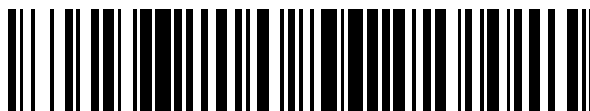


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 825**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2012** **PCT/NL2012/050165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12128622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012** **E 12711984 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 2686421**

54 Título: **Generación de células NK y progenitores de células NK**

30 Prioridad:

18.03.2011 WO PCT/NL2011/050193
18.04.2011 EP 11162866

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.09.2021

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 2 856 825 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

Generación de células NK y progenitores de células NK

5 La invención se refiere al campo de la biología médica moderna. En particular, la invención se refiere a la tecnología de células madre. Más en particular, la invención se refiere a la tecnología de células madre, en particular la tecnología de células madre postembrionarias y la generación de células NK para cultivos de dichas células.

10 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son linfocitos CD3⁺CD56⁺ que ejercen inmunidad innata contra el cáncer e infecciones virales [1]. El reconocimiento y posterior destrucción de las células transformadas e infectadas por virus por las células NK se regula a través del equilibrio de las señales de los receptores inhibidores y activadores [1]. Debido a su fuerte capacidad para atacar las células tumorales, las células NK se han descrito como efectores prometedores para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer [2]. Se ha demostrado que la alorreactividad de las células NK puede controlar la recaída de la leucemia mieloide aguda (AML) sin provocar enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD) en el contexto del trasplante de células madre haploidenticas (SCT) [3]. Más aún, las infusiones de células NK haploidenticas en la AML de adultos y niños después de quimioterapia de agotamiento de linfocitos han proporcionado resultados alentadores [4, 5]. Sin embargo, hasta la fecha solo se han realizado unos pocos ensayos que investigan las infusiones de células NK adoptivas en pacientes con cáncer. Un obstáculo importante es que sólo se pueden aislar cantidades relativamente pequeñas de células NK de los productos de leucocitaféresis regulares. Esto dificulta los ensayos clínicos de respuestas antitumorales dependientes de dosis de células NK en humanos con cáncer [6 - 11]. Por lo tanto, se están investigando protocolos ex vivo para la expansión y activación de las células NK, permitiendo ensayos clínicos con dosificaciones de células NK más altas y permitiendo múltiples infusiones de células NK [12-16]. Sin embargo, la mayoría de los protocolos todavía tratan las desventajas técnicas al utilizar estirpes celulares alimentadoras de apoyo que podrían conducir a problemas regulatorios en la producción de productos de células NK para ensayos a gran escala y multicéntricos.

25 Recientemente, hemos descrito un método de cultivo basado en citocinas alternativo con la capacidad de generar productos de células NK clínicamente relevantes con un alto número de células, alta pureza y funcionalidad a partir de células madre hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB-HSC) [17]. La UCB es una fuente muy atractiva de HSC no solo para el SCT alogénico, sino también para producir una multitud de productos celulares terapéuticos, que incluyen las células NK [17-19].

30 En la presente invención describimos la viabilidad de la generación de células NK a gran escala utilizando unidades de UCB criopreservadas como fuente de células progenitoras. Hemos optimizado el enriquecimiento de células CD34⁺ a partir de unidades de UCB descongeladas utilizando el sistema CliniMACS. Adicionalmente, hemos desarrollado un procedimiento escalable que da como resultado altos rendimientos de células NK derivadas de células CD34⁺. Las células NK resultantes son altamente activas y funcionales y están destinadas a ser utilizadas en un ensayo de búsqueda de dosis de fase I en pacientes con AML de edad avanzada que no son elegibles para SCT alogénico.

40 Para este fin la invención proporciona un método para producir una recolección de linfocitos citolíticos naturales (NK) dicho método comprende

45 i - cultivar bajo condiciones estáticas una muestra que comprende células madre, células progenitoras o ambas, de tejido postembrionario humano en una bolsa desechable para cultivar células de mamífero, a una densidad celular de al menos 0.5×10^6 /ml durante al menos 7 días en un medio de cultivo que comprende suero humano, una recolección de citocinas y heparina de bajo peso molecular (LMWH), en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de factor de células madre (SCF), Ligando flt-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleucina-7 (IL-7) y tres o más de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína I alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa) obteniendo de esta manera una recolección de células madre, células progenitoras cultivadas o ambas, de tejido postembrionario humano que contiene una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, y

50 ii - cultivar las células obtenidas en el paso (i) mientras que el medio de cultivo se mezcla durante el cultivo, para mejorar el intercambio de gases y para reducir la adherencia de las células a una superficie sólida durante al menos 7 días a una densidad celular de al menos 1×10^6 /ml en un medio de cultivo que comprende suero humano y una recolección de citocinas, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de factor de células madre (SCF), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 e interleucina-2 y tres o más de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa), obteniendo de esta manera una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas.

60 La célula madre para utilizar en un método de la invención puede ser cualquier célula madre derivada de tejido postembrionario humano siempre que la célula madre tenga la capacidad o haya adquirido la capacidad de producir células progenitoras comprometidas con el linaje hematopoyético. Ejemplos de dichas células madre son células madre de: médula ósea de adultos, sangre periférica movilizada, tejido graso (células madre mesenquimales), sangre de un recién nacido, preferiblemente de sangre recolectada del cordón umbilical, después de desconectarlo del recién nacido.

65 Actualmente, las células madre se pueden obtener a partir de estirpes de células madre que se han generado previamente. Actualmente, también 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 mostrado que es posible reprogramar células diferenciadas, tales como las células de piel, en células madre completamente funcionales que pueden producir progenie de células progenitoras que se comprometen a producir progenie diferenciada del linaje hematopoyético. Todas dichas células madre son células madre adecuadas para la presente invención. Una fuente preferida de células madre son las células madre de tejido posembriionario humano hematopoyético y/o mesenquimal. Preferiblemente de tejido humano obtenido de humanos posparto. Una fuente particularmente preferida es la sangre de cordón humano. En una realización particularmente preferida, dicha fuente es una fuente de sangre de cordón humano congelada.

Se conocen muchos medios básicos. A continuación se ofrece una selección, pero pueden ser adecuadas muchas más. Los medios básicos incluyen, pero no se limitan a, BEM (Medio Eagle Básico), DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco), medio esencial mínimo de Glasgow, medio basal M199, HAM F-10, HAM F-12, DMEM de Iscove, RPMI, Leibovitz L15, MCDB, McCoy 5A, StemSpan H3000® y StemSpanSFEM®, Stemline I™ y Stemline II™, medio de crecimiento Basal Glycostem (GBGM™); X-Vivo10™, X-Vivo15™ y X-Vivo20™, etc.

También se pueden utilizar combinaciones de estos medios básicos. Preferiblemente, las formulaciones libres de suero, tales como Stemline I™ y Stemline II™, StemSpan H3000®, StemSpan SFEM® o X-Vivo10™, GBGM, X-Vivo15™ y X-Vivo20™ se utilizarán en el punto de tiempo de inicio de cultivo con y/o sin adición de suero humano. Se prefieren las combinaciones de DMEM y HAMs F-12 en puntos de tiempo específicos de acuerdo con la invención. Las cantidades aquí indicadas son normalmente adecuadas para cultivos. Las cantidades se pueden adaptar para diferentes cantidades de células con las que se inician los cultivos.

Los medios de acuerdo con la invención pueden variar en su contenido de suero, preferiblemente junto con una combinación diferente de citocinas para proporcionar un medio de expansión o un medio de diferenciación y o alternativamente un medio de expansión + diferenciación en puntos de tiempo definidos de acuerdo con la invención.

Una célula progenitora es una célula biológica que, como una célula madre, tiene tendencia a diferenciarse en un tipo específico de célula, pero ya es más específica que una célula madre y es empujada a diferenciarse en su célula "diana". Una diferencia entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras solo pueden dividirse un número limitado de veces. Otra diferencia es la expresión de los marcadores de superficie. Las células madre carecen normalmente de marcadores de superficie que son prominentes sobre las células progenitoras o en células diferenciadas derivadas de las mismas.

Los linfocitos citolíticos naturales (células NK) son un tipo de linfocito citotóxico que constituye un componente principal del sistema inmunológico innato. Las células NK desempeñan una función importante en el rechazo de tumores y células infectadas por virus. Destruyen células al liberar pequeños gránulos citoplasmáticos de proteínas llamadas perforina y granzima que hacen que la célula diana muera por apoptosis (muerte celular programada). Las células NK se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. No expresan receptores de antígenos de células T (TCR) o marcadores T Pan CD3 o receptores de células B de inmunoglobulinas de superficie (Ig), pero generalmente expresan los marcadores de superficie CD 16 (FcγRIII) y CD56 en humanos, NK1.1 o NK1.2 en ratones C57BL/6. Hasta el 80 % de las células NK humanas también expresan CD8. Fueron nombrados "linfocitos citolíticos" debido a la noción inicial de que no requieren activación para destruir las células a las que les faltan marcadores "propios" de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Son distintos de los linfocitos T citolíticos naturales (para revisión véase, Di Santo: 2006, Annu. Rev. Immunol. Vol 24:257-286; Colucci et al.: 2003, Nature reviews Immunology Vol 3:413-428 y Lanier: 2005, Annu. Rev. Immunol. Vol 23:225-274.)

Hemos observado que para el rendimiento es importante realizar esencialmente dos pasos de cultivo diferentes. En el primer paso de cultivo, (paso i) en un método de la invención, la población progenitora se expande utilizando un medio de cultivo específico (este paso también se denomina paso de expansión). Las células recolectadas del paso i, están en un paso de cultivo adicional (paso ii) en un método de la invención, diferenciadas en células progenitoras NK y células NK más comprometidas (este paso también se conoce como paso de diferenciación). Un hallazgo sorprendente fue que la densidad celular que permitió buenos rendimientos en el presente sistema escalable difería de las densidades celulares que fueron óptimas cuando se compararon con cultivos similares utilizando placas de cultivo a pequeña escala. Se encontró que en el paso i de un método de la invención una densidad celular de al menos 0.5×10^6 por ml se necesitó para obtener rendimientos óptimos al final de este paso de cultivo. Se obtuvieron rendimientos aún mejores a una densidad de al menos 1×10^6 células por ml. El mejor rendimiento de los cultivos se obtuvo cuando se ajustaron las densidades celulares en el paso i a al menos 0.5×10^6 por ml, y preferiblemente al menos 1×10^6 por ml cada dos o tres días, para acomodarse al aumento en el número de células durante el cultivo. Esto se hace preferiblemente al cambiar o agregar medio de cultivo fresco al cultivo. Para los cultivos del paso ii, se encontró que la densidad celular óptima era al menos 1×10^6 células/ml, preferiblemente al menos 2×10^6 células/ml. El mejor rendimiento de los cultivos se obtuvo cuando las densidades celulares en el paso ii se ajustaron a al menos 1×10^6 por ml, y preferiblemente al menos 2×10^6 por ml cada dos o tres días, para acomodarse al aumento en el número de células durante el cultivo. Esto se hace preferiblemente al cambiar o agregar medio de cultivo fresco al cultivo. Desde un punto de vista médico, las terapias celulares ofrecen una perspectiva prometedora. Desde la década de 1970, el beneficio para la salud del trasplante de células madre en caso de leucemia está por encima de toda duda razonable. La otra cara de la moneda de las terapias celulares son los costes

inherentes, por ejemplo, unos € 200.000 por un trasplante de médula ósea estándar. Las terapias celulares más nuevas, como P ROVENGE® de Dendreon para el tratamiento del cáncer de próstata, una vacuna DC autóloga personalizada para el paciente, tienen una estructura de costes similar. Sin embargo, PROVENGE® solo ofrece una extensión de vida de 2 a 3 meses para el paciente con costes de reembolso de USD\$ 93,000. Por tanto, es un objeto de la presente invención que se logre una reducción de costes significativa en las terapias celulares. Una parte importante de los medios y métodos de la presente invención está dirigida a lograr ahorros de costes en la terapia celular. Un aspecto de la invención en el que esto es evidente es el rendimiento celular y la pureza sin precedentes en comparación con el estado de la técnica. Otra ventaja de la presente invención es que el material fuente para la producción de células es la sangre del cordón umbilical en contraposición a las células obtenidas de la sangre de adulto. Otra ventaja es que el rendimiento de células de sangre de cordón única utilizando un método de la presente invención es lo suficientemente alto para varias tandas de células NK generadas. Esto permite múltiples tratamientos del receptor con las células NK que tienen el mismo origen genético. Anteriormente, esto no era posible y cuando se necesitaban múltiples tratamientos, esto se debía lograr utilizando células de un individuo diferente, lo que conducía a una mayor variabilidad y una menor predictibilidad de los efectos. De hecho, a menudo era necesario utilizar células de varios donantes en un solo trasplante.

Una desventaja anterior de la sangre del cordón umbilical era que a menudo se podían recolectar números subóptimos de células del cordón. Una ventaja adicional de los medios y métodos de la invención es que la expansión a escala logarítmica permite el uso de dicha sangre de cordón con números previamente subóptimos de células. Las expansiones logradas en la presente invención compensan con creces el número de células inicial más bajo. Esto reduce adicionalmente los costes del procedimiento, ya que la sangre del cordón con mayor número de células es “mucho” más costosa.

El alto rendimiento también permite una mayor adaptación del procedimiento en el sentido de que ya no es necesario cambiar de medio, ya que la tasa de aumento en el número de células permite que los pasos (i), (ia) y (ii) de cultivo se realicen como cultivos por tandas de carga en las que se agrega medio a los cultivos en lugar de métodos de cultivo en los que el medio necesita ser reemplazado para acomodarse al uso del medio en ausencia de expansión celular “suficiente”. Por tanto, en una realización preferida, un método para producir una recolección de células NK de la invención comprende cultivar las células en el paso de cultivo i, ia y/o ii como un cultivo tandas de carga. Por tanto, en una realización preferida, un método para producir una recolección de células NK de la invención comprende cultivar las células en el paso de cultivo i, ia y/o ii al agregar medio fresco a los cultivos. Por tanto, en una realización preferida, un método para producir una recolección de células NK de la invención comprende cultivar las células en el paso de cultivo i, ia y/o ii al agregar medio de cultivo y no reemplazar el medio de cultivo.

El tiempo de cultivo es de al menos 7 días para ambos pasos de cultivo. Es posible un período de tiempo más corto, pero generalmente resultan en rendimientos significativamente más bajos. El paso de cultivo i de un método de la invención se realiza preferiblemente durante al menos 10 días, preferiblemente al menos 14 días. Son posibles tiempos de cultivo de más de 14 días, pero tienden a dar como resultado los mismos hasta 18 días o eventualmente menores rendimientos de células (más de 18 días de cultivo) que están activas en el paso de cultivo ii de un método de la invención. El paso ii de un método de la invención se realiza preferiblemente durante al menos 10 días, más preferiblemente al menos 14 días. Este período de tiempo se puede aumentar a 21 días e incluso a 28 días. Los períodos de cultivo que se extienden más allá del día 18 producen normalmente el mismo número de células, pero la población de células en general se desplaza a células NK más diferenciadas, es decir, que contienen un porcentaje más alto de células con marcadores que son típicos de células NK más diferenciadas.

Las heparinas de bajo peso molecular (LMWH) se utilizan en la clínica, por ejemplo, como anticoagulantes en enfermedades que presentan trombosis o profilaxis de trombosis. La LMWH de la presente invención se deriva preferiblemente de heparina estándar mediante despolimerización de UFH. Las LMWH son cadenas cortas de polisacáridos. 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, preferiblemente al menos el 60 % de las cadenas es menor que la longitud de la cadena promedio. Cuando la heparina de bajo peso molecular tiene un promedio de aproximadamente 8000 Dalton, se prefiere que al menos el 60 % de todas las cadenas tengan un peso molecular menor de 8000 Dalton. Las LMWH se pueden obtener mediante varios métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan varios métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de heparina de bajo peso molecular. A continuación se proporciona una lista no limitante. Una heparina de la invención se puede obtener de un mamífero u otro organismo tal como caracoles, alternativamente las heparinas se sintetizan sintética o semisintéticamente. Un ejemplo de lo último es la producción de heparina en bacterias tales como, pero sin limitarse a, la heparina K5 por E. coli. También se consideran modificaciones de heparina, tales como pero sin limitarse a, acetilación, desulfatación y fosforilación para hacer una heparina como se define en esta invención. Ejemplos no limitantes pero preferidos de dichas 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 menor de 8000 Da. Estos se pueden obtener mediante varios métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan varios métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de heparina de bajo peso molecular. A continuación se proporciona una lista no limitante. Despolimerización oxidativa con peróxido de hidrógeno. Utilizada en la fabricación de ardeparina (Normiflo®). Escisión desaminativa con nitrito de isoamilo. Utilizada en la fabricación de certoparina (Sandoparin®). Escisión beta-eliminativa alcalina del éster de bencilo de heparina. Utilizada en la fabricación de enoxaparina (Lovenox®).

y Clexane®). Despolimerización oxidativa con Cu²⁺ y peróxido de hidrógeno. Utilizada en la fabricación de pamaparina (Fluxum®)

Escisión beta-eliminativa mediante la enzima heparinasa. Utilizada en la fabricación de tinzaparina (Innohep® y Logiparin®). Escisión desaminativa con ácido nitroso. Utilizada en la fabricación de dalteparina (Fragmin®), reviparina (Clivarin®) y nadroparina (Fraxiparin®). El paso ii de un método de la invención se realiza preferiblemente en ausencia de LMWH. Preferiblemente, un medio de cultivo de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 1 - 100, más preferiblemente aproximadamente 15 - 50 mg/l de LMWH. Las cantidades de citocina agregadas son convencionales en la técnica, las cantidades preferidas se dan en los ejemplos, pero las desviaciones del 10 % en la cantidad son muy aceptables y están dentro del alcance de la presente invención.

Los pasos i y ii se realizan en presencia de un grupo seleccionado de citocinas.

Para el paso i, la recolección de citocinas comprende tres o más de factor de células madre (SCF), Ligando flt-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleucina-7 (IL-7) y tres o más de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa). Las cantidades de los factores de crecimiento utilizados son convencionales para SCF, FLT-3L, TPO y IL-7. Las cantidades típicas para las citocinas son TPO; 35 ng/ml; FLT-3L; 35 ng/ml, SCF; 35 ng/ml y IL-7; 35 ng/ml. Sin embargo, se pueden utilizar cantidades menores. Por ejemplo, una dosificación preferida de las citocinas es TPO; 25 ng/ml; FLT-3L; 25 ng/ml, SCF; 25 ng/ml y IL-7; 25 ng/ml. Para GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa se proporciona una baja cantidad, las cantidades típicas son GM-CSF; 10 pg/ml, G-CSF; 250 pg/ml, LIF; 50 pg/ml, MIP-I alfa; 200 pg/ml y IL-6; 50 pg/ml. Las citocinas LIF y MIP-I alfa preferiblemente no están presentes en el cóctel que comprende tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa. En una realización preferida, la recolección de citocinas en el paso i contiene SCF, FLT-3L, TPO y IL-7. Preferiblemente la recolección de citocinas en el paso i contiene GM-CSF, G-CSF y IL-6.

Para el paso ii la recolección de citocinas comprende tres o más de SCF, IL-7, interleucina-15 (IL-15) e interleucina-2 (IL-2) y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa. Las cantidades de citocina agregadas con las mismas como se mencionó para estas citocinas en el paso i. Para IL-15 y IL-2 que no se mencionan en el paso i, las cantidades normalmente son como sigue: IL-15; 25 ng/ml, IL-2 (Proleukin® [Chiron]; 1000 U/ml). Otra cantidad preferida de IL-15 es 20 ng/ml. De nuevo las citocinas LIF y MIP-I alfa preferiblemente no están presentes en el cóctel que comprende tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa.

El cultivo del paso (i) de un método de la invención se realiza en una bolsa desechable para cultivar células de mamífero, bajo condiciones estáticas. La bolsa desechable permite que el cultivo se realice en un sistema cerrado que es necesario para aplicaciones clínicas. El paso i se realiza bajo condiciones estáticas. Se ha encontrado que se prefieren las condiciones estáticas en esta etapa ya que esto permite buenos rendimientos de células madre cultivadas y células progenitoras o ambas al final del paso i. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las condiciones estáticas permiten que las células se asienten y se asocien con la pared de la bolsa desechable y se asocien con células vecinas y que esta asociación afecta favorablemente el rendimiento de las células deseadas. Utilizando estas condiciones para el paso i, se obtuvieron expansiones celulares de aproximadamente 40 (después de 7 días) y de aproximadamente 160 (después de 14 días de cultivo).

El cultivo del paso ii de un método de la invención se realiza mientras que el medio de cultivo se mezcla durante el cultivo, para mejorar el intercambio de gases y para reducir la adherencia de las células a una superficie sólida. Se ha observado que el cultivo estático del paso ii produjo un buen número de células pero las células obtenidas eran relativamente impuras (es decir, alrededor del 70 % de células NK CD56⁺CD3⁻ puras con un rendimiento celular total a las 6 semanas de cultivo, incluido el paso i, de aproximadamente 1-2 x 10⁹ células). Esta cantidad y pureza es adecuada para uso clínico, pero sorprendentemente se encontró que se podía alcanzar el mismo número total de células pero un nivel mucho más alto de pureza de células NK CD56⁺CD3⁻ (más del 90 %) cuando se realizaba el mismo cultivo como anteriormente, pero en el que el paso ii se realizó mientras el medio de cultivo se mezclaba durante el cultivo. Se encontró que bajo estas condiciones el número de células monocíticas maduras (es decir, células CD14⁺ y/o CD15⁺) se redujo en gran medida. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que la presencia de estas células y/o las citocinas producidas por estas células afecta negativamente al rendimiento de las células NK CD56⁺CD3⁻. En una realización preferida, dicho cultivo del paso (ii) se realiza bajo mezcla continua, preferiblemente en un biorreactor para cultivar células de mamífero. En la técnica se encuentran disponibles varios métodos para mezcla continua. La mezcla se puede realizar, por ejemplo, con un rotor o con un balancín. El balancín normalmente oscila el cultivo periódicamente. Para la presente invención, se prefiere dicha oscilación periódica y se refiere a una mezcla continua, ya que el cultivo no se deja estático durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación de las células cultivadas en el fondo del sistema de cultivo.

En una realización un método de la invención comprende adicionalmente como paso (ia) cultivar células recolectadas del paso (i) (mientras que el medio de cultivo se mezcla durante el cultivo, para mejorar el intercambio de gases y para reducir la adherencia de las células a una superficie sólida) a una densidad celular de al menos 0.5 x 10⁶/ml durante al menos 4 días en un medio de cultivo que comprende suero humano, una recolección de citocinas y heparina de bajo peso molecular, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de SCF, FLT-3L, IL-15 y IL-7 y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa obteniendo de esta manera una recolección de células madre, células progenitoras

cultivadas o ambas, que contienen una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, y cultivar dichas células en el paso (ii).

En una realización preferida de un método de la invención las células obtenidas en el paso (i), (ia) o paso (ii), se cosechan. Preferiblemente las células obtenidas en el paso (ii) se cosechan. Cuando las células se cosechan del paso (i) o paso (ia), cualesquier células no recolectadas se pueden cultivar adicionalmente de acuerdo con el método. Si todas las células se cosechan con el método, no se realiza el aspecto preferido de cultivo adicional. Las células cosechadas se pueden utilizar directamente con fines de trasplante. Dicho trasplante se realiza preferiblemente para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad humana preferiblemente todas las enfermedades malignas tales como tumores, cáncer, leucemias, así como todas las enfermedades virales, también en situaciones de rechazo de trasplantes sólidos y enfermedades autoinmunitarias y pérdida de embarazo.

En una realización preferida las células cosechadas se lavan en un sistema cerrado de tal manera que componentes del medio de cultivo se diluyen al menos 500 veces y se reemplazan por una solución que es compatible con administración humana que comprende albúmina de suero humano. Se prefiere que dicha solución con la que se lavan las células no contenga suero humano. Se prefiere que la albúmina de suero humano presente en la solución se derive de una tanda que comprende esencialmente albúmina de suero humano pura. En una realización preferida dicha albúmina de suero humano se produce de forma recombinante de albúmina de suero humano. En una realización preferida dicha solución comprende entre 0.3 % y 10 % de albúmina de suero humano. Preferiblemente dicha solución comprende entre 0.5 y 5 % de albúmina de suero humano. Se ha observado que las células tratadas de la forma anterior y que se recolectan en la solución que es compatible con la administración humana y que comprende albúmina de suero humano se pueden almacenar durante un período prolongado de tiempo bajo estas condiciones sin pérdida perjudicial de viabilidad y/o actividad. La solución en la que se almacenan las células también se denomina "solución de almacenamiento". La solución de almacenamiento preferiblemente comprende menos de 0.1 % de suero humano, preferiblemente dicha solución de almacenamiento no comprende suero humano. En una realización preferida dicha solución de almacenamiento comprende suero humano derivado de una tanda que comprende esencialmente albúmina de suero humano pura. En una realización preferida dicha albúmina de suero humano se produce de forma recombinante de albúmina de suero humano. En una realización preferida dicha solución de almacenamiento comprende entre 0.3 % y 10 % de albúmina de suero humano. Preferiblemente dicha solución de almacenamiento comprende entre 0.5 y 5 % de albúmina de suero humano. Las soluciones preferidas compatibles con la administración humana son preferiblemente PBS o soluciones salinas fisiológicas. El PBS o la solución salina fisiológica pueden contener uno o más aditivos. En una realización, el aditivo es albúmina de suero humano. En una realización preferida, la solución compatible es una solución salina fisiológica. Las células cosechadas preferiblemente se almacenan durante al menos un día a una temperatura de entre temperatura ambiente y 0 °C, preferiblemente dichas células cosechadas se almacenan durante 1, 2 o 3 días a dicha temperatura. Preferiblemente dicha solución que es compatible con administración humana es una solución salina fisiológica. La solución salina fisiológica es normalmente, aunque no necesariamente NaCl al 0.9 %.

