutico Rituximab que reconoce CD20 en leucemias de células B en combinación con células PBNK humanas ^{37, 38}. Esto corrobora la capacidad funcional mejorada y la posible utilización terapéutica de las células NK diferenciadas *ex vivo* moduladas por IL-12 en combinación con anticuerpos terapéuticos, que ya se pudieron confirmar en ensayos de ADCC *in vitro* contra varias líneas de células B recubiertas con anticuerpos Rituximab.

En conjunto, los hallazgos indican que IL-12 es un modulador auspicioso de la diferenciación de células NK que puede explotarse para generar células NK con fenotipos y funciones específicas. Además, esto tiene un gran potencial y promete el uso adicional de estas células en terapias de tumores sólidos, especialmente linfoides, y en entornos clínicos de combinación que acompañan a los anticuerpos terapéuticos.

Referencias

1. Cooper, M.A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146-3151 (2001).
2. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640 (2001).
3. Di Santo, J.P. Natural killer cells: diversity in search of a niche. *Nat Immunol* 9, 473-475 (2008).
4. Moretta, L. Dissecting CD56^{atenuada} human NK cells. *Blood* 116, 3689-3691 (2010).
5. Romagnani, C. et al. CD56^{bright}CD16⁻ killer Ig-like receptor⁻ NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{atenuada} NK cells upon activation. *J Immunol* 178, 4947-4955 (2007).
6. Berahovich, R.D., Lai, N.L., Wei, Z., Lanier, L.L. & Schall, T.J. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol* 177, 7833-7840 (2006).
7. Robertson, M.J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71, 173-183 (2002).
8. Trinchieri, G. & Gerosa, F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59, 505-511 (1996).
9. McDyer, J.F., Wu, C.Y. & Seder, R.A. The regulation of IL-12: its role in infectious, autoimmune, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 102, 11-15 (1998).
10. Loza, M.J. & Perussia, B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56⁺high stage and effector functions. *J Immunol* 172, 88-96 (2004).
11. Saez-Borderias, A. et al. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates

- CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol* 182, 829-836 (2009).
12. Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7, 329-339 (2007).
13. Sutlu, T. & Alici, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med* 266, 154-181 (2009).
- 5 14. Spanholtz, J. et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PLoS One* 6, e20740 (2011).
15. Spanholtz, J. et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One* 5, e9221 (2010).
- 10 16. Bennett, I.M. et al. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates *in vitro* in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 184, 1845-1856 (1996).
17. Guia, S. et al. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells *in vivo*. *Blood* 111, 5008-5016 (2008).
18. Galon, J., Sudarshan, C., Ito, S., Finbloom, D. & O'Shea, J.J. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 162, 7256-7262 (1999).
- 15 19. Yamamoto, K., Shibata, F., Miyasaka, N. & Miura, O. The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1245-1252 (2002).
20. Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood* 103, 2513-2521 (2004).
- 20 21. Zhang, C.C. & Lodish, H.F. Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during *ex vivo* expansion. *Blood* 105, 4314-4320 (2005).
22. Delaney, C. et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 16, 232-236 (2010).
23. Boitano, A.E. et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345-1348 (2010).
- 25 24. Doulatov, S. et al. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11, 585-593 (2010).
25. Grzywacz, B., Kataria, N., Blazar, B.R., Miller, J.S. & Verneris, M.R. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 117, 3548-3558 (2011).
- 30 26. Vacca, P. et al. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 2402-2407 (2011).
27. Moroso, V. et al. NK cells can generate from precursors in the adult human liver. *Eur J Immunol* 41, 3340-3350 (2011).
28. Wojta, J., Hoover, R.L. & Daniel, T.O. Vascular origin determines plasminogen activator expression in human endothelial cells. Renal endothelial cells produce large amounts of single chain urokinase type plasminogen activator. *J Biol Chem* 264, 2846-2852 (1989).
- 35 29. Alter, G., Malenfant, J.M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22 (2004).
30. Blomberg, K., Granberg, C., Hemmila, I. & Lovgren, T. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *J Immunol Methods* 86, 225-229 (1986).
- 40 31. Eissens, D.N. et al. Defining Early Human NK Cell Developmental Stages in Primary and Secondary Lymphoid Tissues. *PLoS One* 7, e30930 (2012).
32. Takahashi, E. et al. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56^{atenuada} NK cells. *Scand J Immunol* 65, 126-138 (2007).
33. Beziat, V. et al. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *J Immunol* 186, 6753-6761 (2011).
- 45 34. Juelke, K. et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56^{atenuada} NK cells. *Blood* 116, 1299-1307 (2010).
35. Irjala, H. et al. Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med* 194, 1033-1042 (2001).
- 50 36. Marttila-Ichihara, F. et al. Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking. *Blood* 112, 64-72 (2008).
37. Bhat, R. & Watzl, C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells-enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One* 2, e326 (2007).
38. Binyamin, L. et al. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol* 180, 6392-6401 (2008).
- 55