En una realización preferida las células cosechadas y/o almacenadas se dividen en al menos 5 porciones y se almacenan a una temperatura por debajo de -70 °C.

La divulgación proporciona adicionalmente una bolsa desechable para cultivar células de mamífero que comprende un medio de cultivo que comprende una recolección de células madre, células progenitoras cultivadas o ambas, de tejido postembrionario humano que contiene una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK. Preferiblemente dicho medio de cultivo comprende suero humano, una recolección de citocinas y heparina de bajo peso molecular, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de SCF, FLT-3L, TPO y IL-7 y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa. Dichas bolsas se utilizan en un método de la invención.

En un aspecto adicional la divulgación proporciona un biorreactor para cultivar células de mamífero que comprende un medio de cultivo y una recolección de células cultivadas derivadas de células madre, células progenitoras o ambas de tejido postembrionario humano, que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas. Preferiblemente dicho medio de cultivo comprende adicionalmente suero humano y una recolección de citocinas, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de SCF, IL-7, IL-15 y IL-2 y tres o más de GM-CSF, G-CSF, IL-6, LIF y MIP-I alfa. Dicho biorreactor se utiliza en un método de la invención.

Las células progenitoras NK a menudo se denominan NKP y células NK inmaduras y normalmente comprenden los marcadores celulares IL-2Rbeta y/o NKR-P1 y CD2.

La divulgación proporciona adicionalmente una recolección in vitro de células cultivadas cosechadas 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. La recolección preferiblemente comprende más de 50 % de células CD56 positivo, CD94 positivo y/o células CD56 positivo, CD94 negativo, preferiblemente dichas células son negativas para CD 117 y CD34. Preferiblemente, dichas células se han almacenado durante al menos 1 día a una temperatura de entre temperatura ambiente y 0 °C, preferiblemente dicha recolección se ha almacenado durante 1, 2 o 3 días a dicha temperatura. Preferiblemente, dicha pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas comprende al menos 70 % de células NK viables o células progenitoras NK o ambas, preferiblemente según se determina por exclusión 7AAD. Preferiblemente dicha recolección es esencialmente libre de células T CD3⁺. Preferiblemente dicha recolección de células

cultivadas cosechadas se almacena en una solución que es compatible con administración humana que comprende albúmina de suero humano.

- Las células cultivadas se pueden cosechar en cualquier momento después de una semana de cultivo. Los cultivos cosechados son únicos porque contienen células NK o progenitores de las mismas que no se detectan in vivo o en células madre y progenitoras purificadas. Adicionalmente, son únicos porque contienen mezclas de poblaciones de células que no se detectan in vivo o en cultivos purificados en las proporciones específicas detectadas. La Tabla 9 representa el perfil de marcadores celulares de diversas poblaciones de células detectadas en el cultivo in vitro. Las poblaciones celulares se caracterizan por la presencia de proteínas marcadoras sobre la superficie de las células. Las células se definen como linfocitos CD45+/CD3- y adicionalmente se caracterizan por los marcadores CD133, CD34, CD117, CD244, CD33, CD56, CD94 y CD159a. Los tipos de células se ordenan en 7 etapas de desarrollo diferentes (1, 2, 3a, 3b, 4, 5a y 5b). Dentro de cada etapa se identifican diferentes subconjuntos (indicados con una letra mayúscula). La Tabla 10 muestra la contribución relativa de los subconjuntos de cada etapa a la población celular total en dicha etapa. La Tabla 11 muestra la contribución relativa de cada subconjunto al número total de células detectadas en la muestra de linfocitos CD45+/CD3-. De cada tejido se probaron 5 donantes diferentes y si las poblaciones de células contenían más del 0.01 % del total de células y más de 50 células en total y aparecían en al menos 3 de 5 donantes, se consideraban una etapa o subconjunto fiel. Para los cultivos celulares se analizaron 4 donantes diferentes y si 2 de 4 donantes muestran una población celular de más del 0.01 % de células totales y más de 50 células totales, la etapa o subconjunto se consideró fiel.
- Las células cosechadas o las fracciones de células purificadas a partir de las células cosechadas se pueden utilizar con fines de inmunoterapia o trasplante. Por ejemplo, las células cosechadas después del paso (i) o (ia) son células versátiles que pueden producir una variedad de células NK in vivo. Se pueden diferenciar en células NK citotóxicas o células inmunorreguladoras, que se pueden utilizar para terapia antitumoral o contra enfermedades infecciosas o utilizar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Las células trasplantadas también se pueden inducir o estimular en una determinada dirección al proporcionar al receptor factores de crecimiento apropiados tales como IL-15, IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-17, IL-1- β o IL-10. Las células recolectadas después del paso (ii) son normalmente más diferenciadas en comparación con las células del paso (i) o del paso (ia). Las células cosechadas que contienen los tipos de células únicos se pueden utilizar directamente o los subconjuntos deseados se pueden purificar a partir de las células cosechadas. Por lo tanto, la invención proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas cosechadas que comprenden al menos una población celular que tiene el perfil de marcador celular del subconjunto E de la etapa 3a, subconjunto M o subconjunto B de la etapa 3b, subconjunto K o subconjunto M de la etapa 4, o subconjunto B de la etapa 5b. Las células con estos perfiles de marcadores celulares no están presentes en números detectables en los respectivos tejidos aislados y/o tejidos purificados, pero se forman en el cultivo ex vivo de un método de la invención.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.5 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto E de la etapa 3a. Preferiblemente entre 0.5 a 10 %, más preferiblemente entre 2 a 8 % y particularmente se prefiere entre 3 a 6 % de células con el perfil de marcador del subconjunto E de la etapa 3b.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.5 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto M de la etapa 3b. Preferiblemente entre 0.5 a 10 %, más preferiblemente entre 0.5 a 6 % y particularmente se prefiere entre 1.5 a 6 % de células con el perfil de marcador del subconjunto M de la etapa 3b.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.1 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto B de la etapa 3b. Preferiblemente entre 0.1 a 10 %, más preferiblemente entre 0.1 a 4 % y particularmente se prefiere entre 0.5 a 2.5 % de células con el perfil de marcador del subconjunto B de la etapa 3b.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.5 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto K de la etapa 4. Preferiblemente entre 0.5 a 10 %, más preferiblemente entre 0.5 a 6 % y particularmente se prefiere entre 2 a 6 % de células con el perfil de marcador del subconjunto K de la etapa 4.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.5 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto M de la etapa 4. Preferiblemente entre 0.5 a 8 %, más preferiblemente entre 0.5 a 6 % y particularmente se prefiere entre 1.0 a 4 % de células con el perfil de marcador del subconjunto M de la etapa 4.
- Preferiblemente dicha recolección de células cultivadas cosechadas que se puede obtener mediante un método de la invención contiene al menos 0.1 % de células con el perfil de marcador celular del subconjunto B de la etapa 5b. Preferiblemente entre 0.5 a 10 %, más preferiblemente entre 0.5 a 6 % y particularmente se prefiere entre 1.0 a 6 % de células con el perfil de marcador del subconjunto B de la etapa 5b.
- Los perfiles de marcador celular de las poblaciones respectivas se proporciona en la Tabla 9 y se indican en el presente documento a continuación.

- Etapa 3a E: CD133+ CD34- CD117+ CD244+ CD33+ CD56- CD94- CD159a- CD45+ CD3-
 Etapa 3b B: CD133- CD34- CD117+ CD244+ CD33+ CD56+ CD94- CD159a+ CD45+ CD3-
 Etapa 3b M: CD133- CD34- CD117+ CD244+ CD33- CD56+ CD94- CD159a- CD45+ CD3-
 Etapa 4 K: CD133- CD34- CD117+ CD244+ CD33+ CD56+ CD94+ CD159a- CD45+ CD3-
 Etapa 4 M: CD133- CD34- CD117+ CD244+ CD33- CD56+ CD94+ CD159a- CD45+ CD3-
 Etapa 5b B: CD133- CD34- CD117- CD244+ CD33+ CD56+ CD94- CD159a+ CD45+ CD3-
- La divulgación proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas que se puede obtener mediante un método de la invención que comprende entre
- 1 - 10 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 1 de la tabla 9,
 - 2 - 15 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 2 de la tabla 9, y
 - 50 - 97 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9. Preferiblemente dicha recolección comprende entre
 - 2 - 8 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 1 de la tabla 9,
 - 3 - 15 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 2 de la tabla 9, y
 - 65 - 95 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9.
- La recolección mencionada anteriormente se puede, entre otras, trasplantar a un receptor en necesidad del mismo, almacenar de acuerdo con un método de la invención, o cultivar en el paso (ia) y/o paso (ii) de un método de la invención. La divulgación de este proporciona adicionalmente una bolsa desechable para cultivar células de mamífero que comprende una recolección de células como se define en el presente documento. La divulgación proporciona adicionalmente un biorreactor para cultivar células de mamífero que comprende una recolección de células como se define en el presente documento. La invención proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, que se puede obtener del paso (i) y/o paso (ia) de un método de la invención que comprende entre
- 1 - 10 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 1 de la tabla 9 caracterizada por ser CD34+, CD117-, CD56-, CD94-,
 - 2 - 15 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 2 de la tabla 9 caracterizada por ser CD34+, CD117+, CD56-, CD94-, y
 - 50 - 97 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9 caracterizada por ser CD34-, CD117+, CD56-, CD94-.
- Preferiblemente dicha recolección comprende entre
- 2 - 8 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 1 de la tabla 9,
 - 3 - 15 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 2 de la tabla 9, y
 - 65 - 95 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9.
- La divulgación proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas que se puede obtener del paso (ii) de un método de la invención que comprende entre
- 15 - 30 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9,
 - 2 - 8 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9,
 - 5 - 20 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9,
 - 1 - 5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9, y
 - 0.1 - 1.5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9.
- Preferiblemente dicha recolección comprende entre
- 18 - 26 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9,
 - 3 - 7 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9,
 - 8 - 17 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9,
 - 1.5 - 3.5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9, y
 - 0.2 - 1.0 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9.
- La divulgación proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas que se puede obtener del paso (ii) de un método de la invención que comprende entre
- 0.2 - 4 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9,
 - 6 - 16 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9,
 - 35 - 75 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9,
 - 12 - 24 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9, y
 - 0.2 - 3 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9. Preferiblemente dicha recolección comprende entre
 - 0.4 - 2.5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9,
 - 8 - 13 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9,
 - 45 - 65 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9,
 - 14 - 22 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9, y
 - 0.5 - 2.5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9.

La invención proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas, que se puede obtener del paso (ii) de un método de la invención para uso como un medicamento que comprende entre

- 0.2 - 4 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁺, CD94⁻,
- 7 - 21 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁻, CD117⁺, CD56⁺, CD94⁻,
- 35 - 78 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁻, CD117⁺, CD56⁺, CD94⁺,
- 9 - 21 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁻, CD117⁻, CD56⁺, CD94⁺, y
- 1 - 9 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁻, CD117⁻, CD56⁺, CD94⁻.

Preferiblemente dicha recolección comprende entre

- 0.3 - 1.0 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9,
- 11 - 18 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9,
- 45 - 68 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9,
- 11 - 18 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9, y
- 2.5 - 8.5 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9.

El porcentaje de células con un perfil de marcador celular de una cierta etapa preferiblemente contiene al menos las células con perfil de marcador celular más abundante de la etapa indicada para las células cultivadas in vitro de la tabla 11. Preferiblemente dicho porcentaje, comprende todas las poblaciones de células con un perfil de marcador celular enumerado para dicha etapa en el cultivo in vitro como se muestra en la tabla 11.

La recolección mencionada anteriormente se puede, entre otras, trasplantar a un receptor en necesidad de la misma, almacenar de acuerdo con un método de la invención o cultivarse en el paso (ii) de un método de la invención.

Las colecciones de células mencionadas en el presente documento pueden contener células con un perfil de marcador celular diferente al especificado. Por ejemplo, la recolección recolectada en el punto de tiempo s3 contiene, además de las poblaciones de células mencionadas, también células que tienen diferentes marcadores celulares.

Las células se pueden obtener al cosechar las células cultivadas en el punto de tiempo indicado o en un punto de tiempo diferente dentro del período especificado. Las células se pueden utilizar directamente o la población celular deseada se puede purificar a partir de dichas células cosechadas. Uno de los usos es el trasplante de las células recolectadas. Las células se pueden trasplantar sistémicamente, por ejemplo, a través de inyección intravenosa, o localmente, por ejemplo, a través de inyección en un determinado compartimento corporal tal como el peritoneo, o localmente en, por ejemplo, un tumor.

La etapa 1 está presente comúnmente en la médula ósea (BM) y durante las fases tempranas de la generación de células NK ex-vivo a partir de células CD34 positivas. La etapa 1 compromete los subconjuntos de G, N, L, P, F de los cuales G, N son específicos para el tejido de BM y L, P, F se podrían encontrar en células CD34⁺ enriquecidas de sangre del cordón umbilical (CB). Adicionalmente, CB tiene los subconjuntos E, K, M exclusivamente en la etapa 1 y los subconjuntos E, K están presentes en la semana 1 y 2 de la generación de células NK. Las células cosechadas en el punto de tiempo s1 o s2 son adecuadas para el cultivo continuo en el paso (i) o paso (ia) o paso (ii) de un método de la invención. Las células también se pueden trasplantar a un individuo en necesidad de las mismas. Por ejemplo, las células cosechadas en el punto de tiempo s2 se pueden trasplantar y diferenciar in vivo ser mejoradas mediante la infusión de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Adicionalmente, la diferenciación en otro linaje, tal como las células dendríticas, las CD, las células T, las células B o las células del linaje mieloide, se podría lograr con protocolos de cultivo modificados.

La etapa 2 está presente comúnmente en la médula ósea (BM) y durante las primeras fases de la generación de células NK ex vivo. La etapa 2 compromete los subconjuntos de G, E, L, P y F de los cuales P es específico para el tejido de BM y E, L, F, G se pueden encontrar en células CD34⁺ enriquecidas de sangre del cordón umbilical (CB). Adicionalmente, CB tiene exclusivamente subconjuntos K, N en la etapa 2. BM y CB comparten un subconjunto central E en la etapa 2 y esto permanece durante al menos 3 semanas de cultivo. CB en el día 0 tiene subconjuntos K, N más exclusivos de los cuales K está presente en la semana 1 y 2 durante la generación de células NK.

Las células de la etapa 2 también se encuentran en tejido CB y comparten un subconjunto central E con células CB expandidas ex vivo durante 3 semanas de cultivo. Las células del cultivo ex vivo muestran un subconjunto K exclusivo también después de la semana 1 y 2 de cultivo.

Las células cosechadas en el punto de tiempo s1 o s2 son adecuadas para el cultivo continuo en el paso (i) o paso (ia) o paso (ii) de un método de la invención. Las células también se pueden trasplantar a un individuo en necesidad de las mismas. Por ejemplo, las células cosechadas en el punto de tiempo s2 se pueden trasplantar y diferenciar in vivo, ser mejoradas mediante la infusión de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Las células NK inmunorreguladoras NK-22 (células NK que producen IL-22) se podrían cultivar con la adición de IL-1 β e IL-23. Adicionalmente, la diferenciación en otro linaje, tal como las células dendríticas (DC), las células T, las células B o las células del linaje mieloide, podría lograrse con protocolos de cultivo modificados.

- Las células de la etapa 3a se encuentran en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pudieron identificar varios subconjuntos tales como K, M, N, J, O y P. O se encuentra solo en SPL y BM, mientras que J adicionalmente también se encuentra en LN y LiLN. BM, CB y PB comparten un subconjunto central K, que también está presente durante 5 semanas del desarrollo de células NK. SPL, inLN y LiLN comparten el subconjunto P central y en LiLN también el subconjunto N es central. Cuando el subconjunto K es central en BM, CB y PB, es exclusivo para cultivos ex-vivo en comparación con SPL, inLN y LiLN.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M exclusivos en comparación con BM para la semana 1 - 3 y comparten P en la 1ª semana de cultivo y el subconjunto para la semana 1 - 3.
- Los cultivos ex-vivo tienen un subconjunto exclusivo E en comparación con CB en la semana 1 - 3 y comparten los subconjuntos M, N, P en la semana 1 - 3.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con PB en la semana 1 - 3 y comparten el subconjunto P en la semana 1 - 3.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con SPL en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con inLN en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, K exclusivos en comparación con LiLN en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.
- Por tanto, hay progenitores restringidos de células NK presentes durante todo el proceso de cultivo en las semanas 1 - 5. Las células de la etapa 3a son más específicas de tejido que las progenitoras de etapas anteriores de cultivo. La correlación del perfil de marcador de las células en el cultivo ex vivo con el perfil de marcador de subconjuntos de células NK o progenitores de las mismas en tejidos, indica que las células se alojarán preferiblemente en los tejidos con los que comparten un perfil de marcador. Junto con la maduración in vivo de células NK por infusión de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Las células NK inmunorreguladoras NK-22 (células NK que producen IL-22) se podrían cultivar con la adición de IL-1 β e IL-23. Estas células NK se pueden educar localmente para destruir las células cancerosas. Las células de la etapa 3a y el subconjunto son ideales para la manipulación específica del linaje de células NK por GAG, heparinas, citocinas u otras proteínas.
- Las células de la etapa 3b se encuentran en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pudieron identificar varios subconjuntos como K, M, N, J, B y P. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM y CB comparten un subconjunto central K, que también está presente durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). PB, SPL, inLN y LiLN comparten el subconjunto J central. Los cultivos ex-vivo contienen subconjuntos B, M, N, P exclusivos en comparación con BM durante la semana 3, B, M, N durante la semana 4 y comparten J en la 3ª y 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, J, P exclusivos en comparación con CB durante la semana 3, B, M, N y J durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, K, P exclusivos en comparación con PB durante la semana 3, B, M, N y K durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, K, P exclusivos en comparación con SPL durante la semana 3, B, M, N y K durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos exclusivos B, M, N, K en comparación con inLN durante la semana 3, y 4 y el subconjunto P se comparte en la 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos exclusivos B, M, K, P en comparación con LiLN durante la semana 3, B, M, K durante la semana 4 y comparten N en la 3ª y 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.
- Los principales subconjuntos de la etapa 3b son los subconjuntos centrales específicos de un tejido y, adicionalmente, hay algunos subconjuntos específicos de tejido J para BM y para inLN y N para LiLN. Estos subconjuntos se pueden utilizar para el tratamiento de linfomas, cáncer de hígado o infecciones como hepatitis o mieloma múltiple u otros cánceres hematológicos. En una realización preferida, el tratamiento comprende adicionalmente la maduración de células NK in vivo mediante infusión de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Las células NK inmunorreguladoras NK-22 (células NK que producen IL-22) se podrían cultivar con la adición de IL-1 β e IL-23. Estas células NK se pueden educar localmente para destruir las células cancerosas. Las células de la etapa

3b y los subconjuntos de las mismas son muy adecuados para la manipulación específica del linaje de células NK por GAG, heparinas, citocinas u otras proteínas.

5 Las células de la etapa 4 se encuentran en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pudieron identificar varios subconjuntos tales como K, M, J y B. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM, PB y LiLN comparten subconjuntos centrales J, B que están presentes durante 3 semanas de diferenciación de células NK (semana 3 - 5). CB, SPL e inLN comparten el subconjunto J central. Los cultivos ex vivo tienen subconjuntos K, M, exclusivos en comparación con BM, PB y LiLN para la semana 4+5. Los subconjuntos B, K, M se ven exclusivamente en la semana 4+5 de cultivos ex vivo en comparación con CB, SPL e inLN.

10 En la etapa 4 se detectan poblaciones y subconjuntos de células que también ocurren en tejidos y cultivos ex vivo. Los principales subconjuntos son los subconjuntos centrales J o B que ocurren in vivo y ex vivo. La etapa 4 y los subconjuntos son productos de células NK más universales para tratar varios cánceres o infecciones. El tratamiento preferiblemente comprende adicionalmente la maduración de células NK in vivo mediante infusión de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Estas células NK se pueden educar localmente para destruir las células cancerosas. Las células y subconjuntos de la etapa 4 son una diana para la manipulación específica del linaje de células NK por GAG, heparinas, citocinas u otras proteínas.

20 Las células de la etapa 5a se encuentran en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pudieron identificar varios subconjuntos tales como K, M, J, B. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM, PB, inLN y LiLN comparten los subconjuntos centrales J, B que están presentes durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). En CB y SPL comparten el subconjunto J central en comparación con la semana 3 - 5 de cultivo.

25 Los cultivos ex-vivo tienen el subconjunto exclusivo K en comparación con BM, inLN y LiLN durante la 4ª y 5ª semanas de cultivo. Se comparte el subconjunto M en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

Los cultivos ex-vivo tienen un subconjunto B exclusivo en la 3ª semana de cultivo en comparación con CB y SPL y subconjuntos K, B exclusivos adicionales durante la 4ª y 5ª semanas de cultivo. Se comparte el subconjunto M en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

30 Los subconjuntos K de los cultivos ex-vivo en comparación con PB en la 4ª semana y comparten los subconjuntos K, M durante la 5ª semana de cultivo.

La etapa 5a del cultivo in vitro exhibe subconjuntos similares a aquellos detectados en la sangre periférica (PB). Los subconjuntos principales son los subconjuntos centrales J o B que se producen tanto in vivo como ex vivo. La etapa 5a y los subconjuntos son células NK más maduras y citotóxicas, pero también productoras de citocinas. Las células se pueden trasplantar directamente al receptor en necesidad de las mismas para destruir las células infectadas por virus o células cancerosas. Adicionalmente el receptor se puede tratar in vivo con infusión de activación de células NK específica de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Estas células NK se pueden educar localmente para destruir el cáncer o las células infectadas con patógenos. Las células de la etapa 5a y el subconjunto son una diana para la manipulación específica del linaje de células NK por GAG, heparinas, citocinas u otras proteínas. El tratamiento puede comprender adicionalmente una terapia combinada con anticuerpos para dirigir células NK o bloquear los receptores activadores o inhibidores. Adicionalmente, las modificaciones de la terapia con células NK al utilizar fármacos inmunomoduladores u otros agentes quimioterapéuticos para aumentar la función de las células NK también se pueden utilizar junto con el trasplante de células de la etapa 5a. Las rutas de administración abarcan la ruta intravenosa o las inyecciones en un sitio local.

Las células de la etapa 5b se encuentran en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex-vivo. Se pudieron identificar varios subconjuntos como K, M, J, B, P, N. Se encontraron subconjuntos específicos de tejido como P, N en PB y P en inLN. BM, CB, PB, SPL, inLN y LiLN comparten un subconjunto principal central M, que está presente durante 3 semanas de diferenciación de células NK (semana 3 - 5). En BM, CB y PB comparten además el pequeño subconjunto central K en comparación con la semana 3 - 5 de cultivo.

Los cultivos ex vivo tienen un subconjunto B exclusivo en comparación con BM, CB y PB durante la 3ª y 5ª semana de cultivo. El subconjunto J se comparte en la semana 4+5 de cultivos ex vivo.

55 Los cultivos ex vivo tienen subconjuntos exclusivos B, K en comparación con SPL, inLN y LiLN 3ª y 5ª semana de cultivo. El subconjunto J se comparte en la semana 4+5 de cultivos ex vivo.

La etapa 5b se caracteriza por una prevalencia de células NK maduras, aunque las células cultivadas in vitro también son citotóxicas en las etapas de cultivo más tempranas. En la semana 3+4, los mismos subconjuntos principales en los cultivos ex vivo son compartidos o centrales como en todos los tejidos. Los principales subconjuntos son los subconjuntos centrales J o M que ocurren tanto in vivo como ex vivo, mientras que ex vivo también tiene los principales subconjuntos B, K de una manera más o menos exclusiva. Las células y subconjuntos de la etapa 5b son células NK más maduras y citotóxicas, pero también contienen productores de citocinas. Las células son adecuadas para el trasplante en el individuo en necesidad de las mismas. Preferiblemente, el tratamiento comprende adicionalmente una infusión de activación de células NK específica in vivo de IL-2 o IL-15 o ambos y/o en combinación con IL-12, IL-18 o IL21 o una combinación de los mismos. Estas células NK se pueden educar localmente para destruir las células cancerosas o las células infectadas con patógenos. Las células de la etapa 5b y el subconjunto se pueden dirigir para la manipulación específica del linaje de

5 células NK por GAG, heparinas, citocinas u otras proteínas. Adicionalmente, el tratamiento puede comprender además la terapia combinada con anticuerpos para dirigir células NK o bloquear los receptores activadores o inhibidores. Adicionalmente, las modificaciones de la terapia con células NK mediante el uso de fármacos inmunomoduladores u otros agentes quimioterapéuticos para aumentar la función de las células NK también se pueden utilizar junto con el trasplante de células en etapa 5b. Las rutas de administración abarcan, entre otras, la ruta intravenosa, pero también las inyecciones en un sitio local como ruta para la administración de células NK.

10 La divulgación proporciona adicionalmente una recolección 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, que se puede obtener mediante un método de la invención. Preferiblemente, dicha recolección de recipientes de almacenamiento comprende al menos 5 recipientes que contiene 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 cosechadas a partir de un cultivo que fue iniciado por células de una sola fuente, es decir, un solo individuo humano. Normalmente, dichas células son genéticamente idénticas. Esto tiene la ventaja de que el control de calidad se puede realizar en una muestra separada. Adicionalmente, el almacenamiento en recipientes separados permite la administración secuencial del injerto a un humano que lo necesite. Si el individuo responde bien a 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 divulgación proporciona adicionalmente un banco de células que comprende una recolección de células cultivadas 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, que se puede obtener mediante un método de la invención o que comprende una recolección de recipientes de almacenamiento de acuerdo con la invención.

25 La divulgación proporciona adicionalmente un método de la invención que comprende adicionalmente obtener una muestra de células de dicho cultivo del paso (i), paso (ia) y/o paso (ii) y determinar las etapas de desarrollo de NK en las células de dicho cultivo. Preferiblemente el cultivo del paso (i), paso (ia) o paso (ii) se termina sobre la base de una etapa de desarrollo detectada de desarrollo en dicha muestra.

30 La divulgación proporciona adicionalmente una recolección de células cultivadas cosechadas derivadas de un cultivo de células madre, células progenitoras o ambas de tejido postembrionario humano obtenidas de un individuo humano, que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas, que se ha almacenado durante al menos 1 día a una temperatura de entre temperatura ambiente y 0°C , en la que dicha pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas comprende al menos 70 % de células NK viables o células progenitoras NK o ambas, según se determina por exclusión 7AAD. Durante la aplicación clínica de la recolección de células cultivadas cosechadas, como una medición de la calidad, se mide la viabilidad de las células. Se prefiere tener un alto porcentaje de células NK viables o células progenitoras NK o ambas en la recolección de células cultivadas cosechadas que son transfundidas a un paciente.

40 Por lo tanto, la divulgación, proporciona una recolección de células cultivadas cosechadas derivadas de un cultivo de células madre, células progenitoras o ambas de tejido postembrionario humano obtenidas de un individuo humano, que contienen una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas, que se ha almacenado durante al menos 1 día a una temperatura de entre temperatura ambiente y 0°C , en la que dicha pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas comprende al menos 70 % de células NK viables o células progenitoras NK o ambas, según se determina por exclusión 7AAD.

50 Se prefiere, especialmente cuando las células NK son transfundidas a otro individuo como el individuo del cual se cosechan las células madre o progenitoras, que la recolección es esencialmente libre de células T CD3⁺. Las células T CD3⁺ pueden inducir condiciones que amenazan la vida, tales como enfermedad del injerto contra el anfitrión. Por lo tanto, en una realización preferida, se proporciona una recolección de células cultivadas cosechadas de acuerdo con la invención, en la que la recolección es esencialmente libre de células T CD3⁺.

55 Las células NK o las células progenitoras de las mismas tienen propiedades diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo de las células NK o del progenitor. El hecho de que un sistema de cultivo como se proporciona por la invención proporcione células NK y progenitores de las mismas en varias etapas de desarrollo se puede utilizar para adaptar un injerto a la necesidad específica del individuo que se va a tratar con el injerto. Por ejemplo, se ha encontrado en la presente invención que ciertas etapas tienen una preferencia de orientación diferente in vivo. Esta preferencia de diferentes etapas de desarrollo se utiliza en la presente invención para proporcionar injertos que se adaptan a la enfermedad específica que se va a tratar. Una etapa de desarrollo de células NK o células progenitoras se puede aplicar, como cada etapa de desarrollo en un entorno clínico diferente. Dicha etapa de desarrollo se puede determinar mediante varios marcadores de superficie de células NK o células progenitoras NK. La presente invención ha establecido que se pueden distinguir al menos 7 etapas de desarrollo diferentes en las células NK y progenitores de las mismas. Para este fin la invención proporciona un método para determinar una etapa de desarrollo del desarrollo de NK, dicho método comprende

65 - obtener una muestra de células de dicho cultivo del paso (i), paso (ia) y/o paso (ii),

- determinar cuatro o más de los marcadores de superficie celular CD 133, CD34, CD 117, CD244, CD45, CD33, CD3, CD56, CD94, CD159a, CD2, CD7, CD10, CD18, CD11a, LFA-1, CD122 y CD45RA, en los que la expresión de una combinación de dichos marcadores de superficie celular es indicativa para dicha etapa de desarrollo., y
- determinar una etapa de desarrollo de las células NK presentes en dicha muestra.

5

Los marcadores preferidos para dichas etapas son CD34, CD117, CD56 y CD94. La combinación de CD34, CD 117, CD56 y CD94 es muy útil en determinar la etapa de desarrollo de células NK o células progenitoras NK. Ahora que la invención ha mostrado que estas 7 etapas de desarrollo existen también se pueden utilizar otros marcadores para identificar las etapas de desarrollo detectadas. En una realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, en el que dicha etapa de desarrollo del desarrollo de NK se clasifica como etapa 1, 2, 3a, 3b, 4, 5a, y 5b al medir la expresión de los marcadores de superficie CD34, CD117, CD56, y CD94, en los que

10

la etapa 1 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 positivo, CD 117 negativo, CD56 negativo, CD94 negativo,
 la etapa 2 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 positivo, CD 117 positivo, CD56 negativo, CD94 negativo,
 la etapa 3a se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD 117 positivo, CD56 negativo, CD94 negativo,
 la etapa 3b se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD 117 positivo, CD56 positivo, CD94 negativo,
 la etapa 4 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD 117 positivo, CD56 positivo, CD94 positivo,
 la etapa 5a se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD 117 negativo, CD56 positivo, CD94 positivo,
 la etapa 5b se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD 117 negativo, CD56 positivo, CD94 negativo.

15

20

25

Se pueden utilizar marcadores adicionales, tales como CD133, CD33, CD244 o NKG2A, para confirmar la etapa de desarrollo determinada mediante un método de acuerdo con la invención. por lo tanto, en una realización preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención, que comprende adicionalmente medir la expresión de CD133, CD33, CD244, y NKG2A, en la que
 la etapa 1 se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de CD33, CD244, y NKG2A,
 la etapa 2 se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de NKG2A, la etapa 3a se caracteriza adicionalmente por células negativas para expresión de CD 133 y NKG2A,
 la etapa 3b se caracteriza adicionalmente por células negativas para expresión de CD133, CD33, y NKG2A,
 las etapas 4, 5a y 5b se caracterizan adicionalmente por células negativas para expresión de CD 133 y CD33.

30

35

La presente invención describe el proceso de traducción exitoso para implementar un protocolo de cultivo celular altamente eficaz para la generación de productos de células NK puras y funcionales a partir de células madre hematopoyéticas y precursoras derivadas de UCB en un procedimiento de GMP de aplicación clínica. Hemos informado sobre un método de cultivo para la generación ex vivo de células NK funcionales para aplicación clínica en el tratamiento de pacientes con AML y otras neoplasias malignas [17]. Este proceso de cultivo sin estroma, basado en citocinas, utiliza solo proteínas recombinantes humanas. El proceso se ha traducido a una versión compatible con GMP que comienza con un enriquecimiento de grado clínico eficiente de células CD34+ de UCB criopreservadas. Adicionalmente, generamos un producto de terapia celular UCB-NK utilizando un proceso de producción cerrado optimizado para la diferenciación de células NK utilizando biorreactores. Adicionalmente, demostramos que el proceso de cultivo celular es seguro y que el producto se podría procesar, almacenar y liberar de manera segura para los pacientes. Normalmente, se requiere un proceso de selección de grado clínico para la célula CD34+ de UCB para traducir el proceso en un entorno GMP. Hasta ahora, varios estudios informaron sobre la selección inmunomagnética del sistema cerrado de células CD34+ de UCB criopreservadas [20-23]. La mayoría de los estudios utilizaron el sistema Isolex300i o CliniMACS, pero hasta la fecha solo el sistema CliniMACS todavía está disponible para aplicaciones clínicas. Debido a modificaciones técnicas como diferentes conjuntos de tubos para el CliniMACS (tubo 150 en estudios más antiguos y tubo 161-01 en este estudio) y diferencias en el procesamiento de la sangre del cordón umbilical previa a la criopreservación (uso de diferentes anticoagulantes o métodos para la reducción de volumen y eliminación de glóbulos rojos) se pueden esperar variaciones para la eficiencia del procedimiento de selección. La influencia de diferentes métodos de reducción de volumen y eliminación de glóbulos rojos en la recuperación de CD34+ ha sido ampliamente estudiada [24-27] y utilizamos un método bien establecido en nuestro estudio [28]. Los estudios sobre diferentes métodos de selección de células CD34+ mostraron una recuperación mediana del 31 % (n = 10) [23] y del 31 % (n = 11) [20] utilizando el dispositivo CliniMACS. Por el contrario, encontramos una recuperación media general de CD34+ más alta del 50 % (n = 16) en comparación con el volumen reducido de sangre del cordón umbilical y del 73 % (n = 16) con respecto a la UCB descongelada. Esto muestra que utilizamos un poderoso procedimiento de descongelación que proporcionó una buena base para una selección superior de CD34+ en comparación con estudios anteriores. Querol et al. [21] utilizaron un procedimiento de descongelación similar con Pulmozyme sobre unidades de sangre de cordón umbilical tratadas con HES, sin embargo, utilizaron Isolex-300-SA para la selección de CD34. Utilizaron una cohorte de sangre de cordón similar con $1.11 \pm 0.5 \times 10^9$ células nucleadas (NC) y $3.64 \pm 2.54 \times 10^6$ células CD34+ en comparación con la nuestra con $1.08 \pm 0.4 \times 10^9$ NC y $3.78 \pm 1.95 \times 10^6$ células CD34+. Aislaron $1.94 \pm 1.55 \times 10^6$ células CD34+ con una pureza del 69 % $\pm$ 16 % y una

40

45

50

55

60

65

recuperación del $52 \% \pm 12 \%$ en comparación con la población antes de la criopreservación. Utilizando un sistema CliniMACS actualizado, aislamos un número de células CD34+ de $1.96 \pm 1.27 \times 10^6$ células con una pureza del $67 \% \pm 14 \%$ y una recuperación del $53 \% \pm 15 \%$, similar al estudio descrito. Demostramos con los procedimientos actuales de descongelación y selección de CD34+ que es factible una preparación suficiente de un producto de células CD34+ para uso directo o manipulación de injertos.

Adicionalmente, investigamos si estos productos de células madre y progenitoras seleccionadas clínicamente se podrían expandir de manera eficiente y diferenciarse aún más en un sistema de cultivo de células cerrado. La combinación de bolsas estáticas durante la fase de expansión y el uso de biorreactores para el proceso de diferenciación permitió la generación de un producto de células NK DE UCB viable, puro y funcional para terapia celular. Los sistemas de biorreactores WaveTM o BiostatTM tienen la ventaja de que la mezcla de CO₂ se proporciona como espacio superior en la bolsa y la oscilación de la bolsa debería mediar un mejor intercambio de gases en comparación con los sistemas de cultivo de bolsas estáticas. Por lo tanto, el proceso de diferenciación de células NK pareció ser más óptimo bajo estas condiciones.

Adicionalmente, realizamos varias pruebas en el producto final para describir los criterios de liberación del producto para el producto de terapia de células NK USB (resumido en la Tabla 4). La estabilidad genética se controló mediante análisis de cariotipo y no mostró anomalías después de 6 semanas de cultivos. Los productos siempre fueron negativos para contaminación bacteriana, fúngica o por micoplasma. Después de lavar el producto, el volumen se redujo de 1 litro a 150 ml antes de la infusión. Los niveles de citocinas fueron < 25 pg/ml y la inmunofenotipificación describió la pureza, viabilidad y fenotipo del producto y mostró la ausencia de células T. En resumen, adaptamos nuestro método en un bioproceso de sistema cerrado para la producción de tandas de células NK alogénicas bajo condiciones GMP, con el fin de utilizar células NK expandidas ex vivo para inmunoterapia adoptiva en pacientes con AML de mal pronóstico. Los experimentos a gran escala que utilizaron bolsas de cultivo permeables a los gases y el escalamiento del paso de expansión de las células NK en los sistemas de biorreactores dieron como resultado la generación de más de 3.5×10^9 productos de células NK con una pureza de hasta el 95 %. Adicionalmente, los productos de células NK DE UCB se podrían finalmente procesar para infusión utilizando un sistema cerrado y almacenar hasta que todas las pruebas de control del producto estén disponibles para liberar el producto de terapia de células NK DE UCB. Es importante destacar que, más recientemente, obtuvimos la aprobación de las autoridades holandesas ("Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek" (CCMO)) para realizar un ensayo de fase I/II utilizando estos productos de terapia de células NK DE UCB alogénicas. Los productos de células NK se administrarán a los pacientes por vía intravenosa mediante una escalada de la dosis de 3×10^6 , 10×10^6 , 3×10^7 y 10×10^7 células NK por kg de peso corporal en cohortes de tres pacientes. El objetivo principal de este estudio de escalada de dosis de fase I es evaluar la seguridad y toxicidad de las infusiones de células NK expandidas ex vivo después de un régimen de quimioterapia que agota los linfocitos. Los objetivos secundarios son evaluar la vida útil in vivo de los productos de células NK infundidos y los efectos sobre la enfermedad residual.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Generación ex vivo de células NK CD56+ a partir de células de UCB CD34+ criopreservadas. Las células de UCB enriquecidas en CD34 se expandieron durante dos semanas y posteriormente se diferenciaron en células NK durante cuatro semanas adicionales. Los cultivos celulares se analizaron semanalmente para determinar el número de células y el fenotipo utilizando citometría de flujo. (A) Veces de expansión de las células totales para cada donante después de la siembra inicial de células de UCB CD34+ enriquecidas durante 6 semanas de cultivo utilizando bolsas de cultivo celular estáticas Vuelife™. (B) Frecuencia de células CD56+ para cada donante durante el período de cultivo de 6 semanas para cultivos en bolsa estática. (C) Veces de expansión de las células totales para cada donante después de la siembra inicial de la población de células de UCB CD34+ enriquecidas durante 6 semanas de cultivo utilizando biorreactores de un solo uso. (D) Frecuencia de células CD56+ para cada donante durante el período de cultivo de 6 semanas para cultivos de biorreactor. (E) Expansión de células NK CD56+ media total durante 4 semanas de diferenciación utilizando cultivos de bolsa estática (n = 3) o biorreactores (n = 4). Los datos se representan como media $\pm$ DE. El asterisco (*) representa un valor p de < 0.05 .

Figura 2. Actividad funcional de células NK expandidas con biorreactor ex vivo antes y después del proceso de lavado. (A) Se analizó la citotoxicidad de las células NK generadas ex vivo contra las células K562 después de 18 horas de cocultivo con células NK sin lavar (barras negras) y lavadas (barras blancas) de tres donantes diferentes en una relación E:T de 1:1 o 10:1. (B) La desgranulación de las células NK generadas ex vivo contra K562 se analizó mediante la expresión de CD107a después de 18 horas de cocultivo después de células NK sin lavar (barras negras) y lavadas (barras blancas) de tres donantes diferentes en una relación E:T de 1:1.

Figura 3. Análisis de citometría de flujo de células NK expandidas con biorreactor ex vivo antes y después del lavado. Se analizaron los linfocitos CD56+CD3- de los productos de células NK sin lavar (A) y lavadas (B). Se muestra un ejemplo representativo de tres productos de células NK diferentes.

Figura 4. Pruebas de estabilidad de productos de células NK procesados y generados ex vivo. (A) Se siguió el contenido de células NK del producto final procesado a lo largo del tiempo, mientras que los productos se almacenaron a 4 °C o a temperatura ambiente (TA) durante un máximo de 3 días. El porcentaje de células CD45+/CD56+ se muestra a partir de 3 pruebas de estabilidad diferentes. (B) Se siguió la viabilidad del producto final de células NK a lo largo del tiempo, mientras

que los productos se almacenaron a 4 °C o temperatura ambiente (TA). El porcentaje de células CD45⁺/CD56⁺/7-AAD⁻ se muestra a partir de 3 pruebas de estabilidad diferentes.

Figura 5. Porcentaje de células positivas para la expresión del marcador indicado después de cultivar en un biorreactor o una bolsa estática (A). Análisis de citometría de flujo de células cultivadas en biorreactor y en bolsa estática (B).

Figura 6. Se cultivaron ex vivo en un biorreactor de células de cuatro donantes diferentes (A, B, C y D). Se representa el porcentaje de células positivas para la expresión del marcador indicado después del cultivo, lavado y después del almacenamiento a 4 °C durante 1, 2 o 3 días como se indica.

Figura 7. Las células NK generadas ex vivo (e.v.) lisan eficazmente las células diana K562 en comparación con las células NK de sangre periférica (PB).

Figura 8. Expresión de varios genes de células NK PB tenues y brillantes, células NK PB activadas para la expresión de células NK generadas ex vivo.

Figura 9. Identificación de siete etapas de desarrollo de células NK en la médula ósea (BM). Con base en las etapas definidas en la Tabla 5, analizamos la presencia de las diferentes etapas de desarrollo de las células NK en la BM. Se muestra un ejemplo representativo (n = 5). Las células se agruparon en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Posteriormente, los subconjuntos de células se dividieron en base a la expresión de CD34 y CD117. A partir de ahí, se analizó la expresión de CD56 y CD94 en cada subconjunto, lo que condujo a la identificación de siete etapas de desarrollo de células NK: 1, 2, 3a, 3b, 4, 5a, 5b.

Figura 10. Expresión de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de las etapas de desarrollo de las células NK en la médula ósea (BM). Las células se agruparon en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. A continuación, los subconjuntos de células se dividieron en base a la expresión de CD34 y CD 117. A partir de ahí, se analizó cada subconjunto para expresión de CD56 y CD94. Posteriormente, se analizó la expresión de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de las diferentes etapas de desarrollo de células NK en BM (n = 5). Los paneles de la izquierda muestran los porcentajes de células positivas para los marcadores específicos. Los paneles de la derecha muestran la fluorescencia media (MFI) de cada marcador específico. Las poblaciones de células > 0.1 % de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Las poblaciones de células se consideraron específicas de tejido cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados fiables. Las poblaciones de células que no cumplían con estos criterios se excluyeron del análisis (estadístico) adicional. En esta figura se muestran todas las etapas de desarrollo de las células NK dentro de cada tejido.

Figura 11. Distribución de las etapas de desarrollo de las células NK en diferentes tejidos humanos. La distribución de las siete etapas de desarrollo de las células NK se analizó en muestras de médula ósea (BM), sangre de cordón (CB), sangre periférica (PB), LN inguinal (inLN), LN hepático (liLN) y bazo (SPL) (todos n = 5). Para la identificación de las etapas de desarrollo de las células NK, las células se agruparon en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Posteriormente, los subconjuntos de células se dividieron en base a la expresión de CD34 y CD 117. A partir de ahí, se analizó cada subconjunto para la expresión de CD56 y CD94. Las poblaciones de células > 0.1 % de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Las poblaciones de células se consideraron específicas de tejido cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados fiables. Las poblaciones de células que no cumplían con estos criterios se excluyeron del análisis (estadístico) adicional. En esta figura se muestran todas las etapas de desarrollo de las células NK dentro de cada tejido. La comparación entre los diferentes tejidos se analizó utilizando un modelo de regresión logística de efectos aleatorios; * P < .05, **P < .01, ***P < .0001.

Figura 12. Expresión de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de las etapas de desarrollo de las células NK presentes en diferentes tejidos humanos. Las células se agruparon en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. A continuación, los subconjuntos de células se dividieron en base a la expresión de CD34 y CD 117. A partir de ahí, se analizó cada subconjunto para la expresión de CD56 y CD94. Posteriormente, se analizó la expresión (%) de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de las distintas etapas de desarrollo de las células NK en médula ósea (BM), sangre de cordón (CB), sangre periférica (PB), LN inguinal (inLN), LN hepático (liLN) y bazo (SPL) (todos n = 5). Las poblaciones de células > 0.1 % de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Las poblaciones de células se consideraron específicas de tejido cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados fiables. Las poblaciones de células que no cumplían con estos criterios se excluyeron del análisis (estadístico) adicional. La comparación entre los diferentes tejidos se analizó utilizando un modelo de regresión logística de efectos aleatorios; * P < .05, **P < .01, ***P < .0001.

Figura 13. Expresión de KIR, NKG2A/C, NCR, NKG2D y CD244 dentro del subconjunto de células NK CD56^{brillante}CD16^{+/-} de diferentes tejidos humanos. Las células se agruparon en la población CD45⁺CD56⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Posteriormente, se analizó la expresión de KIR, NKG2A/C, NCR (NKp30, 44, 46), NKG2D y CD244 dentro del subconjunto de células NK CD56^{brillante}CD16^{+/-} presente en la población de células NK comprometidas de la médula ósea (BM), sangre del cordón

umbilical (CB), sangre periférica (PB), LN inguinal (inLN), LN hepático (liLN) y bazo (SPL) (todos n = 5). (A) Se muestran los porcentajes de células CD56^{brillante}CD16^{+/-} positivas para cada receptor específico dentro de cada tejido. (B) Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada receptor específico expresado por células CD56^{brillante}CD16^{+/-}. Las poblaciones de células > 0.1 % de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Las poblaciones de células se consideraron específicas de tejido cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados fiables. La comparación de los porcentajes de células positivas entre los diferentes tejidos se analizó utilizando un modelo de regresión logística de efectos aleatorios. La comparación de MFI de células positivas entre los diferentes tejidos se analizó utilizando ANOVA; *P < .05, **P < .01, ***P < .0001.

Figura 14. Expresión de KIR, NKG2A/C, NCR, NKG2D y CD244 dentro del subconjunto de células NK CD56^{tenue}CD16⁺ de diferentes tejidos humanos. Las células se agruparon en la población CD45⁺CD56⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Posteriormente, se analizó la expresión de KIR, NKG2A/C, NCR (NKp30, 44, 46), NKG2D y CD244 dentro del subconjunto de células NK CD56^{tenue}CD16⁺ presentes en la población de células NK comprometidas de la médula ósea (BM), sangre del cordón umbilical (CB), sangre periférica (PB), LN inguinal (inLN), LN hepático (liLN) y bazo (SPL) (todos n = 5). (A) Se muestran los porcentajes de células CD56^{tenue}CD16⁺ positivas para cada receptor específico dentro de cada tejido. (B) Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada receptor específico expresado por células CD56^{tenue}CD16⁺. Las poblaciones de células > 0.1 % de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Las poblaciones de células se consideraron específicas de tejido cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados fiables. La comparación de los porcentajes de células positivas entre los diferentes tejidos se analizó utilizando un modelo de regresión logística de efectos aleatorios. La comparación de MFI de células positivas entre los diferentes tejidos se analizó utilizando ANOVA; *P < .05, **P < .01.

Figura 15. Modelo propuesto para el desarrollo de células NK humanas in vivo. Con base en nuestros datos, proponemos que las células NK precursoras (etapa 2) transitan desde BM hasta LN, donde tiene lugar el compromiso con el linaje de células NK (etapa 3a → 3b) seguido de la diferenciación in situ de células NK con maduración restringida del repertorio de receptores de células NK. Para una mayor diferenciación de las células NK comprometidas, las células CD56^{brillante} (etapa 4) pueden transitar hacia el tejido esplénico en el que se pueden desarrollar células CD56^{tenue} y tiene lugar una maduración adicional del repertorio de receptores de células NK. La maduración final de las células NK se produce mediante el tráfico de células hacia la periferia desde la cual las células NK se pueden distribuir adicionalmente a diferentes compartimentos del cuerpo humano.

Figura 16. Intensidad de fluorescencia media de la expresión de NKG2A después de la etapa 4 a 5b.

Figura 17. Expresión de CD 16 y CD56 en subconjuntos BM, CB, PB, LN y SPL.

Figura 18. Análisis de la expresión génica de genes seleccionados durante el desarrollo de células NK en poblaciones de células clasificadas en el día 27 del desarrollo de células NK. Los cultivos de células NK después de 4 semanas de cultivos se clasificaron en poblaciones de células NK NKp46+ discriminadas adicionalmente por células NKG2A positivas o negativas. Las células no NK en el cultivo se caracterizaron por CD14+ y CD 14-/NKp46-. En el presente documento se probaron los genes específicos de células NK más relevantes para las poblaciones de células clasificadas, tal como los receptores específicos de células NK comunes que estaban altamente expresados (A), así como genes para moléculas citolíticas (B) y genes conocidos de la señalización de células NK (C). NKG2A, CD94 y CD 16 se expresaron a niveles bajos en la fracción NKG2A-. La fracción NKG2A+ mostró una alta expresión de NKG2A y CD94 y una expresión más intermedia de CD 16. Adicionalmente, las células NKG2A+ tienen una alta expresión de varias moléculas citolíticas (B).