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células NK, comprendiendo dicho método
- 5 i- una muestra de células humanas positivas para CD34 que se proporcionan,
ii- expandir dichas células positivas para CD34 *ex vivo*,
iii- cultivar células positivas para CD34 obtenidas en la etapa ii *ex vivo* en un medio de diferenciación de células NK,
dicho método caracterizado porque dicho medio de diferenciación de NK comprende entre 0,2 ng/mL y 20 ng/mL de IL-
10 12.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio de diferenciación de NK comprende entre 0,2
ng/mL y 2 ng/mL de IL-12.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa ii) se realiza con un medio de cultivo que comprende
tres o más del factor de células madre (SCF), ligando de flt-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleuquina-7 (IL-7) y
tres o más del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de
granulocitos (G-CSF), interleuquina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y la proteína inflamatoria de macrófagos de
20 tipo 1 alfa (MIP-I alfa).
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa iii) se realiza con un medio
de diferenciación de células NK que comprende uno o más de IL-2 e IL-15; y uno o más de IL-7 y SCF; y tres o más de
GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la etapa ii) se realiza en medio de
cultivo que comprende heparina de bajo peso molecular.
6. Una colección de células NK que consta de células en las que al menos el 50% de las células positivas para CD56,
positivas para NKG2A y positivas para CD33 son positivas tanto para KIR como para CD62L, obtenibles por el método de
30 acuerdo con la reivindicación 1.
7. Un banco de células que comprende una colección de células NK de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Un método *in vitro* para matar células cancerosas con células NK, dicho método caracterizado porque dichas células
35 NK comprenden una colección de acuerdo con la reivindicación 6.
9. Una colección de células NK de acuerdo con la reivindicación 6, para usar en el tratamiento del cáncer, en la que
preferiblemente dicho tratamiento contra el cáncer comprende además el tratamiento con un anticuerpo específico para
un antígeno presente en las células de dicho cáncer.
- 40 10. Una colección de células NK de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la
que dicho cáncer es un cáncer de origen hematopoyético.
- 45 11. Una colección de células NK de acuerdo con la reivindicación 6, para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la
reivindicación 10, en la que dicho anticuerpo es específico para CD20.