Figura 19. Las etapas 1 y 2 no están comprometidas con el linaje de células NK.

La etapa 1 está comúnmente presente en médula ósea (BM) y durante generación de células NK ex vivo y compromete los subconjuntos de G, N, L, P, F de los cuales G, N son específicos para tejido BM y se pueden encontrar L, P, F en células CD34+ enriquecidas de sangre del cordón umbilical (CB). Adicionalmente CB tiene exclusivamente subconjuntos E, K, M en la etapa 1 y los subconjuntos E, K están presentes en la semana 1 y 2 de la generación de células K.

La etapa 2 está comúnmente presente en médula ósea (BM) y durante la generación de células NK ex vivo y compromete los subconjuntos de G, E, L, P, F de los cuales P es específico para tejido BM y se encontraron E, L, F, G en células CD34+ enriquecidas de sangre del cordón umbilical (CB). Adicionalmente CB tiene exclusivamente subconjuntos K, N en la etapa 2. BM y CB comparten un subconjunto central E en la etapa 2 y esto permanece durante al menos 3 semanas de cultivo. CB en el día 0 tiene subconjuntos K, N más exclusivos de los cuales K está presente en la semana 1 y 2 durante la generación de células NK.

Las células de la etapa 2 también se encuentran en tejido CB y comparten un subconjunto central E con células CB expandidas ex vivo durante 3 semanas de cultivo. Las células del cultivo ex-vivo muestran un subconjunto exclusivo K también después de la semana 1 y 2 de cultivo.

Figura 20. Se encuentran las células de la etapa 3a en varios tejidos tales como BM, CB, sangre periférica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (liLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pueden identificar varios subconjuntos tales como K, M, N, J, O, P. Solo se encuentra O en SPL y BM mientras que J también se encuentra adicionalmente en inLN y liLN. BM, CB y PB comparten un subconjunto central K, que también está presente durante 5 semanas del desarrollo de células NK. SPL, inLN y liLN comparten el subconjunto P

central y en LiLN también el subconjunto N es central. Cuando el subconjunto K es central en BM, CB y PB, es exclusivo para cultivos ex-vivo en comparación con SPL, inLN y LiLN.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M exclusivos en comparación con BM durante la semana 1 - 3 y comparten P en la 1ª semana de cultivo y el subconjunto N durante la semana 1 - 3.

5 Los cultivos ex-vivo tienen un subconjunto E exclusivo en comparación con CB en la semana 1 - 3 y comparten los subconjuntos M, N, P en la semana 1 - 3.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con PB en la semana 1 - 3 y comparten el subconjunto P en la semana 1 - 3.

10 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con SPL en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, N, K exclusivos en comparación con inLN en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos E, M, K exclusivos en comparación con LiLN en la semana 1 - 3 y el subconjunto K en la semana 4+5.

15
20 Figura 21. Se encuentran las células de la etapa 3b en varios tejidos tales como BM, CB, sangre perirérica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. También se pueden identificar varios subconjuntos tales como K, M, N, J, B, P. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM y CB comparten un subconjunto central K, que también está presente durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). PB, SPL, inLN y LiLN comparten el subconjunto J central.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, P exclusivos en comparación con BM durante la semana 3, B, M, N durante la semana 4 y comparten J en la 3ª y 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

25 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, J, P exclusivos en comparación con CB durante la semana 3, B, M, N, J durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, K, P exclusivos en comparación con PB durante la semana 3, B, M, N, K durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

30 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, K, P exclusivos en comparación con SPL durante la semana 3, B, M, N, K durante la semana 4 de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, N, K exclusivos en comparación con inLN durante la semana 3, y 4 y subconjunto P se comparte en la 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

35 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos B, M, K, P exclusivos en comparación con LiLN durante la semana 3, B, M, K durante la semana 4 y comparten N en la 3ª y 4ª semana de cultivo. Los subconjuntos B, M, K son vistos exclusivamente en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

40 Figura 22. Se encuentran las células de la Etapa 4 en varios tejidos tales como BM, CB, sangre perirérica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pueden identificar varios subconjuntos tales como K, M, J, B. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM, PB y LiLN comparten subconjuntos centrales J, B, que están presentes durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). CB, SPL e inLN comparten el subconjunto J central. Los cultivos ex-vivo contienen subconjuntos exclusivos K, M, en comparación con BM, PB y LiLN durante la semana 4+5. Los subconjuntos B, K, M son vistos exclusivamente en la semana 4+5 de los cultivos ex-vivo en comparación con CB, SPL e inLN.

50 Figura 23. Se encuentran las células de la etapa 5a en varios tejidos tales como BM, CB, sangre perirérica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pueden identificar varios subconjuntos tales como K, M, J, B. No se encontró ningún subconjunto específico de tejido. BM, PB, inLN y LiLN comparten los subconjuntos centrales J, B, que están presentes durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). CB y SPL comparten el subconjunto J central en comparación con la semana 3 - 5 de cultivo.

55 Los cultivos ex-vivo tienen el subconjunto exclusivo K en comparación con BM, inLN y LiLN durante la 4ª y 5ª semanas de cultivo. Se comparte el subconjunto M en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

Los cultivos ex-vivo tienen un subconjunto B exclusivo en la 3ª semana de cultivo en comparación con CB y SPL y adicionalmente los subconjuntos K, B exclusivos durante la 4ª y 5ª semanas de cultivo. Se comparte el subconjunto M en la semana 5 de los cultivos ex-vivo.

60 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos K en comparación con PB en la 4ª semana y comparten los subconjuntos K, M durante la 5ª semana de cultivo.

Figura 24. Se encuentran las células de la etapa 5b en varios tejidos tales como BM, CB, sangre perirérica (PB), bazo (SPL), ganglios linfáticos inguinales (inLN), ganglios linfáticos hepáticos (LiLN) y durante la generación de células NK ex vivo. Se pueden identificar varios subconjuntos tales como K, M, J, B, P, N. Se encontraron los subconjuntos específicos a tejido como P, N en PB y P en inLN. BM, CB, PB, SPL, inLN y LiLN comparten un subconjunto principal central M, que

está presente durante 3 semanas de la diferenciación de células NK (semana 3 - 5). En BM, CB y PB comparten adicionalmente el pequeño subconjunto central K en comparación con la semana 3 - 5 de cultivo.

Los cultivos ex-vivo tienen el subconjunto B exclusivo en comparación con BM, CB y PB durante 3ª y 5ª semana de cultivo.

El subconjunto J se comparte en la semana 4+5 de los cultivos ex-vivo.

5 Los cultivos ex-vivo tienen subconjuntos exclusivos B, K en comparación con SPL, inLN y LiLN en la 3ª y 5ª semana de cultivo. El subconjunto J se comparte en la semana 4+5 de los cultivos ex-vivo.

Figura 25. Marcado de células cultivadas in vitro de la invención (cosechadas en el punto de tiempo s5) con indio para el estudio de orientación in vivo en ratones NOD-SCID.

10

Figura 26. Resultados de SPECT de ratones NOD-SCID completos trasplantados con células marcadas.

Figura 27. Biodistribución de células NK marcadas cultivadas in vitro.

15

Ejemplos

Materiales y métodos

Ejemplo 1

20

Estirpes celulares

Se cultivó la estirpe celular K562 en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU.) que contenía 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin y suero de ternera fetal al 10 % (FCS; Integro, Zaandam, Países Bajos).

25

Aislamiento de células madre y progenitoras CD34+

Se han obtenido unidades de UCB del nacimiento después de un parto normal a término después del consentimiento informado por escrito con respecto al uso científico del banco de sangre del cordón umbilical del Radboud University Nijmegen Medical Center (RUNMC, Nijmegen, Países Bajos). Las muestras de UCB se almacenaron a temperatura ambiente y se procesaron dentro de las 24 h posteriores a la recolección. Antes del almacenamiento, el contenido de glóbulos rojos se ha reducido mediante la separación EloHAES® estándar y las células mononucleares se han lavado, criopreservado y almacenado en nitrógeno líquido [28]. Las unidades de UCB almacenadas se descongelaron a 37 °C y se resuspendieron en tampón de descongelación que consistía en tampón CliniMACS PBS/EDTA (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), HSA al 5 % (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, EE.UU.), MgCl₂ 3.5 mM (Departamento de farmacia, RUNMC, Nijmegen, Países Bajos) y 100 U/ml de Pulmozyme (Roche, Almere, Países Bajos). Las células de UCB descongeladas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se centrifugaron. Después de dos pasos de lavado, las células de UCB descongeladas se resuspendieron en 8 ml de tampón de lavado que consistía en tampón CliniMACS PBS/EDTA, HSA al 0.5 %, MgCl₂ 3.5 mM y Pulmozyme 100 U/ml y se marcaron durante 30 minutos a TA con 0.75 ml de reactivo CliniMACS CD34 (Miltenyi Biotec) y 1 ml de Nanogam (banco de sangre Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos). Después de incubación, la muestra de UCB marcada con CD34 se lavó y se resuspendió en 100 ml de tampón de lavado. El separador de células CliniMACS automatizado estaba equipado con un conjunto de tubos CliniMACS desechables cerrados tipo 161-01 (Miltenyi Biotec). La selección de células CD34⁺ se realizó utilizando un programa automatizado y después del procedimiento de enriquecimiento, se recolectó la fracción de células CD34⁺ y se analizaron el número de células y la pureza mediante citometría de flujo. Finalmente, las células de UCB CD34⁺ obtenidas se utilizaron directamente para el bioproceso de generación de células NK.

30

35

40

45

Expansión y diferenciación ex vivo de células progenitoras positivas para CD34. Se transfirieron células de UCB CD34⁺ a bolsas Vuelife™ 290AC o 750AC (Cellgenix, Freiburg, Alemania) y se expandieron y diferenciaron de acuerdo con el método III como se describió anteriormente con algunas modificaciones menores [17]. En resumen, para los días 0-9 se utilizó Medio de Expansión I. El Medio de Crecimiento Basal Glycostem (GBGM®) para sangre de cordón umbilical (CB) (Clear Cell Technologies, Beernem, Bélgica) se complementó con suero humano al 10 % (HS; Sanquin Bloodbank, Nijmegen, Países Bajos) y se agregó un cóctel de citocinas de dosis alta que consistía en de 25 ng/ml de SCF, 25 ng/ml de Flt3L, 25 ng/ml de TPO y 25 ng/ml de IL-7 (todos CellGenix, Freiburg, Alemania) y un cóctel de citocinas de dosis baja que consiste de 10 pg/ml de GM-CSF (Neupogen) (Amgen, Breda, Países Bajos), 250 pg/ml de G-CSF y 50 pg/ml de IL-6 (ambos de CellGenix, Freiburg, Alemania). Desde el día 10-14 se utilizó medio de Expansión II y se reemplazó TPO por 20 ng/ml de IL-15 (CellGenix, Freiburg, Alemania). Durante los primeros 14 días de cultivo, se agregó heparina de bajo peso molecular (LMWH) (Clivarin®; Abbott, Wiesbaden, Alemania) al medio de expansión en una concentración final de 25 µg/ml. Los cultivos celulares se renovaron con medio nuevo cada 2 - 3 días y se ajustaron a una densidad celular de 1 – 2 x 10⁶/ml. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. Los cultivos expandidos en bolsas Vuelife™ se mantuvieron en bolsas Vuelife™ o se transfirieron a un biorreactor alrededor del día 14 cuando se alcanzó un volumen suficiente de 150 ml. Hemos utilizado tanto el sistema WAVE Bioreactor™ de un solo uso 2/10 (GE Health, Uppsala, Suecia) como el sistema BIOSTAT® CultiBag RM (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Alemania). Los cultivos del biorreactor se iniciaron con 1 x 10⁶ células/ml en 250 ml. Desde el día 14 en adelante, las células de UCB CD34⁺ expandidas se diferenciaron y expandieron adicionalmente utilizando medio de diferenciación de

60

65

células NK. Este medio consistió en Medio de Crecimiento Basal Glycostem (GBGM®) para sangre del cordón umbilical (CB) como se utiliza para el paso de expansión CD34 complementado con HS al 10 %, el cóctel de citocinas de dosis baja (como se mencionó anteriormente) y un nuevo cóctel de citocinas de dosis alta que consiste en 20 ng/ml de IL-7, 20 ng/ml de SCF, 1000 U/ml de IL-2 (Proleukin®; Chiron, München, Alemania) y 20 ng/ml de IL-15 (CellGenix). La densidad celular se verificó dos veces a la semana y se ajustó a $1.5 \text{ a } 3.0 \times 10^6$ células/ml mediante la adición de medio de diferenciación de células GBGM® NK. Las condiciones del biorreactor fueron las siguientes: temperatura 37 °C, CO₂ al 5 %, flujo de aire 0.1 – 0.2 l/min, velocidad de oscilación 10/min, ángulo de oscilación de 7 °.

Citometría de flujo

El número de células y la expresión de marcadores de superficie celular se determinaron mediante citometría de flujo. Para la tinción inmunofenotípica, las células se incubaron con la concentración apropiada de anticuerpos durante 30 min a 4 °C. Después del lavado, las células se resuspendieron en Diluyente Coulter® Isoton® II (Beckman Coulter) y se analizaron utilizando el citómetro de flujo Coulter FC500 (Beckman Coulter). Para determinar el contenido de células CD34⁺ en la UCB y la pureza de las células seleccionadas CD34 se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45-FITC (J33) y CD34-PE (581) (ambos de Beckman Coulter, Woerden, Países Bajos). La población de células CD34⁺ vivas se determinó mediante la exclusión de células positivas a 7AAD (Sigma, Bornem, Bélgica). El análisis se realizó de acuerdo con el protocolo ISHAGE más actual. Para determinar la pureza del producto final después del lavado se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3-FITC (UCHT1) (Beckman Coulter, Woerden, Países Bajos); CD56-PE (NCAM16-2) (BD Biosciences Pharmingen, Breda, Países Bajos), anti-CD45-ECD (J33) (Beckman Coulter, Woerden, Países Bajos).

También se utilizó un análisis colorimétrico de diez para determinar el fenotipo de las células cultivadas. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales en la concentración adecuada: CD16-FITC (NKP15), CD336(NKp44)-PE (Z231), CD3-ECD (UCHT1), CD337(NKp30)-PC5.5 (Z25), CD335(NKp46)-PE-Cy7 (BAB281), CD314(NKG2D)-APC (ON72), CD244(2B4)-APC-alexa700 (C1.7.1), CD56-APC-Alexa750 (N901), CD161-PB (191B8), CD45-PO (J.33) (todo proporcionado por Beckman Coulter, Marsella, Francia). El análisis de adquisición se realizó sobre el citómetro de flujo Navios™ y los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software Kaluza™ (todos de Beckman Coulter, Miami, Florida, EE.UU.).

Estudios de citotoxicidad y desgranulación basados en citometría de flujo

Los ensayos de citotoxicidad basados en citometría de flujo se realizaron como se describió previamente [17, 29]. Brevemente, después de la incubación durante 4 horas o durante la noche a 37 °C, se recolectaron 50 µl de sobrenadante y se almacenaron a -20 °C para uso posterior para medir la producción de citocinas. Se cosecharon las células del volumen restante y se cuantificó el número de células diana viables mediante citometría de flujo. La supervivencia de las células diana se calculó como sigue: % de supervivencia = {[no. absoluto. células diana CFSE⁺ viables cocultivadas con células NK]/[no. absoluto. células diana CFSE⁺ viables cultivadas en medio]} * 100 %. El porcentaje de lisis específica se calculó como sigue: % de lisis = {100 - [% de supervivencia]}. La desgranulación de las células NK durante el cocultivo se midió mediante la expresión en la superficie celular de CD107a [30]. Después de 18 horas de incubación a 37 °C, se determinó el porcentaje de células CD107a⁺ mediante citometría de flujo.

Preparación del producto final de células NK

Al final del cultivo, se cosecharon las células NK y se determinó el número y la viabilidad de las células CD56⁺ mediante citometría de flujo y contador ACT (Beckman Coulter). El producto de células NK DE UCB se transfirió a bolsas de transferencia de 600 ml (Baxter, Deerfield, EE.UU.), se centrifugó a 200 g durante 15 min sin interrupción y se recolectó el sobrenadante para analizar la contaminación bacteriana, fúngica y por micoplasma. Las células NK se resuspendieron y se lavaron dos veces con 500 ml de tampón CliniMACS PBS/EDTA suplementado con HSA al 0.5 % (Sanquin Blood Bank, Amsterdam, Países Bajos). Después del lavado, las células NK se resuspendieron en 120 – 360 ml de tampón de infusión (NaCl al 0.9 % + HSA al 5 %). Por último, se determinó el número viable de células NK CD56⁺CD3⁻ en el producto final mediante citometría de flujo y se midió la concentración de IL-2, IL-7, IL-15 y SCF residuales mediante ELISA (R&D Systems, Abingdon, Oxon, UK).

Cariotipo del producto de células NK

Se realizó un análisis citogenético sobre los productos finales de células NK de acuerdo con métodos estándar. En total, se colocaron bandas G en 20 metafases utilizando tripsina y Giemsa (GTG) y se examinaron por caso. Los cariotipos se describieron de acuerdo con ISCN 2009 [31].

Prueba de esterilidad del producto de células NK

Antes y después del lavado en bolsas, se tomaron muestras y se procesaron para verificar si había contaminaciones bacterianas y fúngicas. Estas muestras se transfirieron a matraces Bactec (BD). En el presente documento utilizamos Bactec Ped plus para muestras entre 1 – 3 ml. El crecimiento bacteriano hasta el día 6 debe notificarse como positivo. La prueba fue realizada por el Departamento de Microbiología, RUNMC, Nijmegen, Países Bajos.

Prueba de micoplasma

La detección de Mycoplasma se realizó sobre productos finales utilizando el kit de detección de Micoplasma MycoAlert® (Lonza, Rockland, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las señales se midieron con Fluostar Optima (BMG Labtech, IJsselstein, Países Bajos).

Prueba de endotoxinas

El nivel de endotoxinas en los productos finales se determinó utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus cromogénico (LAL) (Charles River Endosafe, Charleston, SC, EE.UU.) Siguiendo las directrices del fabricante del Departamento de Farmacia, RUNMC, Nijmegen, Países Bajos. Se estableció un nivel de < 0.25 EU/ml como límite de endotoxina negativo.

Detección de citocinas

Los niveles de citocinas en los productos finales se determinaron utilizando ELISA. Brevemente, se recubrieron placas Maxisorp de 96 pozos (NUNC) durante la noche con 1 µg/ml de anticuerpo de recubrimiento monoclonal para IL-2, IL-7, IL-15 y SCF (todos de R&D systems, Abingdon, Oxon, UK). Para la detección de la muestra, se agregaron anticuerpos biotinilados para IL-2 (0.2 µg/ml de Ac policlonal), IL-7 (0.2 µg/ml de Ab policlonal), IL-15 (0.25 µg/ml de Ab monoclonal) y SCF (0.05 µg/ml de Ab policlonal), respectivamente. La destrucción se midió con el lector de placas TiterTek Multiscan MCC/340 (Titertek, Huntsville, AL). Las concentraciones de las medidas por triplicado se determinaron utilizando una curva estándar que variaba entre 1 y 2000 pg/ml de la citocina específica.

Estadísticas

Los resultados de diferentes experimentos se describen como media ± desviación estándar de la media (DE), rango y mediana. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Ejemplo 2

Recolección de tejidos y aislamiento de células mononucleares

Se obtuvieron muestras de médula ósea (BM), sangre periférica (PB), bazo (SPL) y sangre de cordón (CB) en el Radboud University Nijmegen Medical Centre (RUNMC; Nijmegen, Países Bajos). Se obtuvieron muestras de BM y PB de donantes de trasplante de células madre sanos antes del tratamiento de movilización con G-CSF. Las muestras de SPL se obtuvieron de donantes de trasplante de hígado o riñón fallecidos. Las muestras de CB, obtenidas en el nacimiento después de un parto a término normal, fueron proporcionadas por el banco de sangre de cordón umbilical de RUNMC. En el Erasmus Medical Centre (Rotterdam, Países Bajos), se obtuvieron muestras de ganglios linfáticos de drenaje hepático (LiLN) de donantes de trasplante de hígado fallecidos y muestras de ganglios linfáticos inguinales (inLN) de receptores de trasplantes de riñón (no tratadas con fármacos inmunosupresores antes de la extirpación de ganglios linfáticos). Después de la recolección, cada muestra de tejido se almacenó a temperatura ambiente y se procesó en 24 h. Las muestras de nódulos linfáticos y bazo se forzaron primero a través de filtros de red de 74 µm (Costar, Corning International, NY y EE.UU.) para obtener suspensiones de células individuales. Las células mononucleares (MNC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep; Nycomed Pharma, Roskilde, Dinamarca) y se criopreservaron en nitrógeno líquido hasta uso adicional. Se recolectaron al menos 5 muestras independientes de cada tejido. Este estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones establecidas por los Comités de Ética Médica para la investigación en humanos de la RUNMC y el Erasmus MC, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito con respecto al uso científico de todos los participantes del estudio o sus representantes.

Citometría de flujo multicolor

Para un análisis de citometría de flujo (FCM) detallado de las diferentes etapas de desarrollo y fenotipo de las células NK, diseñamos tres paneles FCM de 10 colores diferentes utilizando mAbs conjugados amablemente proporcionados por Beckman Coulter (Marsella, Francia) con la excepción de CD16- FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca) y CD159c-PE (R&D Systems, Minneapolis, CA, EE.UU.). La descripción detallada de los paneles se muestra en la Tabla 5. Para el FCM de 10 colores, se equilibraron las combinaciones de mAb-fluorocromo para evitar interacciones de anticuerpos, impedimentos estéricos y para detectar también poblaciones de expresión tenue. Antes de los análisis multicolores, todos los conjugados se valoraron y se probaron individualmente para determinar la sensibilidad, resolución y compensación de la superposición espectral. Se utilizaron controles de isotipo para definir la configuración de los marcadores. Las fracciones de MNC descongeladas de tejidos humanos recolectadas se evaluaron sobre un citómetro de flujo de 10 colores Navios™ y se analizaron utilizando Kaluza Software® 1.0 (Beckman coulter). Para definir las etapas de desarrollo de las células NK, las muestras se agruparon en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales (que pueden expresar CD34 pero son CD45 negativas¹⁵) del análisis. Para analizar el repertorio de receptores de células NK (Tabla 5) de células NK comprometidas que expresan CD56, las células se agruparon adicionalmente sobre células CD56⁺ dentro de la población CD45⁺CD3⁻. Las poblaciones de células > 0.1 %

de la población CD45⁺CD3⁻ con un umbral de más de 50 células se consideraron fiables. Se consideró que las poblaciones celulares estaban presentes en un tejido específico cuando al menos 3 de cada 5 muestras mostraron resultados confiables. Las poblaciones de células que no cumplían con estos criterios se excluyeron del análisis (estadístico) adicional. En la Tabla 8 se muestra una descripción general de los tamaños de muestra analizados.

Análisis estadístico

Para comparar los porcentajes de células positivas para marcadores individuales entre los diferentes tejidos, se utilizó un modelo de regresión logística de efecto aleatorio que tuvo en cuenta la diversidad biológica entre muestras de cada tejido y el hecho de que se tomaron varias muestras de cada tipo de tejido. La fluorescencia media (MFI) de marcadores específicos entre los diferentes tejidos se analizó utilizando análisis ANOVA con pruebas posteriores de Tukey. Se consideraron significativos los valores de $p < .05$.

Resultados

Ejemplo 1

Enriquecimiento eficiente de células CD34⁺ a partir de sangre de cordón umbilical criopreservada

El objetivo general de este estudio fue desarrollar un sistema de cultivo ex vivo cerrado para la expansión y diferenciación de células de UCB CD34⁺ en células NK seguido de la generación subsiguiente a escala logarítmica de células NK CD56⁺CD3⁻. Como el inicio de nuestro proceso de cultivo requiere células progenitoras hematopoyéticas, optimizamos el procedimiento de enriquecimiento de CD34⁺ a partir de unidades de UCB criopreservadas utilizando el sistema CliniMACS. Antes del almacenamiento en nitrógeno líquido, las unidades de UCB recolectadas utilizadas para este estudio ($n = 16$) se han reducido para los glóbulos rojos y el volumen utilizando la separación EloHAES®. El volumen medio de 111 ± 34 ml (rango 72 - 175 ml) y el recuento de WBC medio de $1,503 \pm 455 \times 10^6$ células (rango 772 - $2,380 \times 10^6$) se redujo a 25 ml con un recuento de WBC de $1,085 \pm 357 \times 10^6$ células (rango 600 - $1,721 \times 10^6$) que contiene $3.78 \pm 1.95 \times 10^6$ células CD34⁺ (rango $1.73 - 8.72 \times 10^6$) (Tabla 1). Las unidades de UCB criopreservadas se descongelaron y se prepararon para la selección de CD34⁺ utilizando tampón CliniMACS PBS/EDTA que contenía ADNasa de grado clínico. La recuperación de células CD34⁺ después de la descongelación fue del $76 \% \pm 16 \%$, lo que dio como resultado un rendimiento total de $2.79 \pm 1.59 \times 10^6$ células CD34⁺ (rango $1.43 - 8.12 \times 10^6$) para las unidades de UCB seleccionadas (Tabla 1). A continuación, se enriquecieron las células CD34⁺ utilizando el separador de células CliniMACS, lo que dio como resultado una recuperación media del $71 \% \pm 11 \%$ (rango 50 - 91 %) (Tabla 2). La pureza del producto CD34⁺ enriquecido fue del $67 \% \pm 14 \%$ (rango del 44 al 92 %). La recuperación total después de la descongelación y el enriquecimiento de CD34 fue del $53 \% \pm 15 \%$ (rango 33 - 82 %) con un número medio de células CD34⁺ de $1.96 \times 10^6 \pm 1.27 \times 10^6$ (rango $0.89 - 6.34 \times 10^6$) (Tabla 2). Estos resultados demuestran que las células CD34⁺ se pueden enriquecer de manera eficiente a partir de unidades de UCB criopreservadas y de volumen reducido, lo que proporciona un producto inicial de grado clínico para el proceso de cultivo de expansión y generación de células NK.