Figura 1

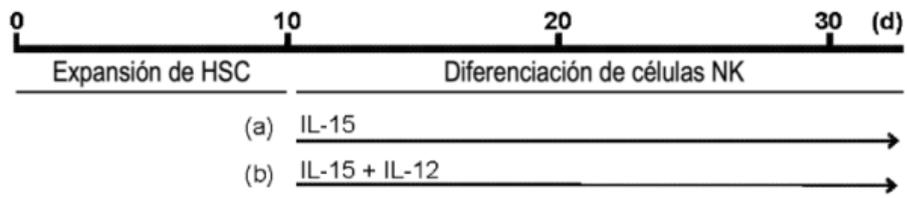


Figura 2

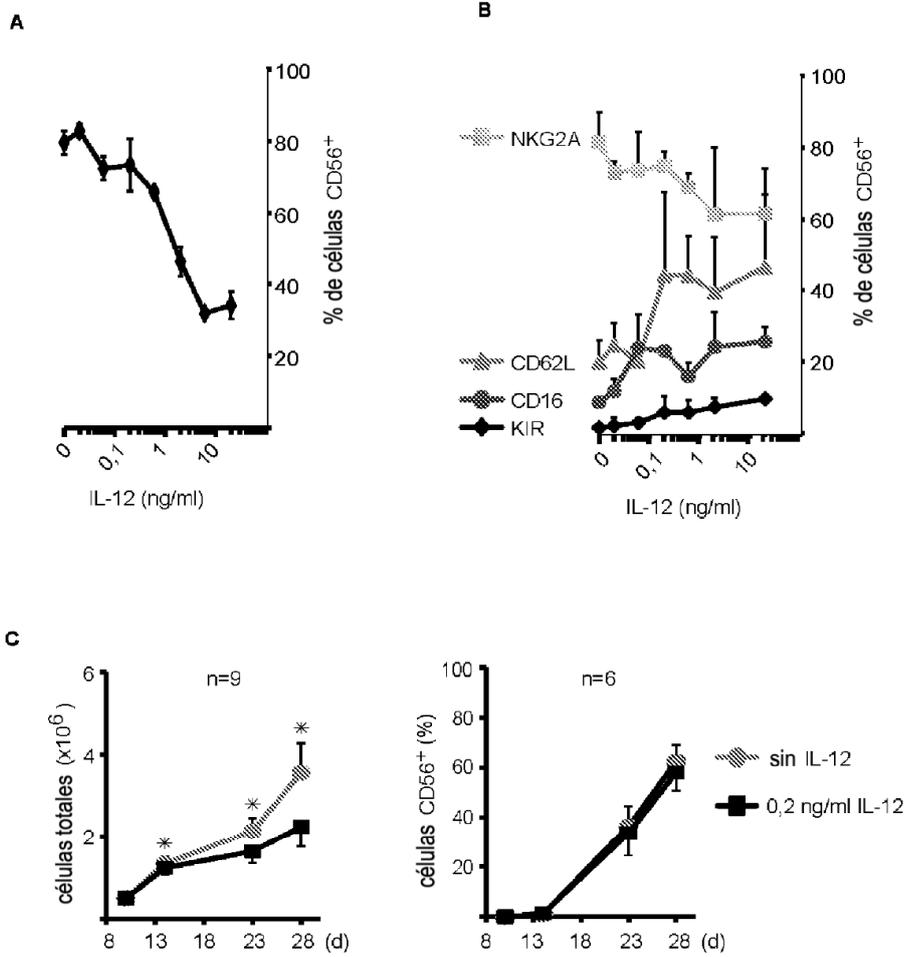


Figura 3

A

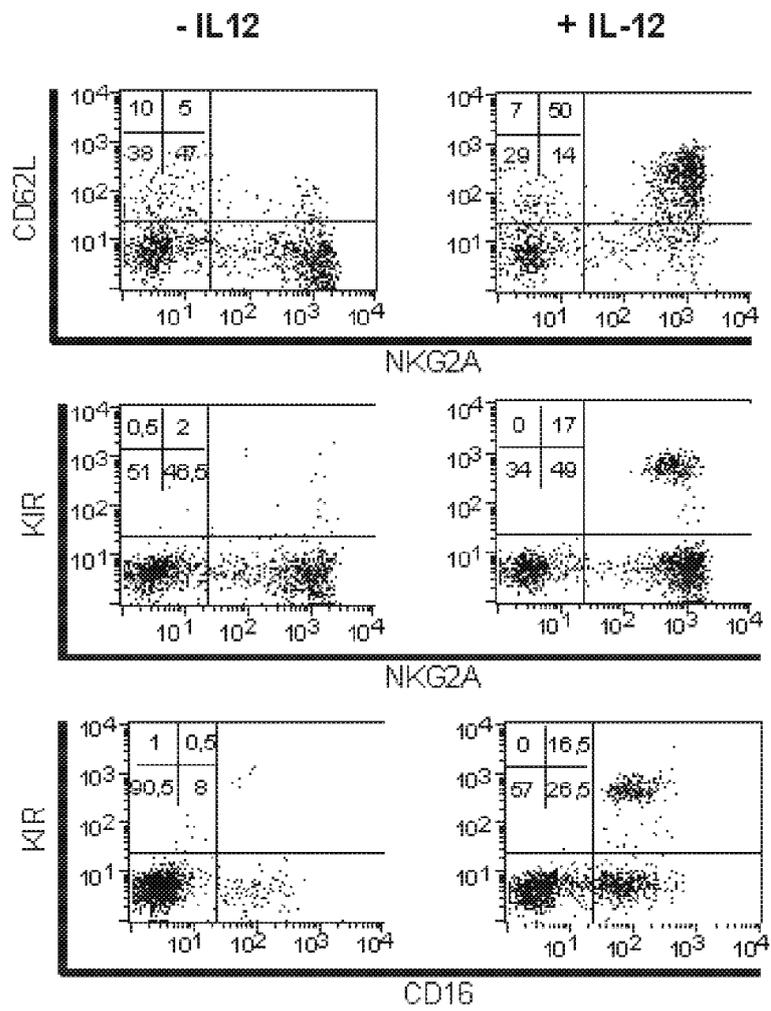


Figura 3 continuación
B

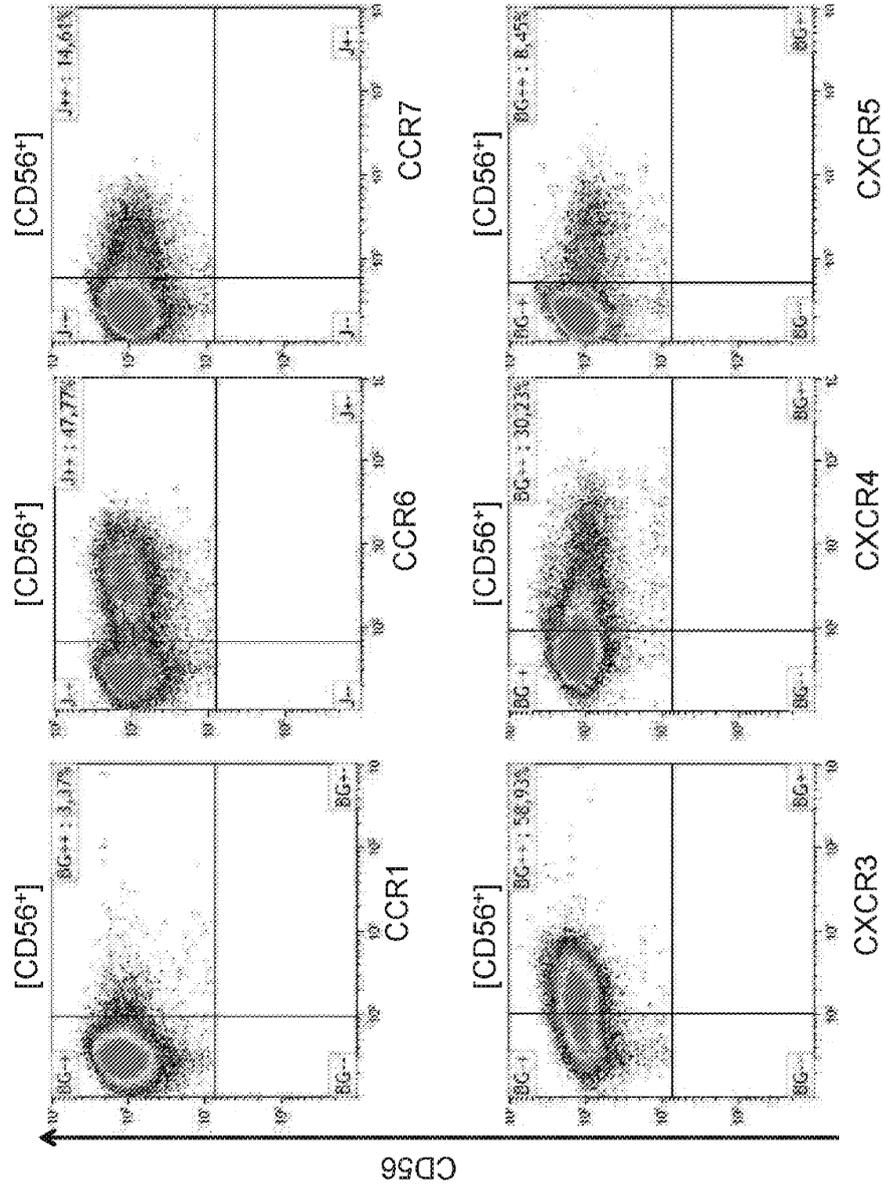