Las células de UCB CD34⁺ enriquecidas se pueden expandir de manera eficiente utilizando bolsas de cultivo celular estáticas

Previamente, experimentos a escala de investigación en placas de 6 pozos mostraron que las células CD34⁺, enriquecidas a partir de unidades de UCB congeladas, pueden expandirse y diferenciarse eficazmente en el linaje de células NK utilizando nuestro proceso de cultivo ex vivo de dos pasos [17]. Para traducir este protocolo en un sistema de cultivo cerrado, hemos probado la expansión ex vivo de células de UCB CD34⁺ durante dos semanas en bolsas de cultivo estáticas Vuelife™ AC utilizando medio I de expansión de células NK (día 0 - 9) y medio II (día 9 - 14). La expansión celular total media para todos los experimentos ($n = 7$) fue 39 ± 14 y 160 ± 69 veces después de 1 y 2 semanas de cultivo, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados fueron similares a la tasa de expansión obtenida después de 2 semanas en placas de 6 pozos 192 ± 82 ($n = 7$), e indican que las células CD34⁺ seleccionadas de las unidades de UCB criopreservadas pueden expandirse eficientemente durante 2 semanas de cultivo en bolsas desechables.

Expansión superior de productos de células NK altamente purificados utilizando un biorreactor

A continuación, investigamos si las células de UCB CD34⁺ expandidas en la bolsa podrían diferenciarse y expandirse adicionalmente en células NK CD56⁺CD3⁻. Primero, continuamos el proceso de diferenciación en las mismas bolsas estáticas que se utilizaron para la expansión de células CD34⁺. Por lo tanto, agregamos medio de diferenciación de células NK que contiene SCF, IL-7, IL-15 e IL-2 a los cultivos en bolsa desde el día 14 en adelante. La expansión celular total media después de 6 semanas de cultivo en las bolsas estáticas fue ~1300 veces (rango 759-1,770; $n = 3$), generando productos de células NK de $0.9 - 1.9 \times 10^9$ células NK CD56⁺CD3⁻ (Figura 1A y Tabla 3). Sin embargo, la generación ex vivo de células NK CD56⁺CD3⁻ en cultivos en bolsa produjo una pureza del $71 \% \pm 9 \%$ (Figura 1B y Tabla 3). Debido a que la diferenciación de los productos de células NK fue subóptima en los cultivos en bolsa, a continuación probamos si la diferenciación de los cultivos CD34⁺ expandidos en bolsa en el linaje de células NK podría mejorarse utilizando un biorreactor automático. Por lo tanto, en un siguiente conjunto de experimentos, se transfirieron células de UCB CD34⁺ expandidas el día 14 de cultivo a un sistema de biorreactor con un volumen mínimo de 250 ml para iniciar el proceso de diferenciación de células NK. Aunque la expansión celular total media a las 6 semanas de cultivo en los cultivos del

biorreactor, que fue ~2,100 veces (rango 1,435 - 2,657; n = 4; Figura 3C y Tabla 3), no fue significativamente mayor en comparación con las células NK expandidas en bolsa, la tasa de diferenciación y expansión de las células NK fue significativamente mejor en los biorreactores (Figura 1D y E). En las semanas 5 y 6, la pureza de las células NK y las veces de expansión de las células NK en los cultivos del biorreactor fue significativamente mayor en comparación con los cultivos en bolsa estática (Figura 1E y Tabla 3). Es importante destacar que la generación ex vivo de células NK CD56⁺CD3⁻ en biorreactores produjo productos de células NK altamente purificados (92 % ± 2 %; n = 4) con un número total de células NK de 1.6 – 3.7 x 10⁹ células NK CD56⁺CD3⁻ (Tabla 3). Estos datos demuestran que la combinación de sistemas de biorreactores da como resultado una producción superior de productos de células NK puras para ensayos de inmunoterapia adoptiva.

El efecto del lavado sobre la recuperación, fenotipo y función de las células NK expandidas

Después de mostrar que las células de UCB CD34⁺ podrían enriquecerse eficazmente a partir de sangre del cordón umbilical congelada y cultivarse con éxito en un producto de células NK puro utilizando un proceso de cultivo celular cerrado, optimizamos el procesamiento en dirección descendente utilizando un paso de lavado de sistema cerrado. Dos pasos de lavado redujeron el volumen total de cultivo celular de 1 litro a 150 ml antes de la infusión. El factor de dilución calculado del procedimiento de lavado utilizando bolsas fue entre 629 - 1008 veces (n = 3). El lavado del producto de células NK después de 6 semanas de cultivo utilizando un protocolo de centrifugación en bolsa produjo una recuperación del 82 % ± 5 % de células NK CD56⁺CD3⁻7AAD⁻ (n = 3). Los ensayos de citotoxicidad y desgranulación basados en CD107a que utilizan K562 como células diana mostraron que la actividad citolítica del producto de células NK antes y después del lavado no se vio afectada (Figura 2A y B). Más aún, el lavado de las células NK expandidas no influyó negativamente en la alta expresión de los receptores NKG2D (CD314), NKR-P1 (CD161), 2B4 (CD244), NKp46 (CD335) y NKp44 (CD336) (Figura 3). Estos resultados indican que las células NK derivadas de células de UCB-CD34⁺ (UCB-NK) para inmunoterapia se podrían lavar eficazmente utilizando un proceso cerrado sin pérdida de las características funcionales y fenotípicas de las células NK expandidas con biorreactor.

Los productos de terapia celular UCB-NK cumplen con pruebas específicas de liberación, bioseguridad y estabilidad

Durante las series de validación de nuestro cultivo cerrado y proceso de lavado, monitoreamos la pureza, el número de células, la viabilidad, el fenotipo, la actividad y la recuperación de los productos de las células NK DE UCB. Las cuatro series de validación en el biorreactor dieron como resultado un producto celular final que contenía > 90 % de células NK CD56⁺CD3⁻7AAD⁻ viables. No se pudieron detectar las células T CD3⁺. Además, se realizaron pruebas exhaustivas para garantizar que nuestro proceso estuviera libre de contaminación bacteriana, con micoplasma por hongos y endotoxinas (Tabla 4). Estas pruebas se realizaron al final de la producción de células NK y después del procedimiento de lavado y fueron negativas o por debajo de las especificaciones en todas las series de validación. También probamos la presencia de SCF residual, IL-7, IL-15 e IL-2, que estaban presentes en el medio de diferenciación de células NK, mediante ELISA. Después de lavar los productos de células NK, las concentraciones de citocinas parecían estar por debajo del rango especificado de < 25 pg/ml de SCF, IL-7 e IL-15 y < 1 U/ml de IL-2. El análisis citogenético mostró que los productos de las células NK mostraban un cariotipo normal.

Dado que en nuestro ensayo clínico de fase I pretendemos infundir productos de células NK recién preparados sin criopreservación, determinamos la estabilidad de las células NK para establecer un marco de tiempo para que finalicen las pruebas de liberación del producto. Por lo tanto, almacenamos el producto de células NK DE UCB en tampón de infusión (es decir, NaCl al 0.9 % más HSA al 5 %) a 4 °C o TA, y probamos la pureza y viabilidad a las 24, 48 y 72 horas. No pudimos detectar una disminución en la pureza del producto de células NK con el tiempo y tampoco detectamos diferencias entre el almacenamiento a 4 °C o TA (Figura 4A). Se observó una pequeña disminución en la viabilidad de las células NK CD56⁺7AAD⁻ en el día 2 o 3 después del almacenamiento tanto a 4 °C como a TA (Figura 4B). Nuestra especificación para la infusión de células NK requiere un mínimo del 70 % de viabilidad y, por lo tanto, hemos establecido nuestro tiempo de caducidad para las células de UCB-NK en 24 horas después de la formulación final.

En conjunto, estos resultados demuestran la viabilidad para generar productos de terapia celular NK DE UCB altamente purificados, seguros y activos utilizando un cultivo celular completamente cerrado y un proceso de fabricación en dirección descendente para evaluar en un ensayo de escalada de dosis de fase I en pacientes de mal pronóstico con AML.

Ejemplo 2

Para identificar las etapas de desarrollo de las células NK humanas dentro de los diferentes tejidos y analizar la distribución de diferentes subconjuntos de células NK y su repertorio de receptores de células NK, diseñamos tres paneles de citometría de flujo de 10 colores (FCM) (Tabla 5). Como BM se considera el origen del desarrollo de células NK [44-47], primero analizamos BM para la presencia de etapas de desarrollo de células NK.

Identificación de siete etapas de desarrollo de células NK en BM

Las distintas etapas de desarrollo de las células NK se pueden caracterizar a través del análisis de expresión de antígenos CD34, CD117, CD94 y CD56 [50]. En base a eso, agrupamos nuestras muestras en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Posteriormente, los

subconjuntos de células se dividieron primero en base a la expresión de CD34 y CD117. A partir de ahí, en un segundo paso, se analizó cada subconjunto para determinar la expresión de CD56 y CD94. Utilizando esta estrategia de agrupamiento, pudimos identificar siete etapas distintivas de desarrollo en BM (Figura 9). Sobre esta base y en concierto con las etapas de desarrollo de las células NK identificadas en los tejidos linfoides secundarios (SLT) [50], ahora proponemos el siguiente modelo de desarrollo de las NK, a partir de las células CD34⁺CD117⁺CD56⁺CD94⁻ (etapa 1), seguido de la ganancia de CD117 (etapa 2; CD34⁺CD117⁺CD56⁺CD94⁻). Posteriormente, la expresión de CD34 se pierde en la etapa 3a (CD34⁻CD117⁺CD56⁺CD94⁻) seguida por el compromiso del linaje de células NK a través de la adquisición de CD56 en la etapa 3b (CD34⁻CD117⁺CD56⁺CD94⁻). Después del compromiso del linaje de células NK, las células obtienen la expresión de CD94 y se convierten en células NK CD56^{brillante} inmaduras (etapa 4; CD34⁻CD117⁺CD56⁺CD94⁺). A través de la pérdida de expresión de CD 117, las células CD56^{tenue} comienzan a desarrollarse (etapa 5a; CD34⁻CD117⁻CD56⁺CD94⁺), seguidas de la pérdida de expresión de CD94 en la etapa 5b (CD34⁻CD117⁻CD56⁺CD94⁻). La adquisición/pérdida de los diferentes antígenos y la presencia de células CD56^{brillante/tenue} dentro de cada etapa de la BM se resumen en la Tabla 6.

15 Expresión de CD244 temprana y sostenida durante el desarrollo de células NK in vivo

Al utilizar FCM de 10 colores, pudimos especificar adicionalmente las etapas de desarrollo de células NK identificadas en la BM al analizar la expresión de antígeno adicional. Para ello, analizamos la expresión en la superficie celular de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de cada etapa definida (Figura 10). El CD 133 se conoce como un antígeno de células madre que puede proporcionar una alternativa al CD34 para la selección y expansión de células hematopoyéticas para trasplante [56]. Junto con CD34, este antígeno solo se expresó en las etapas 1 y 2. CD33 se ha descrito como un antígeno para el desarrollo temprano de células NK¹⁷ y se expresó en las etapas 2 y 3a. Se sugiere que el receptor CD244 es un correceptor en la activación de células NK maduras [58]. Curiosamente, encontramos que CD244 ya se expresó sobre células de etapa 2 CD34⁺CD117⁺ en BM. Durante las etapas 3a y 3b, la expresión de CD244 permaneció presente y la cantidad de células CD244⁺ aumentó a más del 98 % en las etapas 4 a 5b. Hasta ahora, la expresión de CD244 sólo se mostró presente en las primeras etapas de la diferenciación de las células NK durante la maduración de las células NK humanas inducidas in vitro [59]. El receptor NKG2A inhibidor, que se ha mostrado que se expresa temprano durante la maduración de las células NK [53], se detectó a partir de la etapa 4 justo después del compromiso de las células NK (etapa 3b) hasta la etapa 5b. En resumen, dado que los diferentes antígenos evaluados mostraron diferentes perfiles de expresión durante el desarrollo de las células NK, pudimos definir mejor las etapas de desarrollo de las células NK (Tabla 7), en las que la expresión de CD133 es específica para las etapas 1 y 2, seguida de la expresión de CD33 en etapas 2 y 3. A partir de la etapa 2, CD244 se expresa continuamente y NKG2A se encuentra en las etapas 4 a 5b en parte de las células.

35 El desarrollo de células NK comienza en BM, seguido por una maduración adicional en LN, SPL y PB

Para evaluar si las etapas de desarrollo de NK se pueden encontrar en otros tejidos humanos además de BM, analizamos además muestras de sangre de cordón (CB), sangre periférica (PB), LN inguinal (inLN), LN hepático (liLN) y bazo. (SPL) (Figura 11). Los resultados mostraron una distribución diferencial de las etapas de desarrollo de las células NK dentro de los diferentes tejidos. Las etapas de desarrollo de las células NK en BM consistieron principalmente en células en etapa 5a y 5b. Además, las etapas 1 y 2 solo se detectaron en BM, lo que confirma que BM es el origen del desarrollo de las células NK. En CB, se encontraron células en la etapa 2, pero no en PB, lo que muestra que la sangre de origen fetal contiene más células progenitoras NK tempranas en comparación con la sangre adulta. Sin embargo, las principales etapas de desarrollo de las células NK en CB fueron la etapa 5a seguida de la etapa 5b. En PB, las etapas de desarrollo de las células NK consistieron principalmente en células en etapa 5a y 5b. A diferencia de otros tejidos, la distribución de las etapas de desarrollo de las células NK en LN contenía principalmente células en etapa 3a y etapa 3b, y mostraba frecuencias más bajas, pero similares, de las etapas 4 a 5b. Por el contrario, las etapas de desarrollo de las células NK en liLN y SPL consistieron principalmente en células de las etapas 4, 5a y 5b. Tras la presencia de las diferentes etapas de desarrollo de NK dentro de los diferentes tejidos analizados, estos resultados sugieren que las células progenitoras NK tempranas migran desde BM hasta SLT, después de lo cual las células pre-NK (etapa 3a) pueden desarrollarse más en LN que conducen al compromiso de las células NK (etapa 3b), seguida de una mayor maduración en el tejido esplénico y la liberación de células NK maduras en el torrente sanguíneo. La presencia de diferentes etapas dentro de un tejido, por ejemplo etapas distintas de las etapas 1 y 2 en BM o etapa 3 en LN, indica que la diferenciación in situ de las células restantes también ocurre además del tráfico de etapas de desarrollo hacia otros tejidos.

55 Expresión sostenida de CD33 en liLN durante el desarrollo de células NK in vivo

Para evaluar las posibles diferencias de las etapas de desarrollo de las células NK dentro de los tejidos humanos, analizamos adicionalmente la expresión de CD133, CD33, CD244 y NKG2A dentro de las etapas presentes en los tejidos humanos (Figura 12). Entre BM y CB, no hubo diferencias significativas en la expresión de CD133, CD33 y CD244 dentro de la etapa 2. La tendencia posterior de adquisición de CD244 fue la misma para cada tejido y todos los tejidos mostraron más del 98 % de células CD244⁺ en las etapas 4 y 5a/B. Se observaron diferencias significativas en el perfil de expresión del antígeno CD33 temprano dentro de los diferentes tejidos humanos. Como previamente caracterizamos la expresión de CD33 es específica para las células en la etapa 2 y 3a en BM (Tabla 7), la expresión de CD33 se prolongó en CB, PB y SPL hasta la etapa 3b. Adicionalmente, en liLN, la expresión de CD33 se mantuvo incluso después del compromiso de

las células NK hasta la etapa 4. La expresión prolongada de CD33 en algunas etapas y tejidos distintos sugiere subconjuntos de desarrollo de células NK específicos de tejido in situ.

La expresión de NKG2A revela un perfil de maduración de células NK alterado en tejidos linfoides

Habiendo descrito subconjuntos de células NK específicas de tejido, mediante el perfil de expresión de CD33, analizamos adicionalmente si también existen diferencias específicas de tejido en el patrón de maduración de células NK. Como el nivel de expresión de NKG2A puede ser representativo del nivel de maduración de las células NK [60,61], analizamos el perfil de expresión de NKG2A sobre las células NK “comprometidas”. Además de las diferencias significativas en el perfil de expresión de CD33, el perfil de expresión de NKG2A también mostró una distinción entre los diferentes tejidos humanos. En la etapa 4, todos los tejidos contenían más del 95 % de células NKG2A⁺. Después de las etapas de desarrollo de las células NK, BM, CB y PB mostraron una disminución en el porcentaje de células NKG2A⁺ hasta aproximadamente un 25 % de células NKG2A⁺ en la etapa 5b, mientras que en ilLN y liLN una mediana de 75 - 80 % de NKG2A⁺ permaneció y SPL mantuvo una mediana de 50 % de células NKG2A⁺. La disminución más fuerte de las células que expresan NKG2A en BM, CB y PB en comparación con otros tejidos también se reflejó en la intensidad de fluorescencia media de la expresión de NKG2A después de la etapa 4 a 5b (Figura 16).

En general, estos datos sugieren que las células NK comprometidas en LN y SPL tienen un fenotipo más inmaduro en comparación con las células presentes en BM, PB y CB. Con el fin de definir mejor la maduración de las células NK, ampliamos nuestros análisis con respecto a las células NK “comprometidas”. Por lo tanto, posteriormente analizamos la expresión de receptores de células NK adicionales para evaluar adicionalmente el estado de madurez de las células NK comprometidas dentro de los diferentes tejidos humanos.

Las diferencias en el repertorio de receptores de células NK sugieren un desarrollo distinto de células NK in situ dentro de LN y CB

Las células NK fenotípicamente comprometidas (CD45⁺CD3⁺CD56⁺) se pueden dividir generalmente en dos subconjuntos distinguibles: el subconjunto CD56^{brillante}CD16^{+/-} y CD56^{tenue}CD16⁺ [62]. Nuestros datos confirmaron la heterogeneidad de los subconjuntos CD56^{brillante}CD16^{+/-} y CD56^{tenue}CD16⁺ dentro de BM, CB, PB y LN, mostrando los balances de CD56^{brillante}>>CD56^{tenue} en LN y CD56^{brillante}<<CD56^{tenue} en BM, CB y PB (Figura 17). Adicionalmente, identificamos un balance de CD56^{brillante}≈CD56^{tenue} en SPL.

Para evaluar aún más la madurez de los subconjuntos de células NK comprometidas, analizamos la expresión de varios receptores de células NK inhibidores y estimulantes al utilizar paneles FCM 2 y 3 (Tabla 5). Para el análisis de la población de células NK comprometidas, agrupamos las células CD56⁺ dentro de la población CD45⁺CD3⁺ y posteriormente analizamos la expresión de receptores de tipo inmunoglobulina de destrucción (KIR), NKG2A/C, NKG2D, CD244 y receptores de citotoxicidad natural (NCR; NKp30, NKp44, NKp46). Estos receptores activan y modulan la función efectora de las células NK maduras a través de un equilibrio entre las señales inhibidoras (KIR, NKG2A) y estimulantes (NKG2C, NKG2D, CD244, NCR) [42,63].

Primero analizamos el repertorio de receptores de células NK del subconjunto CD56^{brillante}CD16^{+/-} dentro de la población de células NK comprometidas de cada tejido (Figura 13). Los resultados mostraron que no hubo diferencia en la cantidad de células KIR⁺ entre los tejidos. No obstante, la fluorescencia media de KIR2DL/S2/3 y KIR3DL1 fue menor tanto en LN como en SPL, lo que sugiere un fenotipo más inmaduro de células CD56^{brillante} en comparación con BM, CB y PB. Sorprendentemente, la proporción de células NKG2A⁺ fue significativamente menor en liLN en comparación con otros tejidos. Esto se puede explicar por un desarrollo diferente de células NK in situ, como sugiere la expresión prolongada de CD33 (Figura 12). Adicionalmente, la cantidad de células positivas para receptores activadores, con la excepción de NKp44, también fue menor en liLN en comparación con otros tejidos. Esto también se reflejó dentro del subconjunto CD56^{tenue}CD16⁺ de liLN, mostrando cantidades más bajas de células NKG2D⁺, CD244⁺ y NKp30⁺ en comparación con otros tejidos (Figura 14). Por lo tanto, estos resultados muestran que el desarrollo de células NK en los ganglios linfáticos puede diferir in situ entre LN en diferentes ubicaciones anatómicas y también en otros tejidos.

El análisis de CB mostró que tanto el subconjunto CD56^{brillante}CD16^{+/-} (Figura 13) como el CD56^{tenue}CD16⁺ (Figura 14) contenían significativamente más células NKG2A⁺ en comparación con otros tejidos. Además, el nivel de expresión de NKG2A (MFI) en el subconjunto CD56^{brillante}CD16^{+/-} también fue significativamente mayor, lo que confirmó los resultados anteriores [64]. NKG2C, que es la contraparte similar a lectina estimulante de NKG2A, también mostró una expresión elevada dentro del subconjunto CD56^{brillante}CD16^{+/-} de células NK comprometidas en CB (Figura 13). Juntos, estos datos sugieren que el microambiente fetal de CB puede proporcionar una prevalencia para la expresión de antígenos de tipo lectina en comparación con otros tejidos humanos.

En general, los datos sobre el repertorio de receptores de células NK dentro de los diferentes subconjuntos de las células NK comprometidas demuestran la heterogeneidad de CD56^{brillante}CD16^{+/-} y CD56^{tenue}CD16⁺ dentro de los diferentes compartimentos y sugiere que el microambiente puede desempeñar una función en el desarrollo diferencial in situ del repertorio de células NK de las células NK comprometidas.

Tablas

Tabla 1 Características de las unidades de UCB después de separación EloHAES y criopreservación

	<u>UCB recolectada</u>		<u>UCB reducida en volumen</u>		<u>UCB descongelada</u>		
	Volumen	NCs	NCs	Células CD34 ⁺	NCs	Células CD34	Recuperación de células CD34 ⁺
	ml	x10 ⁶	x10 ⁶	x10 ⁶	x10 ⁶	x10 ⁶	total %
Donante 1	88	1294	790	3.90	368	2.96	76
Donante 2	151	1857	1312	5.88	469	3.73	63
Donante 3	141	1734	1378	4.96	653	3.23	65
Donante 4	87	1992	1588	8.72	819	8.12	93
Donante 5	119	1821	1106	3.68	583	2.28	62
Donante 6	153	1775	1519	3.17	829	2.15	68
Donante 7	152	1733	978	2.08	440	2.06	99
Donante 8	72	1210	760	2.70	403	2.07	77
Donante 9	78	772	600	3.96	248	1.84	46
Donante 10	97	927	616	1.73	386	1.69	98
Donante 11	81	1207	974	2.82	479	2.52	89
Donante 12	175	2380	1721	6.90	943	3.96	57
Donante 13	95	1430	1008	3.04	558	2.66	87
Donante 14	77	857	680	1.75	273	1.43	82
Donante 15	88	1223	969	2.40	563	2.14	89
Donante 16	130	1829	1364	2.78	821	1.82	66
Media	111	1503	1085	3.78	552	2.79	76
DE	34	455	357	1.95	210	1.59	16
mediana	96	1581	993	3.11	518	2.21	76
mín	72	772	600	1.73	248	1.43	46
máx	175	2380	1721	8.72	943	8.12	99

5 La tabla resume el procesamiento de 16 unidades de UCB utilizadas para el enriquecimiento de CD34⁺ después del proceso de recolección, reducción de volumen y descongelación. Las células nucleadas (NC) se contaron con el contador AcT10 (Beckman coulter). Las células CD34⁺ se enumeraron mediante análisis de citometría de flujo de plataforma única. Los resultados se representan como media, desviación estándar, mediana y volumen mínimo (mín.) y máximo (máx.), número de células o porcentajes, respectivamente. (n.a. = no analizado)

10

Tabla 2 Características de la separación CliniMACS CD34 sobre unidades de UCB descongeladas

Fración positiva CD34+				
	Recuperación después de solo enriquecimiento de CD34	Contenido de CD34 (%)	Células CD34 (x 10⁶)	Recuperación de CD34⁺ después de procesamiento (%)
Donante 1	50	52	1.47	38
Donante 2	53	77	1.99	34
Donante 3	73	70	2.36	48
Donante 4	78	92	6.34	73
Donante 5	76	54	1.74	47
Donante 6	79	65	1.70	54
Donante 7	82	64	1.70	82
Donante 8	69	73	1.42	53
Donante 9	72	88	1.32	33
Donante 10	76	69	0.89	51
Donante 11	91	65	2.29	81
Donante 12	70	59	2.79	40
Donante 13	55	84	1.47	48
Donante 14	76	67	1.09	62
Donante 15	71	44	1.52	63
Donante 16	65	52	1.19	43
Media	71	67	1.96	53
DE	11	14	1.27	15
mediana	73	66	1.61	50
mín	50	44	0.89	33
máx	91	92	6.34	82

La tabla resume los resultados del procedimiento de enriquecimiento CD34⁺ de 16 unidades de UCB. Las células CD34⁺ se enumeraron mediante análisis de citometría de flujo de plataforma única. Los resultados se representan como media, desviación estándar, mediana y número mínimo (mín.) y máximo (máx.) de células o porcentajes. (n.a. = no analizado)

Tabla 3. Descripción general de la cantidad y calidad de los productos NK DE UCB generados a partir de células CD34+ utilizando bolsas estáticas y biorreactores de uno solo uso

	Donante	Células CD34 ⁺ (x10 ⁶)	veces de expansión	Células CD56 ⁺ (%)	Células CD56 ⁺ (x10 ⁹)
bolsa estática	7	1.7	1.770	63	1.9
	8	1.4	759	80	0.9
	9	1.3	1.291	70	1.2
biorreactor	10	0.9	2.549	95	2.2
	13	1.5	1.764	90	2.4
	15	1.5	2.657	92	3.7
	16	1.2	1.435	92	1.6

5

La tabla resume la generación de productos de terapia de células NK DE UCB generados en bolsas estáticas (Donante 7, 8 y 9) o cultivos de biorreactores (Donante 10, 13, 15 y 16). El número de células NK CD56⁺ se calculó mediante: células CD56⁺ = número de células CD34⁺ * veces del número de células totales de expansión * % de células CD56⁺.