Figura 3 continuación

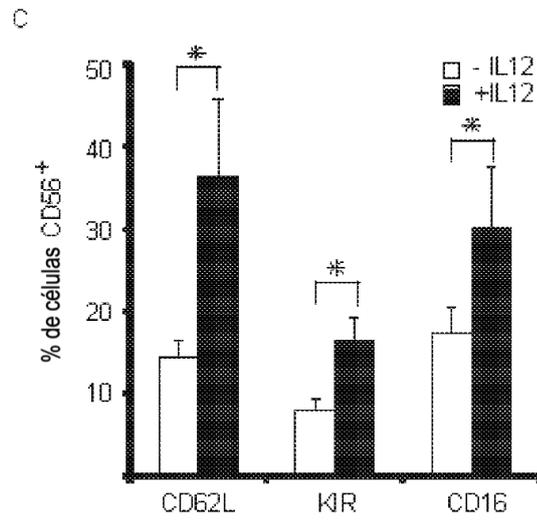


Figura 4

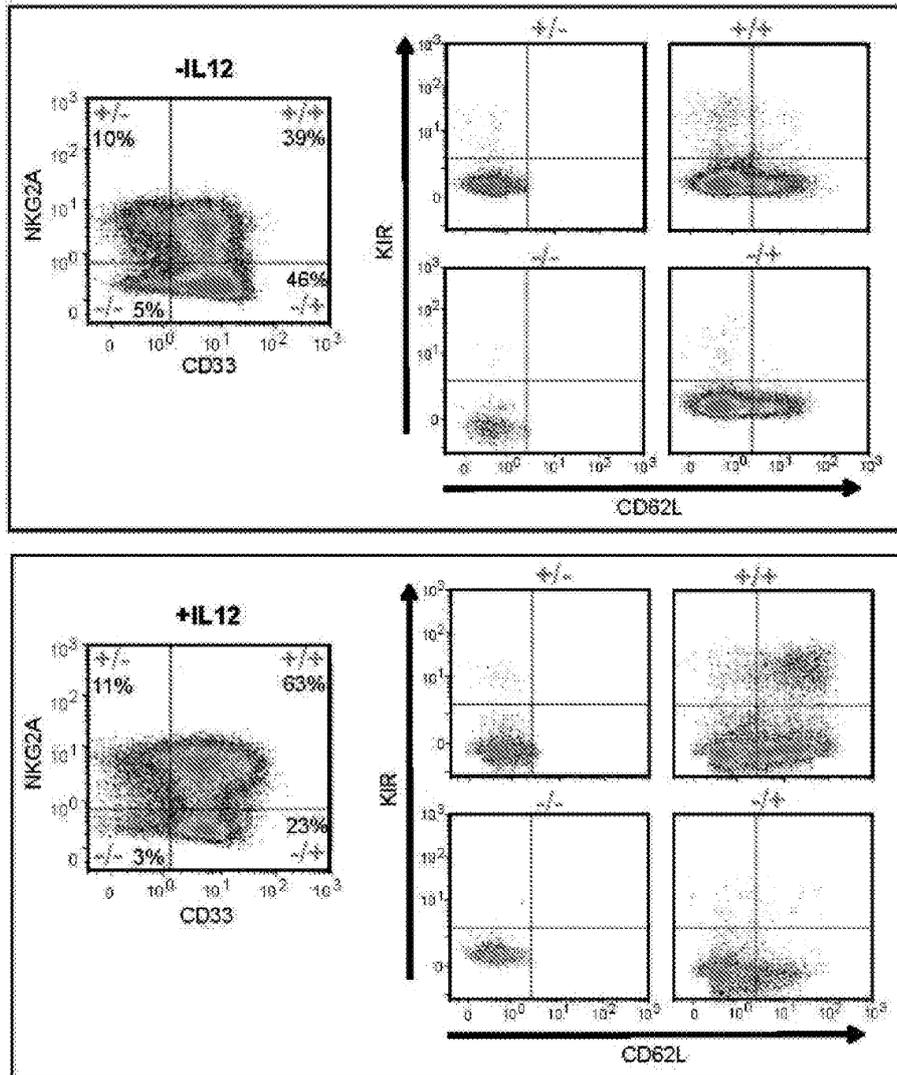


Figura 5

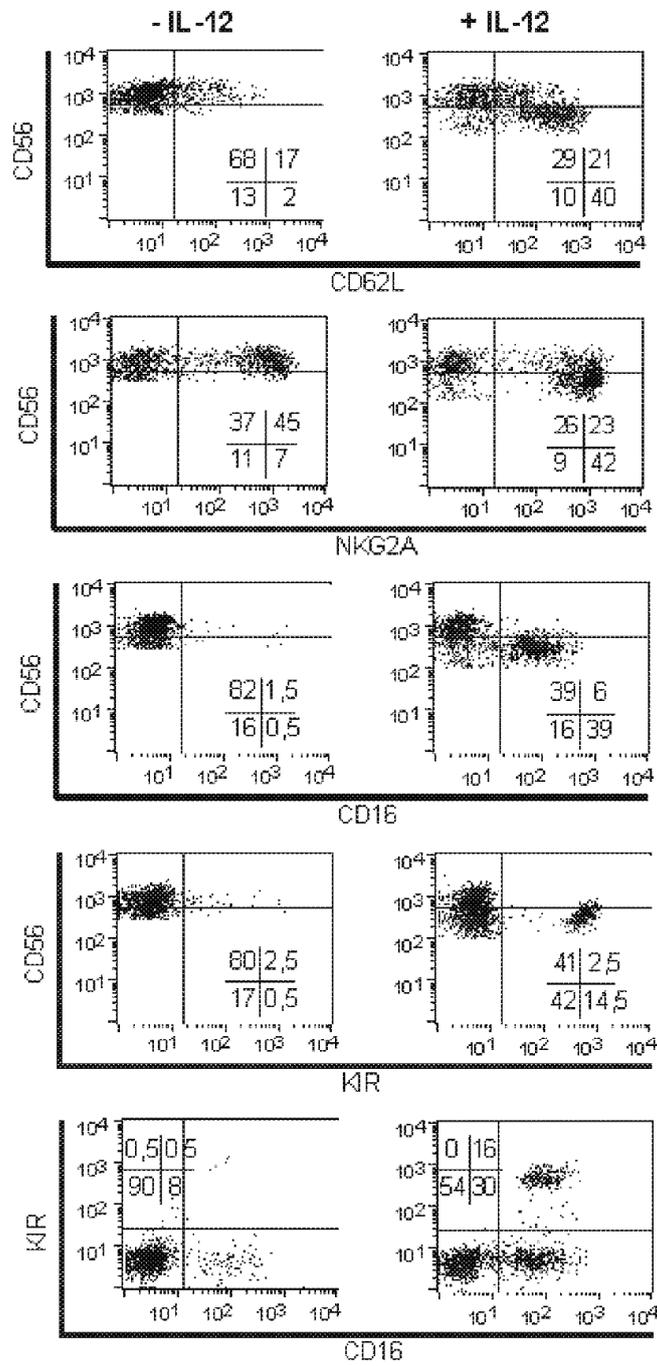


Figura 6