10

Tabla 4. Criterios de prueba de liberación del producto y resultados de los productos finales de células NK

Prueba	Método	Especificación	Donante 10	Donante 13	Donante 15	Donante 16
Número de células NK	FCM	Células NK CD56 ⁺ CD3 ⁻	2.2 x 10 ⁹	2.4 x 10 ⁹	3.7 x 10 ⁹	1.6 x 10 ⁹
Pureza	FCM	> 70 % de Células NK CD56 ⁺ CD3 ⁻	95 %	90 %	92 %	92 %
Viabilidad	FCM	> 70 % 7-AAD negativo	n.a.	98%	97 %	93 %
Recuperación	FCM	% de células negativas CD56 ⁺ CD3 ⁻ NK 7-AAD	n.a.	83 %	86 %	76 %
Contenido de células T CD3 ⁺	FCM	< 1 x 10 ⁴ células T CD3 ⁺ /kg de peso corporal del paciente	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Contenido de células B CD19 ⁺	FCM	< 1 x 10 ⁴ células B CD19 ⁺ /kg de peso corporal del paciente	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Esterilidad	Cultivo	Negativo para contaminación por bacterias y hongos	negativo	negativo	negativo	negativo
Micoplasma	Ensayo de luminiscencia	Negativo para contaminación por micoplasma	negativo	negativo	negativo	negativo
Endotoxina	Ensayo de LAL	< 0,25 EU/ml	0.08	0.02	0.01	0.01
Cariotipo	Cultivo celular	Cariotipo normal	si	si	si	si
Fenotipo	FCM	> 30 % de positividad para CD56, CD94, NKG2A, NCR y NKG2D	si	si	si	si
Ausencia de citocinas	ELISA	< 25 pg/ml de IL-2, IL-7, IL-15 y SCF	si	si	si	so

La tabla muestra una descripción general de las pruebas de liberación del producto y las especificaciones del producto para las células NK generadas ex-vivo utilizando un proceso de cultivo celular cerrado. La tabla resumía los hechos necesarios para proporcionar un certificado de análisis para liberar un producto de terapia de células NK DE UCB para un paciente. n.a. = no analizado en las series de validación, pero estos parámetros se puntuarán para la producción clínica y el certificado de análisis. n.d.: no detectado; la prueba no muestra ningún evento positivo. si = los resultados de la prueba cumplen la especificación relevante para el certificado de análisis.

Tabla 5. Paneles utilizados para citometría de flujo

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	PB	PO
1	CD34	CD133	CD3	CD159a	CD117	CD33	CD244	CD56	CD94	CD45
	581	AC133	UCHT1	Z199.1.10	104D2D1	D3HL60.251	C1.7.1	N901	HP-3B1	J33
2	CD16	CD159c	CD3	-	CD158b	CD158e1	CD158a	CD56	CD159a	CD45
	DJ130c	134522	UCHT1	-	GL183	Z27.3.7	EB6.B.3.1.1	N901	Z199.1.10	J33
3	CD16	CD336	CD3	CD337	CD335	CD314	CD244	CD56	-	CD45
	DJ130c	Z231	UCHT1	Z25	BAB281	ON72	C1.7.1	N901	-	J33

Se muestran las combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados (mAb) contra antígenos específicos dentro de cada panel. Además, se muestra el clon de cada mAb específico. Cada panel se utilizó para análisis de citometría de flujo (FCM) de muestras de médula ósea, sangre de cordón, sangre periférica, LN inguinal y bazo de donantes humanos (todos n = 5). Las fracciones de MNC descongeladas de las muestras de tejido humano se evaluaron en un citómetro de flujo

Navios TM de 10 colores y se analizaron utilizando Kaluza Software® 1.0 (Beckman coulter). El panel 1 se utilizó para identificar diferentes etapas de desarrollo de células NK basadas en los perfiles de expresión de CD34, CD117, CD94 y CD56.¹⁰ Adicionalmente, la expresión de los marcadores de desarrollo temprano CD133 y CD33, el correceptor estimulante 2B4 (CD244) y NKG2A de lectina tipo C Se analizaron en el repertorio de receptores de células NK CD45+CD56^{brillante}CD16^{+/-}CD⁻ y células NK CD45+CD56^{tenue}CD16+CD3⁻ que consisten en receptores inhibidores y estimuladores. Los receptores inhibidores contienen KIR (CD158a, CD158b, CD158e1) y NKG2A (cd159a). Los receptores estimuladores contienen NCR (CD335/336/337), NKG2C (CD159c), NKG2D (CD314) y 2B3 (CD244).

Tabla 6. Etapas de desarrollo de las células NK en BM

	CD34	CD117	CD56	CD94	CD56: brillante o tenue
Etapas 1	+	-	-	-	-
Etapas 2	+	+	-	-	-
Etapas 3a	-	+	-	-	-
Etapas 3b	-	+	+	-	CD56 ^{tenue}
Etapas 4	-	+	+	+	CD56 ^{brillante}
Etapas 5a	-	-	+	+	CD56 ^{brillante< tenue}
Etapas 5b	-	-	+	-	CD56 ^{brillante<< tenue}

Etapas principales del desarrollo de células NK en BM en base a los perfiles de expresión de CD34, CD117, CD56 y CD94.

Tabla 7. Etapas de desarrollo de las células NK en BM (continuación)

	CD133	CD34	CD33	CD117	CD244	CD56	CD94	NKG2A	CD56: brillante o tenue
Etapas 1	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
Etapas 2	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
Etapas 3a	-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	-
Etapas 3b	-	-	-	+	+	+	-	-	CD56 ^{tenue}
Etapas 4	-	-	-	+	+	+	+	+	CD56 ^{brillante}
Etapas 5a	-	-	-	-	+	+	+	+/-	CD56 ^{brillante< tenue}
Etapas 5b	-	-	-	-	+	+	-	+/-	CD56 ^{brillante<< tenue}

La identificación adicional de las etapas de células NK de desarrollo en BM en base a la expresión de CD133, CD34, CD33, CD117, CD244, NKG2A, CD56 y CD94. Se indica la presencia de cada marcador específico dentro de cada etapa (en base al porcentaje de células positivas presentes): + = 100-80 %; +/- < 80 %; - = por debajo de los límites de detección fiables.

Tabla 8. Números de células en muestras analizadas.

	Número de células totales ¹ (x10 ⁴)	Células CD45 ⁺ CD3 ⁻ agrupadas ² (x10 ⁴)	Células progenitoras ³ (x10 ⁴)
BM	16.9 (8.9-34.9)	2.8 (1.9-3.3)	0.98 (0.7-1.2)
CB	39.9 (27.5-99.9)	12.2 (7.1-31.4)	1.88 (0.6-5.0)
PB	37.8 (35.7-38.9)	8.8 (5.4-11.0)	4.15 (1.1-7.7)
inLN	10.0 (21.3-61.9)	6.3 (1.2- 34.4)	2.2 (0.4-5.4)
iiLN	4.0 (2.5-39.6)	7.8 (1.5-29.7)	1.1 (0.1-3.0)
SPL	40.8 (27.4-45.8)	25.2 (13-29.8)	3.03 (2.1-4.1)

Para definir las etapas de desarrollo de las células NK se agruparon muestras en la población CD45⁺CD3⁻ dentro de las células agrupadas CD45⁺/SS para excluir las células T y las células endoteliales del análisis. Para cada tejido se indican los siguientes ítems: ¹Número de células totales dentro del agrupamiento CD45⁺/SS; ²la cantidad de células dentro del agrupamiento CD45⁺CD3⁻ y; ³la cantidad de células total que cubre todas las etapas de desarrollo de células NK. Todos los números de células se muestran en la mediana (rango).

Tabla 9. Caracterización de los subconjuntos de desarrollo de etapas discretas en tejidos humanos y durante la generación de células NK ex-vivo

		CD133	CD34	CD117	CD244	CD33	CD56	CD94	CD159a
1	L	+	+	-	-	-	-	-	-
	F	+	+	-	+	-	-	-	-
	G	+	+	-	-	+	-	-	-
	E	+	+	-	+	+	-	-	-
	M	-	+	-	+	-	-	-	-
	K	-	+	-	+	+	-	-	-
2	N	-	+	+	-	+	-	-	-
	P	-	+	-	-	-	-	-	-
	L	+	+	+	-	-	-	-	-
	F	+	+	+	+	-	-	-	-
	G	+	+	+	-	+	-	-	-
	E	+	+	+	+	+	-	-	-
3a	K	-	+	+	-	+	-	-	-
	M	-	-	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	+	-	+	-	-	-
	J	-	-	+	+	-	-	-	+
	O	-	-	+	-	-	-	-	+
	P	-	-	+	-	-	-	-	-
3b	K	-	-	+	+	+	+	-	-
	M	-	-	+	+	-	+	-	-
	N	-	-	+	-	+	+	-	-
	J	-	-	+	+	-	+	-	+
	B	-	-	+	+	+	+	-	+
	P	-	-	+	-	-	+	-	-
4	K	-	-	+	+	+	+	+	-
	M	-	-	+	+	-	+	+	-
	J	-	-	+	+	-	+	+	+
5a	B	-	-	+	+	+	+	+	+
	K	-	-	-	+	+	+	+	-
	M	-	-	-	+	-	+	+	-
5b	J	-	-	-	+	-	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+
	K	-	-	-	+	+	+	-	-
	M	-	-	-	+	-	+	-	-
	N	-	-	-	-	+	+	-	-
	J	-	-	-	+	-	+	-	+
5b	B	-	-	-	+	+	+	-	+
	P	-	-	-	-	-	+	-	-

5 Leyenda de la tabla 9. La tabla muestra todos los subconjuntos durante la generación de células NK ex-vivo caracterizados con CD133, CD34, CD117, CD244, CD33, CD56, CD94, CD159a, CD45, CD3. Primero se identificaron todas las células CD45+/CD3- y se analizaron adicionalmente de acuerdo con su expresión de antígeno. Las etapas se caracterizan por la expresión de CD34, CD117, CD56 y CD94 como se describe en la figura 1. Los subconjuntos de etapas definidas se caracterizan por la expresión de CD133, CD244, CD33 y CD159a. La clasificación se establece adicionalmente de la siguiente manera:

- 10 Etapa 1: CD34+/CD117-/CD56-/CD94- (no comprometido con NK)
- Etapa 2: CD34+/CD117+/CD56-/CD94- (no comprometido con NK)
- 15 Etapa 3a: CD34-/CD117+/CD56-/CD94- (comprometido con NK)
- Etapa 3b: CD34-/CD117+/CD56+/CD94- (comprometido con NK)

- Etapa 4: CD34-/CD117+/CD56+/CD94+ (comprometido con NK)
 Etapa 5a: CD34 -/CD117-/CD56+/CD94+ (comprometido con NK)
 Etapa 5b: CD34-/CD117-/CD56+/CD94- (comprometido con NK)
 L: CD133+/CD244-/CD33-/CD159a-
 5 F: CD133+/CD244+/CD33-/CD159a-
 G: CD133+/CD244-/CD33+/CD159a-
 E: CD133+/CD244+/CD33+/CD159a-
 M: CD133-/CD244+/CD33-/CD159a-
 K: CD133-/CD244+/CD33+/CD159a-
 10 N: CD133-/CD244-/CD33+/CD159a-
 J: CD133-/CD244+/CD33-/CD159a+
 O: CD133-/CD244-/CD33-/CD159a+
 B: CD133-/CD244+/CD33+/CD159a+
 P: CD133-/CD244-/CD33-/CD159a-
 15 El desarrollo de células NK y las células NK inmaduras se definen como un conjunto discreto de etapas (1-5b) o una combinación de etapas y/o un subconjunto específico (L, F, G, E, M, N, K, J, O, B) o una combinación de subconjuntos y/o una combinación de etapas y subconjuntos.

Tabla 10. Apariencia de los subconjuntos de desarrollo identificados de etapas discretas en tejidos humanos y generación de células NK ex-vivo

		BM	CB	PB	SPL	inLN	LiLN	s0	Generación de células NK ex-vivo				
									s1	s2	s3	s4	s5
1	L	37%						17%					
	F	5%						18%					
	G	4%											
	E							31%	42%	38%			
	M							4%					
	K							7%	48%	40%			
	N	6%											
2	P	46%						23%					
		98%						100%	90%	78%			
	L	14%						1%					
	F	44%	63%					10%					
	G	4%						4%					
	E	29%	25%					79%	53%	51%			
	K							5%	33%	28%			
3a	N							1%					
	P	6%											
		97%	88%					100%	86%	79%			
	E								6%	5%	3%		
	K	27%	33%	29%					57%	55%	72%	76%	57%
	M		14%						10%	10%	2%		
	N	7%	12%				44%		18%	24%	22%		
3b	J	18%			25%	30%	25%						
	O	14%			18%								
	P	29%	31%	31%	40%	46%	20%		9%	6%	1%		
		95%	90%	60%	83%	76%	89%		100%	100%	100%	76%	57%
	K	25%	40%								63%	37%	60%
	M										17%	31%	27%
	N						33%				5%	4%	
4	J	48%		43%	40%	60%	40%				8%	19%	
	B										5%	9%	13%
	P					26%					2%		
		73%	40%	43%	40%	86%	73%				100%	100%	100%
	K											9%	1%
	M											3%	1%
	J	87%	81%	84%	82%	89%	38%				71%	73%	58%
5a	B	10%		11%			45%				28%	15%	40%
		97%	81%	95%	82%	89%	83%				99%	100%	100%
	K			1%								1%	2%
	M	24%	16%	31%	25%	7%	13%						3%
	J	75%	82%	1%	71%	88%	68%				73%	78%	56%
	B	1%		67%		3%	13%				20%	20%	32%
		100%	98%	100%	96%	98%	94%				93%	99%	93%
5b	K	6%	11%	12%							38%	12%	30%
	M	73%	60%	63%	40%	18%	17%				19%	44%	39%
	N			1%									
	J	19%	23%	23%	51%	75%	76%				28%	29%	
	B										14%		31%
	P			1%		5%							
		98%	94%	100%	91%	98%	93%				99%	85%	100%

Leyenda de la tabla 10: Los porcentajes de subconjuntos específicos de etapas de desarrollo de células NK discretas en tejidos humanos y durante la generación de células NK ex-vivo se describen por su tamaño medio en % de células de las etapas 1-5b. En el presente documento se muestran los principales subconjuntos confiables dentro de una cierta etapa o tejido.

Tabla 11. Subconjuntos de desarrollo identificados de etapas discretas mostradas como porcentajes de linfocitos presentes en tejidos humanos y durante la generación de células NK ex-vivo.

etapa	subconjunto	BM	CB	PB	SPL	inLN	LiLN	Ex-vivo semana 0	Ex-vivo semana 1	Ex-vivo semana 2	Ex-vivo semana 3	Ex-vivo semana 4	Ex-vivo semana 5
1	L	0.67 %						0.93 %					
	F	0.09 %						0.99 %					
	G	0.07 %											
	E							1.70 %	3.21 %	1.38 %			
	M							0.22 %					
	K							0.38 %	3.67 %	1.46 %			
	N	0.11 %											
	P	0.83 %						1.26 %					
subconjunto total		1.77 %						5.49 %	6.88 %	2.84 %			
2	L	0.41 %						0.70 %					
	F	1.29 %	0.95 %					6.99 %					
	G	4.00 %						2.79 %					
	E	0.85 %	0.38 %					55.20 %	8.16 %	2.23 %			
	K							3.49 %	5.08 %	1.22 %			
	N							0.70 %					
	P	0.18 %											
subconjunto total		6.73 %	1.33 %					69.87 %	13.24 %	3.45 %			
3a	E								4.62 %	4.56 %	0.67 %		
	K	0.18 %	0.34 %	0.04 %					43.86 %	50.13 %	16.06 %	0.70 %	0.65 %
	M		0.14 %						7.69 %	9.12 %	0.45 %		
	N	0.05 %	0.12 %				0.92 %		13.85 %	21.88 %	4.91 %		
	J	0.12 %			0.14 %	0.09 %	0.52 %						
	O	0.09 %			0.10 %								
	P	0.19 %	0.32 %	0.04 %	0.22 %	0.14 %	0.42 %		6.92 %	5.47 %	0.22 %		

(continuación)

etapa	subconjunto	BM	CB	PB	SPL	inLN	LiLN	Ex-vivo semana 0	Ex-vivo semana 1	Ex-vivo semana 2	Ex-vivo semana 3	Ex-vivo semana 4	Ex-vivo semana 5
subconjunto total		0.63 %	0.93 %	0.08 %	0.46 %	0.23 %	1.85 %	0.00 %	76.94 %	91.15 %	22.31 %	0.70 %	0.65 %
3b	K	0.06 %									3.19 %	3.83 %	8.87 %
	M										0.86 %	3.21 %	3.99 %
	N		0.12 %				0.34 %				0.25 %	0.41 %	
	J	0.11 %		0.04 %	0.22 %	0.19 %	0.41 %				0.41 %	1.97 %	
	B										0.25 %	0.93 %	1.92 %
	P					0.08 %					0.10 %		
subconjunto total		0.16 %	0.12 %	0.04 %	0.22 %	0.28 %	0.75 %				5.07 %	10.36 %	14.78 %
4	K											5.03 %	0.60 %
	M											1.68 %	0.60 %
	J	0.99 %	0.30 %	0.40 %	0.86 %	0.67 %	0.32 %				9.23 %	40.80 %	34.71 %
	B	0.11 %		0.05 %			0.38 %				3.64 %	8.38 %	23.94 %
subconjunto total		1.11 %	0.30 %	0.46 %	0.86 %	0.67 %	0.70 %				12.87 %	55.89 %	59.85 %
5a	K			0.07 %								0.19 %	0.32 %
	M	1.40 %	1.08 %	2.17 %	2.27 %	0.22 %	0.24 %						0.47 %
	J	4.38 %	5.54 %	0.07 %	6.45 %	2.76 %	1.27 %				2.03 %	14.87 %	8.86 %
	B	0.06 %		4.70 %		0.09 %	0.24 %				0.56 %	3.81 %	5.07 %
subconjunto total		5.84 %	6.62 %	7.01 %	8.72 %	3.08 %	1.76 %				2.59 %	18.88 %	14.72 %
5b	K	0.26 %	0.25 %	0.45 %							0.21 %	0.24 %	1.61 %
	M	3.15 %	1.35 %	2.36 %	1.23 %	0.35 %	0.25 %				0.10 %	0.86 %	2.09 %
	N			0.04 %									
	J	0.82 %	0.52 %	0.86 %	1.57 %	1.46 %	1.13 %				0.15 %	0.57 %	
	B										0.08 %		1.66 %
	P			0.04 %		0.10 %							

(continuación)

etapa	subconjunto	BM	CB	PB	SPL	inLN	LiLN	Ex-vivo semana 0	Ex-vivo semana 1	Ex-vivo semana 2	Ex-vivo semana 3	Ex-vivo semana 4	Ex-vivo semana 5
subconjunto total		4.23 %	2.12 %	3.74 %	2.79 %	1.90 %	1.39 %				0.53 %	1.67 %	5.36 %

Referencias

1. Vivier E, Nunes JA, Vely F (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-1519.
2. Ljunggren HG, Malmberg KJ (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7: 329-339.
3. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, et al. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097-2100.
4. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, et al. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105: 3051-3057.
5. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, et al. (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28: 955-959.
6. Klingemann HG, Martinson J (2004) Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 6: 15-22.
7. Passweg JR, Koehl U, Uharek L, Meyer-Monard S, Tichelli A (2006) Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 19: 811-824.
8. McKenna DH, Sumstad D, Bostrom N, Kadidlo DM, Fautsch S, et al. (2007) Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* 47: 520-528.
9. Koehl U, Esser R, Zimmermann S, Tonn T, Kotchetkov R, et al. (2005) Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr* 217: 345-350.
10. Iyengar R, Handgretinger R, Babarin-Dorner A, Leimig T, Otto M, et al. (2003) Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy* 5: 479-484.
11. Meyer-Monard S, Passweg J, Siegler U, Kalberer C, Koehl U, et al. (2009) Clinical-grade purification of natural killer cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* 49: 362-371.
12. Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, Aschan J, Guven H, et al. (2001) A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum Immunol* 62: 1092-1098.
13. Barkholt L, Alici E, Conrad R, Sutlu T, Gilljam M, et al. (2009) Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NKlike T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy* 1: 753-764.
14. Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Jr., Samsel L, Fan Y, et al. (2009) Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy* 11: 341-355.
15. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, et al. (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69: 4010-4017.
16. Siegler U, Meyer-Monard S, Jorger S, Stern M, Tichelli A, et al. (2010) Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy*.
17. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, Preijers F, van der Meer A, et al. (2010) 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.
18. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, et al. (2010) Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 16: 232-236.
19. Aktas M, Buchheiser A, Houben A, Reimann V, Radke T, et al. (2010) Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy* 12: 338-348.
20. Eichler H, Beck C, Schroder B, Nguyen XD, Kluter H (2002) Nonobese diabetic-severe combined immunodeficient mice transplantation of volume-reduced and thawed umbilical cord blood transplants following closed-system immunomagnetic cell selection. *Transfusion* 42: 1285-1292.
21. Querol S, Capmany G, Azqueta C, Gabarro M, Fornas O, et al. (2000) Direct immunomagnetic method for CD34+ cell selection from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols. *Transfusion* 40: 625-631.
22. McNiece IK, Stoney GB, Kern BP, Briddell RA (1998) CD34+ cell selection from frozen cord blood products using the Isolex 300i and CliniMACS CD34 selection devices. *J Hematother* 7: 457-461.
23. Giordano R, Lazzari L, Montemurro T, Lecchi L, Porretti L, et al. (2003) Clinical-grade cell purification from thawed cord blood: an example of translational research. *Bone Marrow Transplant* 32: 965-966.
24. Lecchi L, Perego L, Garcea F, Ratti I, Brasca M, et al. (2009) Ten-year quality control of a semiautomated procedure of cord blood unit volume reduction. *Transfusion* 49: 563-569.
25. Selves P, Mirabet V, Planelles D, Blasco I, Perales A, et al. (2005) Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: a comparative study. *Transfusion* 45: 867-873.
26. Selves P, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Soler MA, Roig R (2006) Automated separation of cord blood units in top and bottom bags using the Compomat G4. *Clin Lab Haematol* 28: 202-207.
27. Lapierre V, Pellegrini N, Bardey I, Malugani C, Saas P, et al. (2007) Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semiautomated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy* 9: 165-169.
28. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, et al. (1995) Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10119-10122.
29. Overes IM, de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Fredrix H, de Graaf AO, et al. (2008) Expression of P2X5 in lymphoid malignancies results in LHR-1-specific cytotoxic T-cell-mediated lysis. *Br J Haematol* 141: 799-807.

30. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294: 15-22.
31. L.G. Shaffer MLS, L.J. Campbell, editor (2009) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel.
41. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-2438.
- 5 42. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxeavanis CN. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(3):176-186.
43. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):329-339.
44. Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. *Blood*. 1995;85(10):2654-2670.
- 10 45. Raulet DH. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 1999;11(2):129-134.
46. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):413-425.
47. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405-429.
48. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:257-286.
49. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*. 2005;22(3):295-304.
- 15 50. Freud AG, Yokohama A, Becknell B et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(4):1033-1043.
51. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-3057.
- 20 52. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*. 2004;172(3):1455-1462.
53. Eissens DN, Schaap NP, Preijers FW et al. CD3(+)/CD19(+)-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia*. 2010;24(3):583-591.
- 25 54. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW et al. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101(9):3730-3740.
55. Male V, Hughes T, McClory S et al. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol*. 2010; 185(7):3913-3918.
- 30 56. Kobari L, Giarratana MC, Pflumio F et al. CD 133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10(2):273-281.
57. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214:56-72.
58. Sivori S, Parolini S, Falco M et al. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol*. 2000;30(3):787-793.
- 35 59. Sivori S, Falco M, Marcenaro E et al. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(7):4526-4531.
60. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP et al. NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplants: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 2005;105(10):4135-4142.
61. Cooley S, Xiao F, Pitt M et al. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self MHC is developmentally immature. *Blood*. 2007
- 40 62. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-640.
63. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006;20(3):123-137.
64. Wang Y, Xu H, Zheng X et al. High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(5):377-382.
- 45 65. Yu J, Mao HC, Wei M et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK cell subsets. *Blood*. 2009;blood-2009.
66. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795-799.
- 50 67. Kaiser BK, Pizarro JC, Kerns J, Strong RK. Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(18):6696-6701.
68. Peruzzi G, Masilamani M, Borrego F, Coligan JE. Endocytosis as a mechanism of regulating natural killer cell function: unique endocytic and trafficking pathway for CD94/NKG2A. *Immunol Res*. 2009;43(1-3):210-222.
69. Moroso V, Metselaar HJ, Mancham S et al. Liver grafts contain a unique subset of natural killer cells that are transferred into the recipient after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2010;16(7):895-908.
- 55 70. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*. 1997;99(7):1472-1477.
71. Yu S, Nakafusa Y, Flye MW. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery*. 1994;116(2):229-234.
72. Dalle JH, Menezes J, Wagner E et al. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*. 2005;57(5 Pt 1):649-655.
- 60 73. Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M et al. Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol*. 2003;71(1):29-38.
74. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D 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*. 2010;5(2):e9221.

75. Zhao XY, Huang XJ, Liu KY, Xu LP, Liu DH. Reconstitution of Natural Killer Cell Receptor Repertoires after Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Blood and Marrow Transplantation: Analyses of CD94: NKG2A and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Expression and Their Associations with Clinical Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(6):734-744.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una recolección de linfocitos citolíticos naturales (NK) dicho método comprende

- 5 i - cultivar las células bajo condiciones estáticas de una muestra que comprende células madre, células progenitoras o ambas, de tejido postembrionario humano en una bolsa desechable para cultivar células de mamífero, a una densidad celular de al menos $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ durante al menos 7 días en un medio de cultivo que comprende suero humano, una recolección de citocinas y heparina de bajo peso molecular, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más del factor de células madre (SCF), Ligando flt-3 (FLT-3L), trombopoyetina (TPO) e interleucina-7 (IL-7) y tres o más
- 10 de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa) obteniendo de esta manera una recolección de células madre, células progenitoras cultivadas o ambas, de tejido postembrionario humano que contiene una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, y
- 15 ii - cultivar las células obtenidas en el paso (i) mientras que el medio de cultivo se mezcla durante el cultivo, para mejorar el intercambio de gases y para reducir la adherencia de las células a una superficie sólida durante al menos 7 días a una densidad celular de al menos $1 \times 10^6/\text{ml}$ en un medio de cultivo que comprende suero humano y una recolección de citocinas, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de factor de células madre (SCF), interleucina-7 (IL-7), interleucina-15 e interleucina-2 y tres o más de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa), obteniendo de esta manera una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas.
- 20

25 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cultivo del paso (ii) se realiza bajo mezcla continua, preferiblemente en un biorreactor para cultivar células de mamífero.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende adicionalmente como paso (ia) cultivar células recolectadas del paso (i) (mientras que el medio de cultivo se mezcla durante el cultivo, para mejorar el intercambio de gases y para reducir la adherencia de las células a una superficie sólida) a una densidad celular de al menos $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ durante al menos 4 días en un medio de cultivo que comprende suero humano, una recolección de citocinas y heparina de bajo peso molecular, en la que dicha recolección de citocinas comprende tres o más de factor de células madre (SCF), Ligando flt-3 (FLT-3L), interleucina-15 e interleucina-7 (IL-7) y tres o más de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF) y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-I alfa) obteniendo de esta manera una recolección de células madre, células progenitoras cultivadas o ambas, que contienen una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, y

30 cultivar las células obtenidas del paso (ia) en el paso (ii).

35

40 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que se cosechan las células obtenidas en el paso (ii).

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichas células cosechadas se lavan en un sistema cerrado de tal manera que los componentes del medio de cultivo se diluyen al menos 500 veces y se reemplazan por una solución libre de suero que es compatible con administración humana en la que dicha solución comprende albúmina de suero humano.

45

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, en el que dichas células cosechadas se almacenan durante al menos un día a una temperatura de entre temperatura ambiente y 0°C , preferiblemente dichas células cosechadas se almacenan durante 1, 2 o 3 días a dicha temperatura.

50

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 - 6, en el que dichas células cosechadas se dividen en al menos 5 porciones y se almacenan a una temperatura por debajo de -70°C .

8. Un método para determinar la etapa de desarrollo del desarrollo de NK, dicho método comprende

55

- obtener una muestra de células de dicho cultivo del paso (i), paso (ia) y/o paso (ii) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7,
 - determinar cuatro o más de los marcadores de superficie celular CD133, CD34, CD117, CD244, CD45, CD33, CD3, CD56, CD94, CD159a, CD2, CD7, CD10, CD18, CD11a, LFA-1 y CD45RA, en los que la expresión de una combinación de dichos marcadores de superficie celular es indicativa para dicha etapa de desarrollo., y
 - determinar la etapa de desarrollo de células NK presentes en dicha muestra.
- 60

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha etapa de desarrollo del desarrollo de NK se clasifica como etapa 1, 2, 3a, 3b, 4, 5a, y 5b al medir la expresión de los marcadores de superficie CD34, CD117, CD56, y CD94, en los que

65

- la etapa 1 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 positivo, CD117 negativo, CD56 negativo, CD94 negativo,
la etapa 2 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 positivo, CD117 positivo, CD56 negativo, CD94 negativo,
- 5 la etapa 3a se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD117 positivo, CD56 negativo, CD94 negativo,
la etapa 3b se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD117 positivo, CD56 positivo, CD94 negativo,
la etapa 4 se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD117 positivo, CD56 positivo, CD94 positivo,
- 10 la etapa 5a se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD117 negativo, CD56 positivo, CD94 positivo,
la etapa 5b se caracteriza por células que tienen el perfil de expresión de CD34 negativo, CD117 negativo, CD56 positivo, CD94 negativo.
- 15 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o reivindicación 9, que comprende adicionalmente medir la expresión de CD133, CD33, CD244, y NKG2A, en el que
- 20 la etapa 1 se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de CD33, CD244, y NKG2A,
la etapa 2 se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de NKG2A,
la etapa 3a se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de CD133 y NKG2A,
la etapa 3b se caracteriza adicionalmente por células negativas para la expresión de CD 133, CD33, y NKG2A,
las etapas 4, 5a y 5b se caracterizan adicionalmente por células negativas para la expresión de CD133 y CD33.
- 25 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 10, en el que dicha muestra se obtiene durante un paso (i), (ia), o (ii) de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, y en el que el cultivo del paso (i), paso (ia) o paso (ii) se termina sobre la base de una etapa de desarrollo determinada en dicha muestra.
- 30 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en el que dicha muestra se obtiene durante un paso (i), (ia), o (ii) de cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, y en el que el cultivo del paso (i), paso (ia) o paso (ii) se termina sobre la base de una prevalencia detectada de una etapa de desarrollo en dicha muestra.
- 35 13. Una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células progenitoras comprometidas con el linaje de células NK, que se puede obtener del paso (i) o paso (ia) de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 que comprende entre
- 40 - 1 - 10 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 1 de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁻, CD56⁻, CD94⁻;
- 2 - 15 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 2 de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁻, CD94⁻, y
- 50 - 97 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁻, CD94⁻.
- 45 14. Una recolección de células cultivadas que contiene una pluralidad de células NK o células progenitoras NK o ambas, que se puede obtener del paso (ii) de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 para uso como un medicamento que comprende entre
- 50 - 0.2 - 4 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3a de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁻, CD94⁻;
- 7 - 21 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 3b de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁺, CD94⁺;
- 35 - 78 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 4 de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁺, CD56⁺, CD94⁺;
- 9 - 21 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5a de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁻, CD56⁺, CD94⁺, y
- 55 1 - 9 % de células con un perfil de marcador celular de la etapa 5b de la tabla 9 caracterizado por ser CD34⁺, CD117⁻, CD56⁺, CD94⁻.