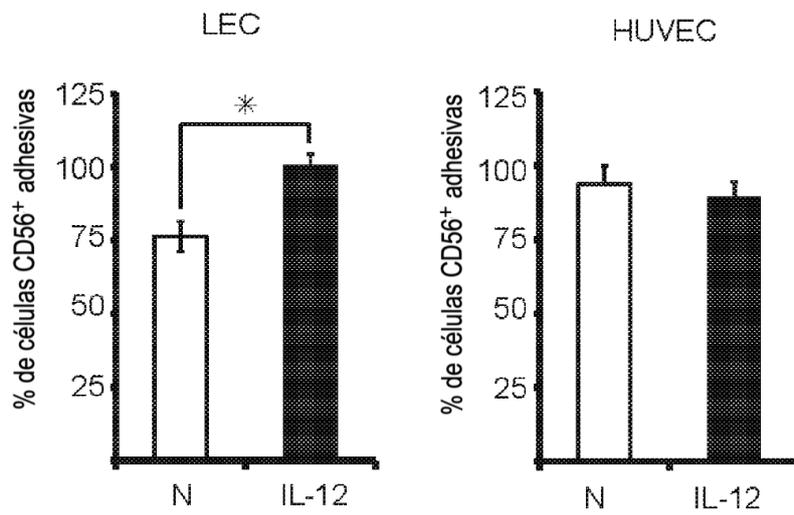
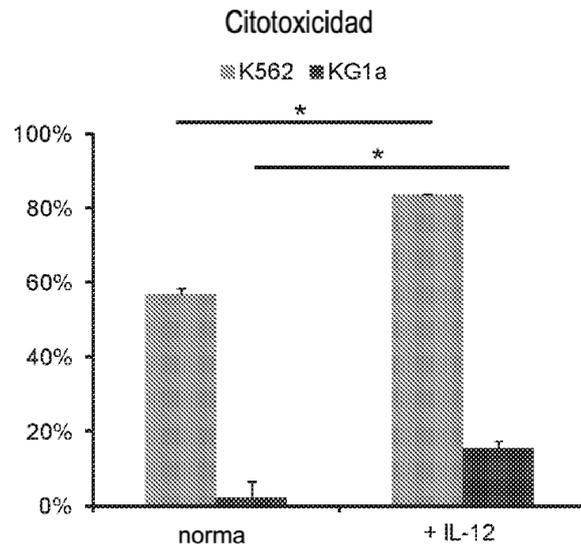
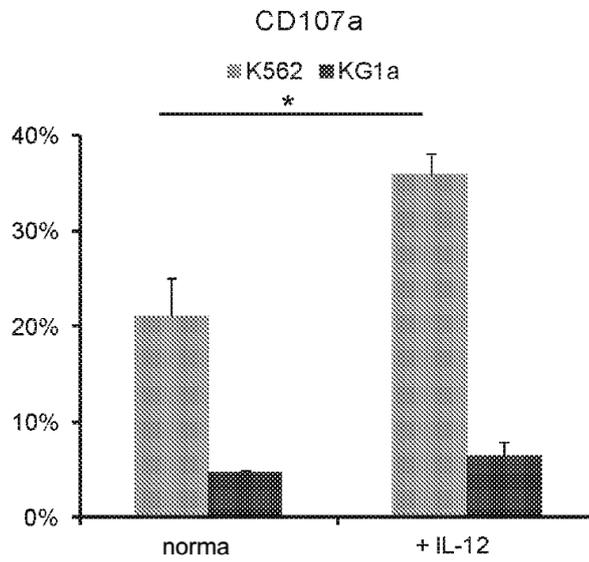


Figura 7

A



B



* p < 0.05

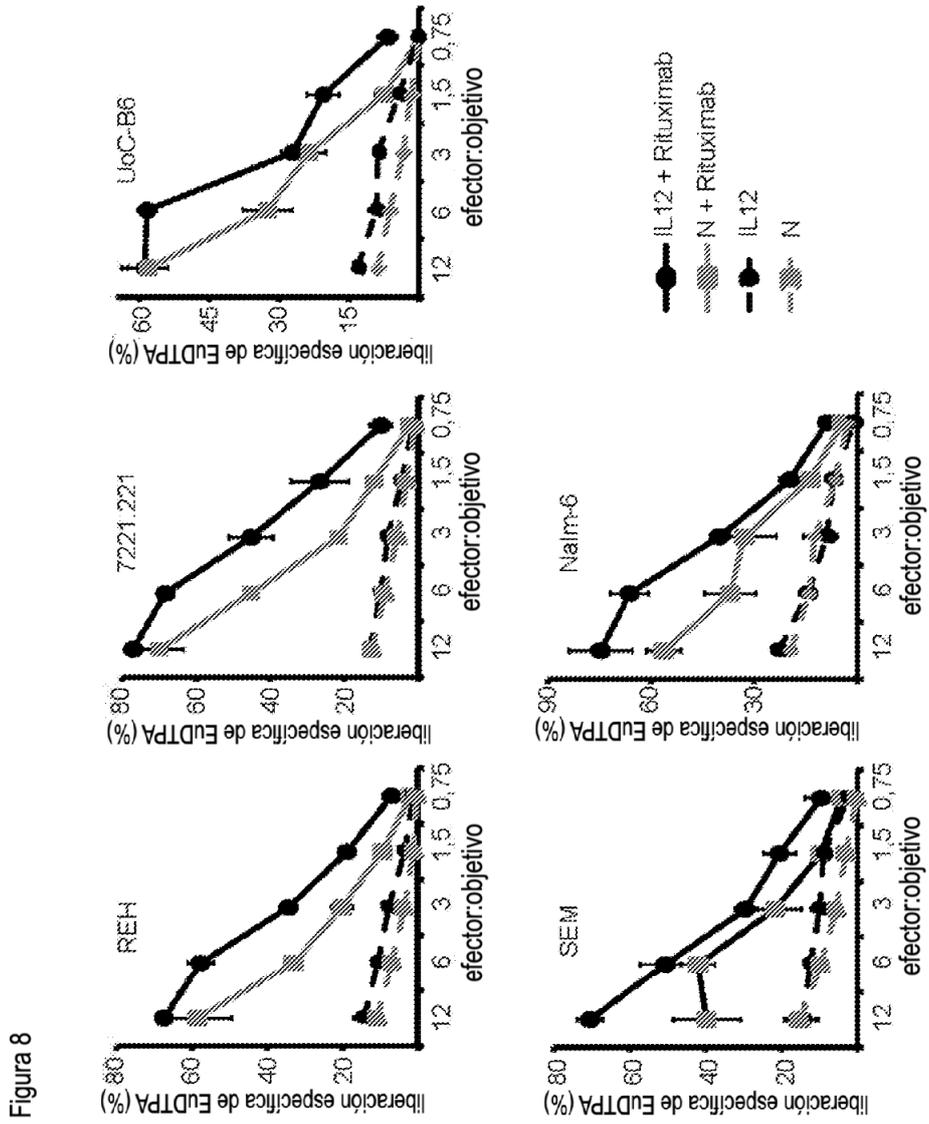


Figura 8

Figura 9

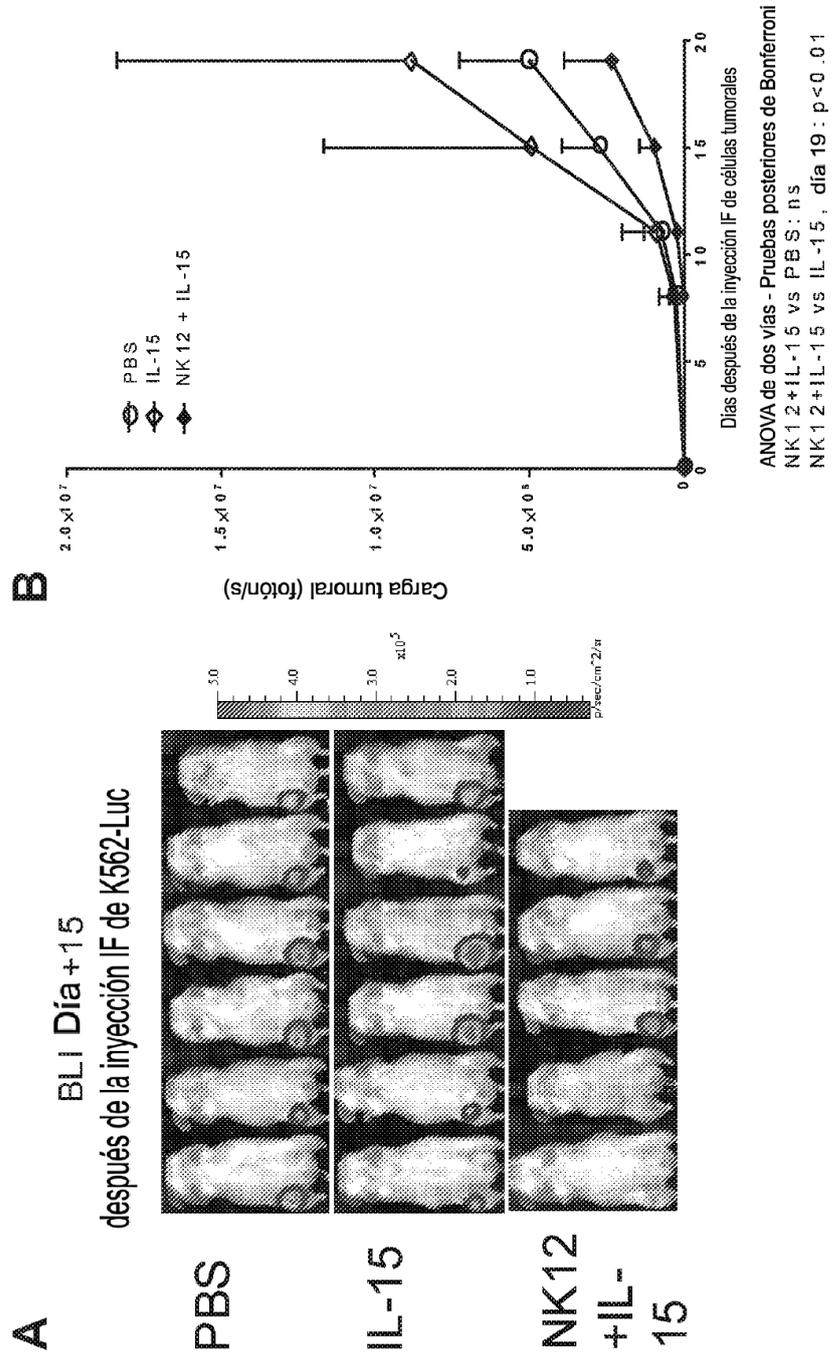


Figura 9 continuación