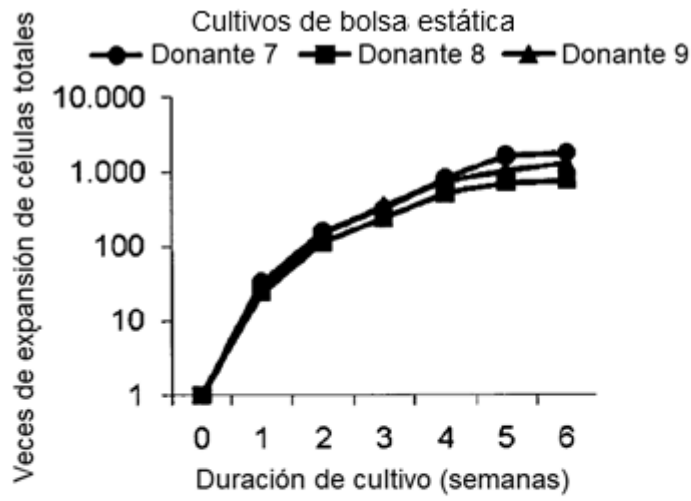


Fig. 1A

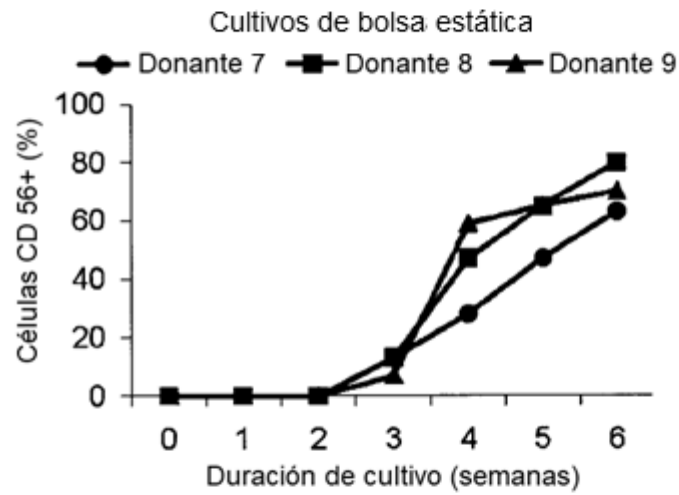


Fig. 1B

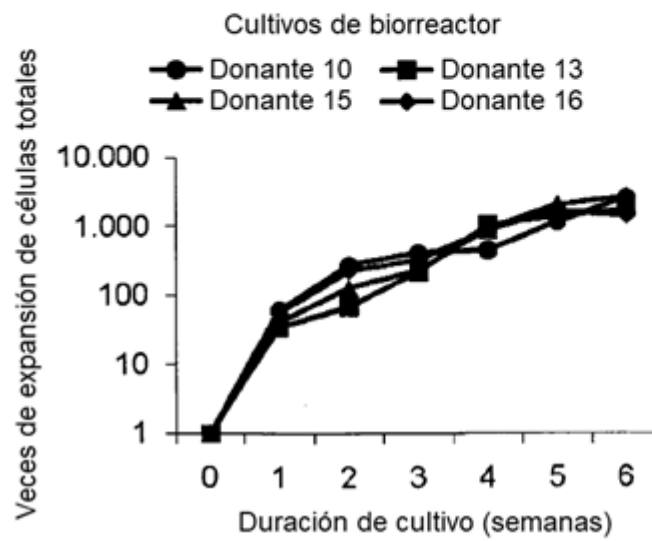


Fig. 1C

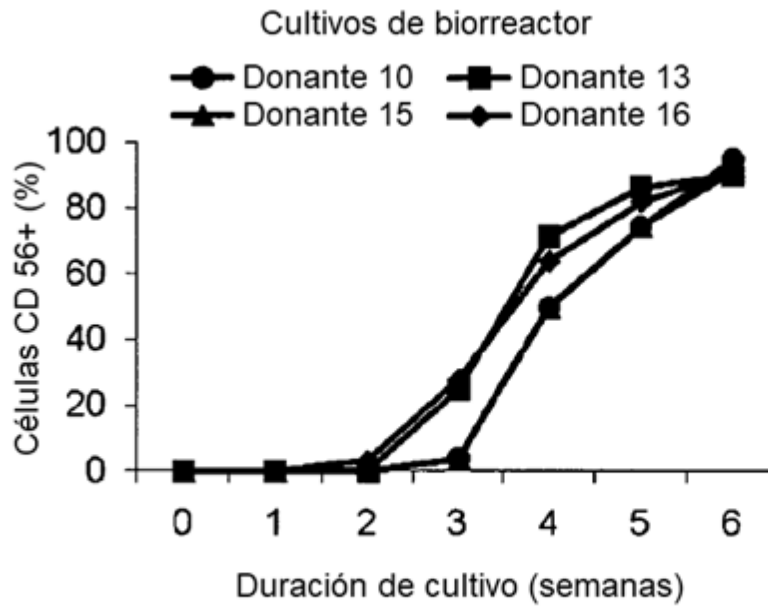


Fig. 1D

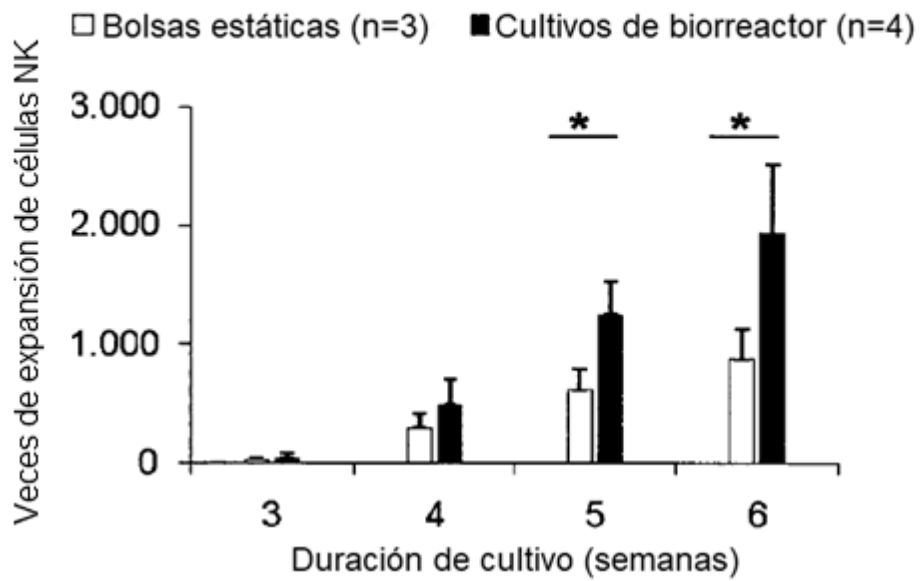


Fig. 1E

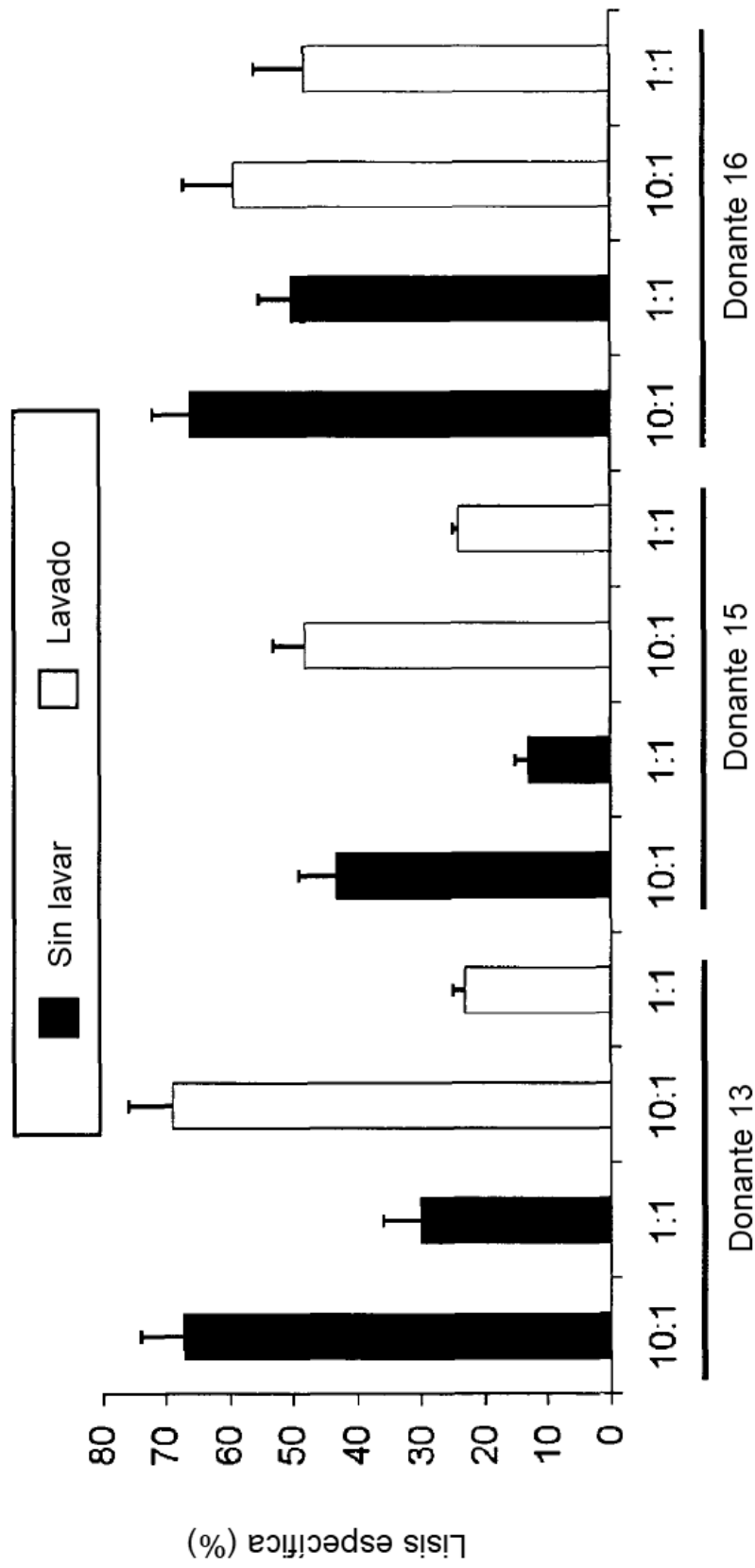


Fig. 2A

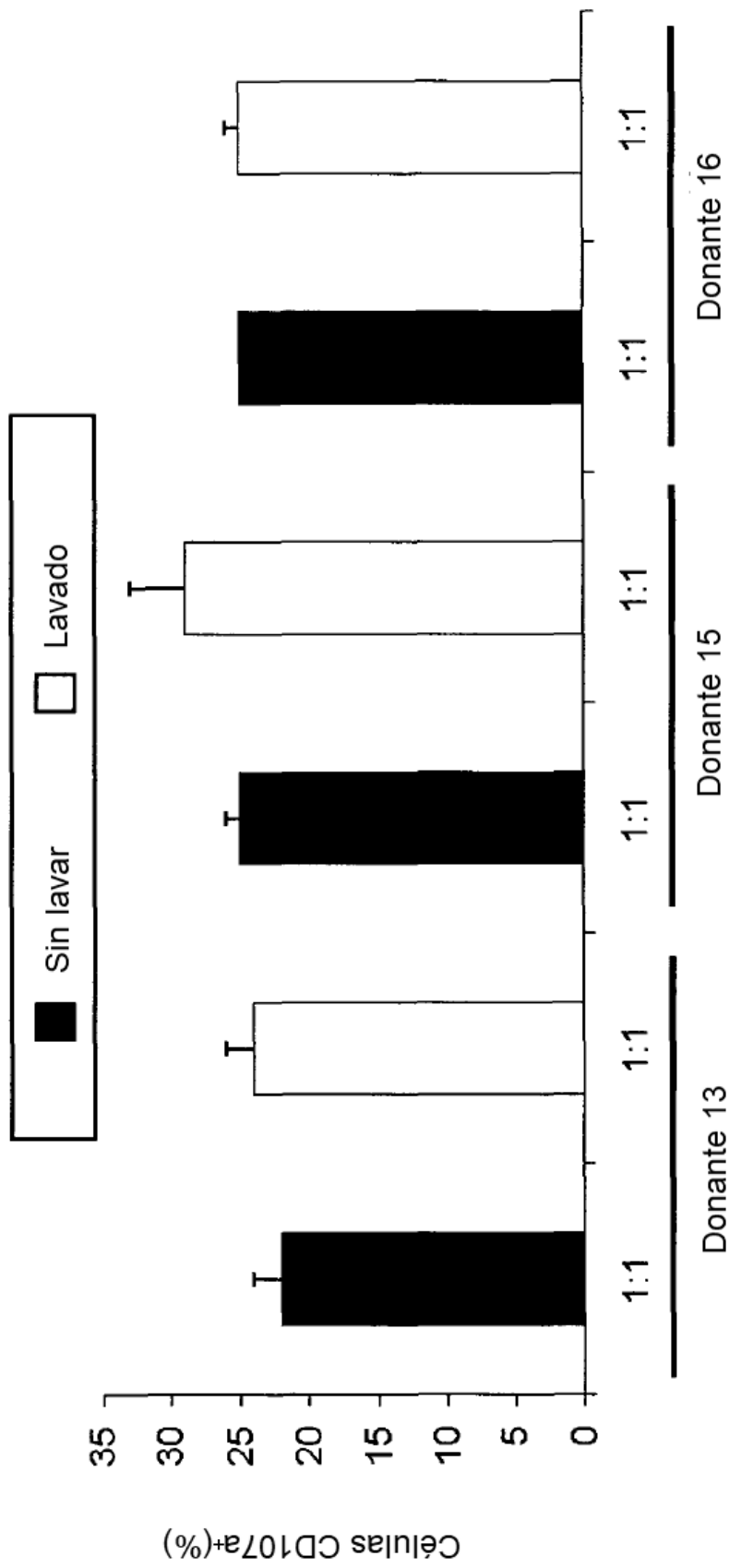


Fig. 2B

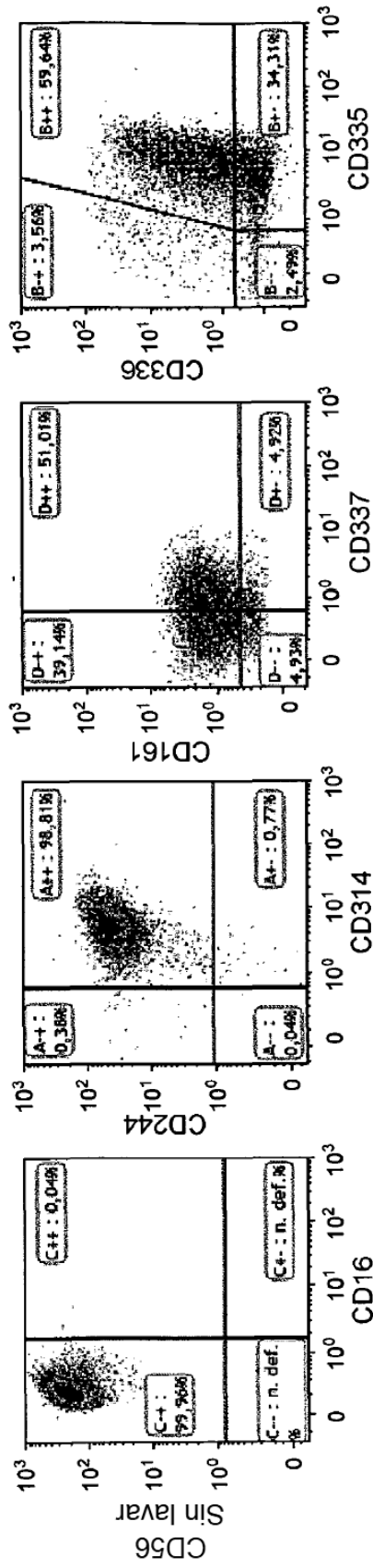


Fig. 3A

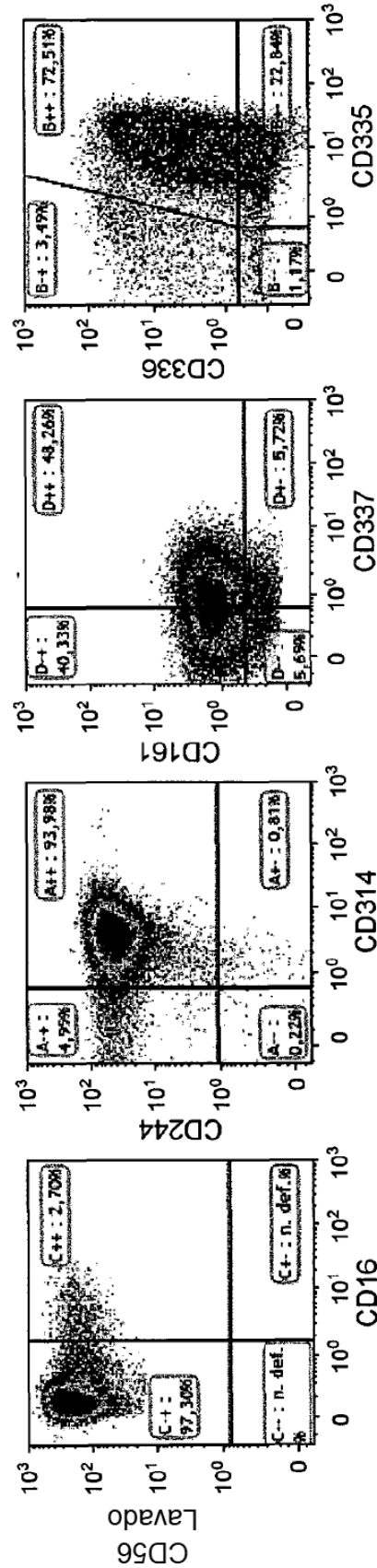


Fig. 3B

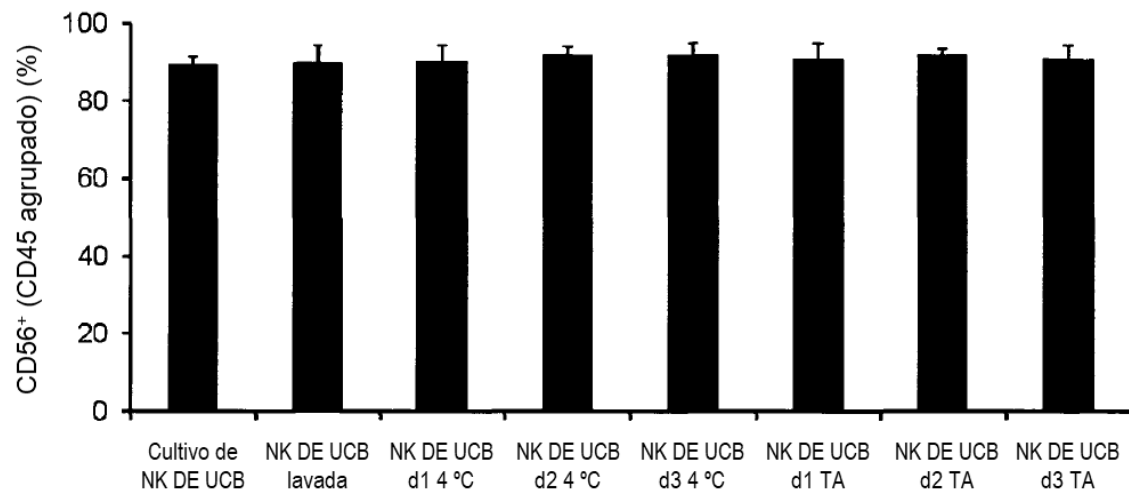


Fig. 4A

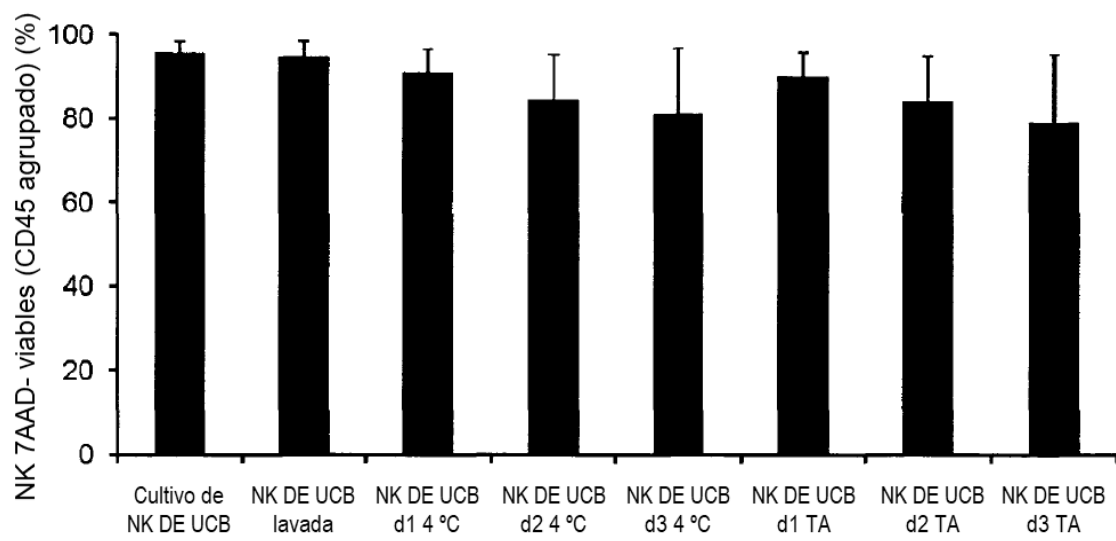


Fig. 4B

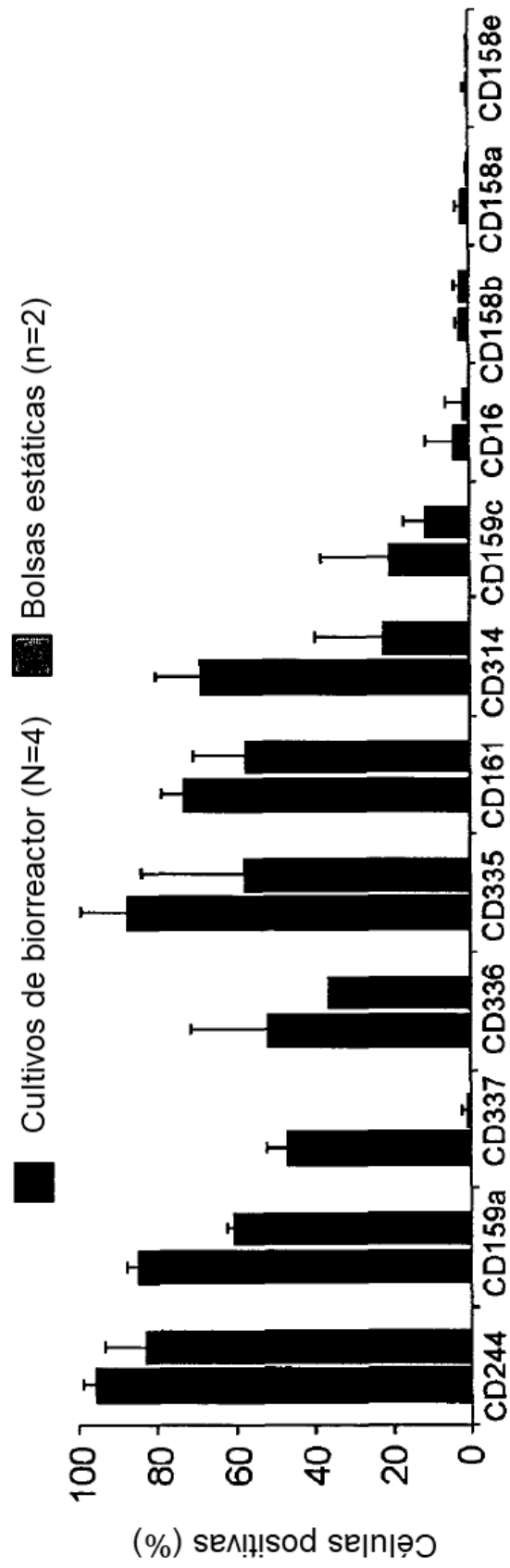


Fig.5A

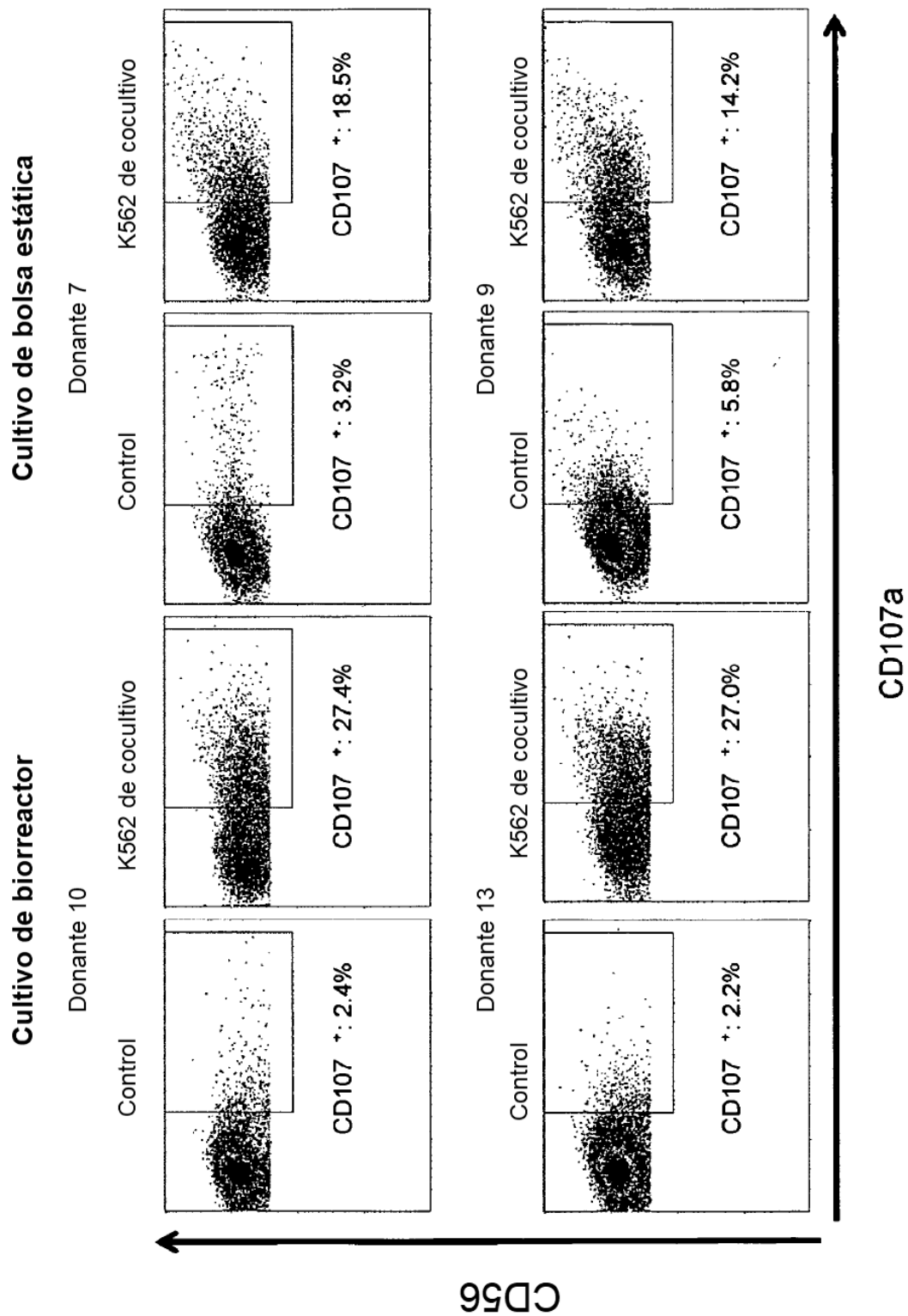


Fig.5B

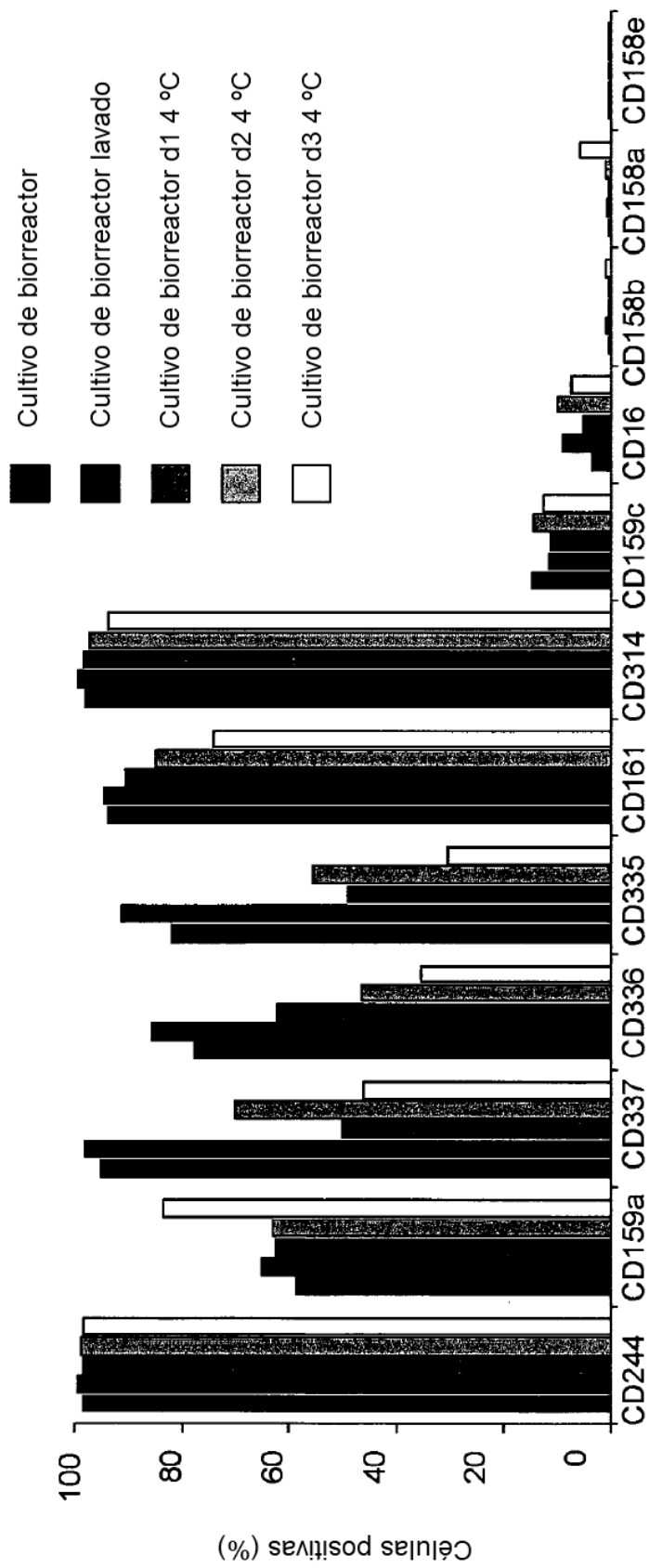


Fig.6A

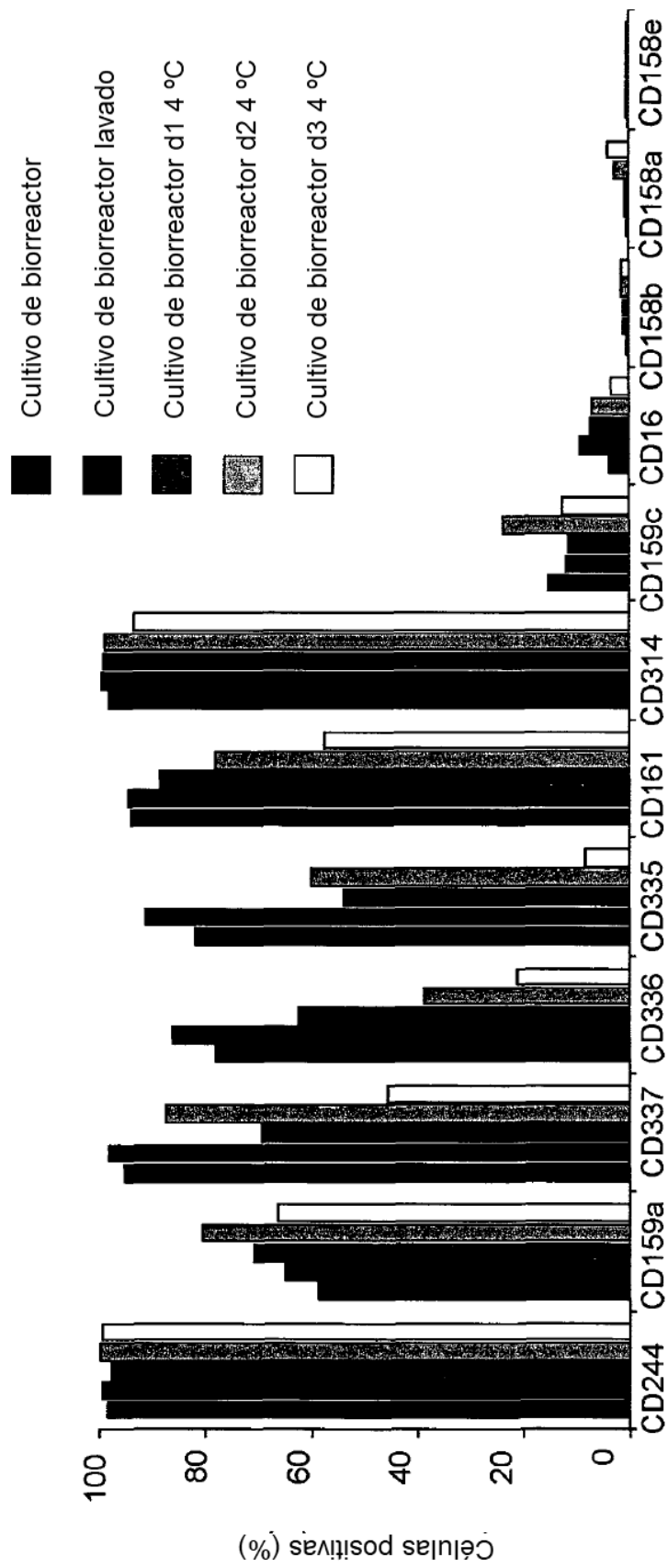


Fig.6B

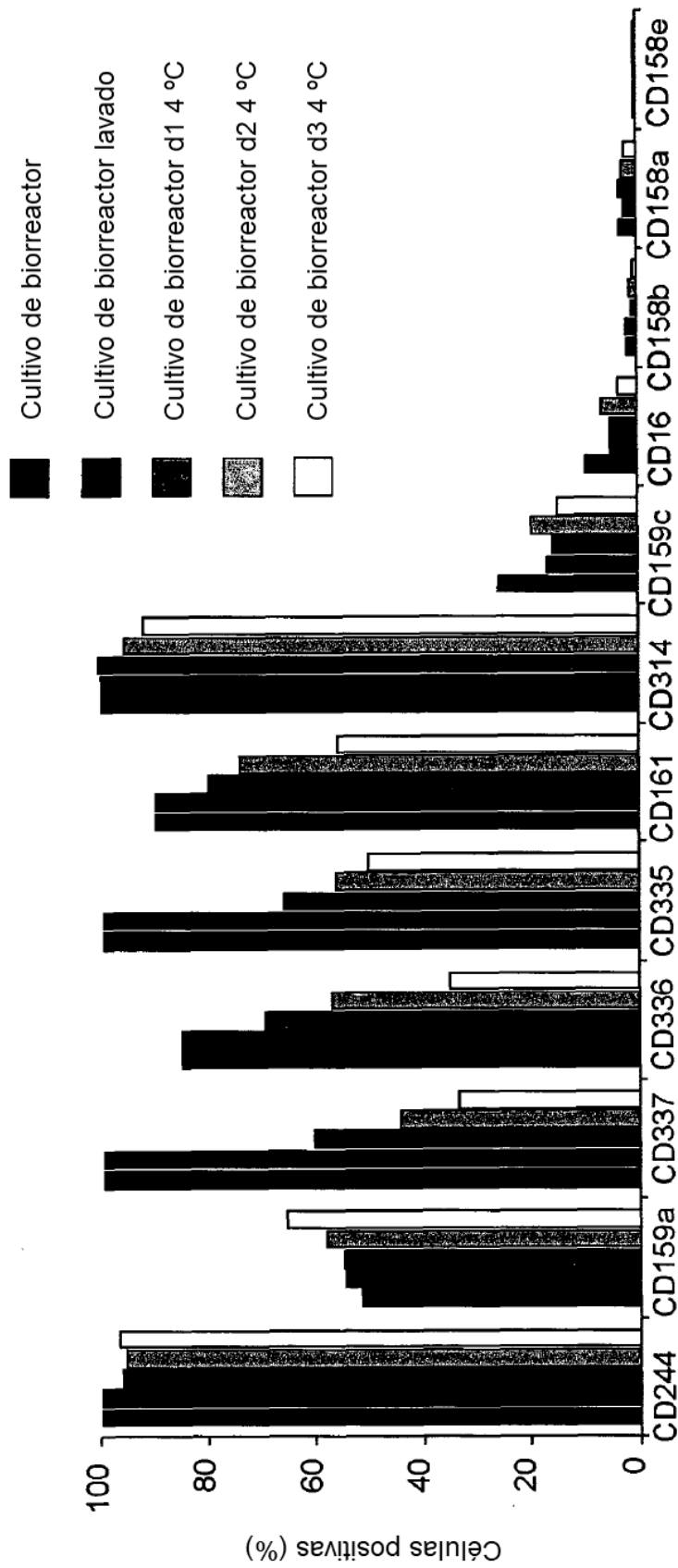


Fig.6C

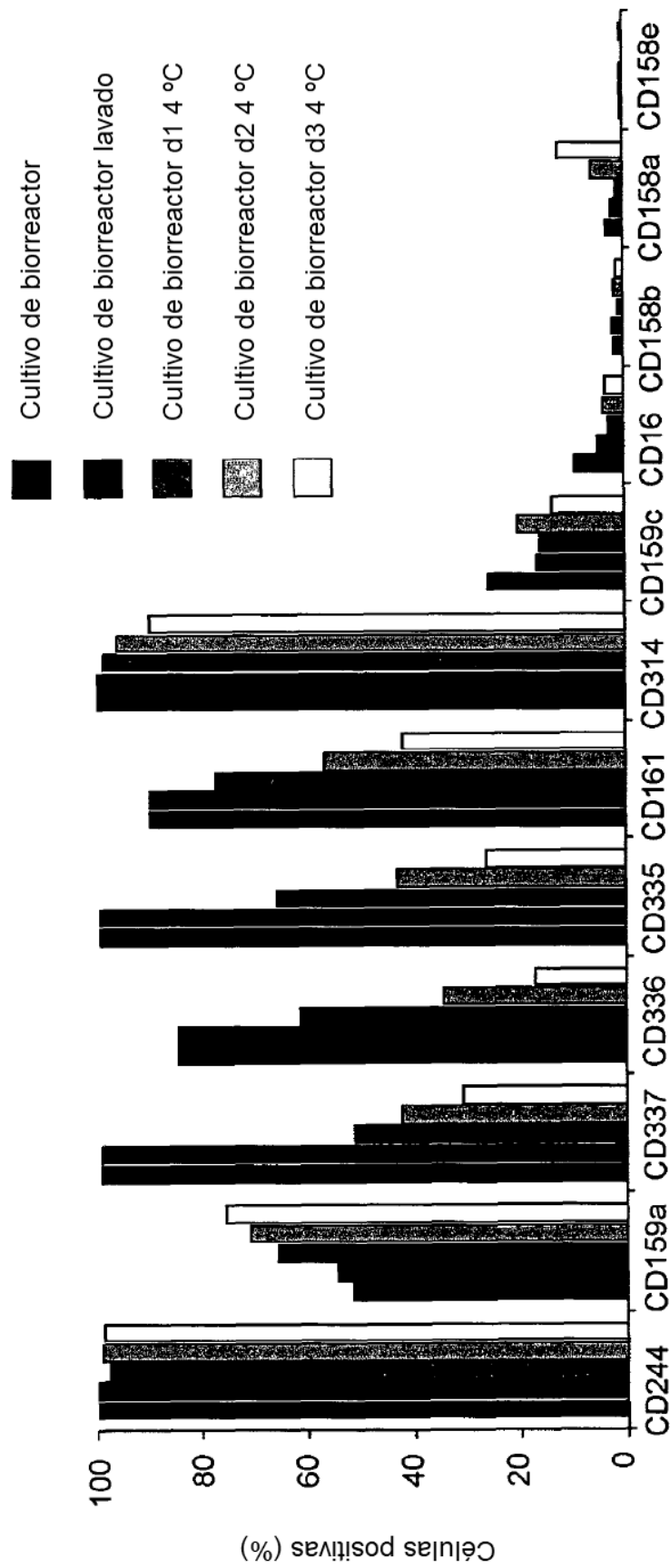


Fig.6D

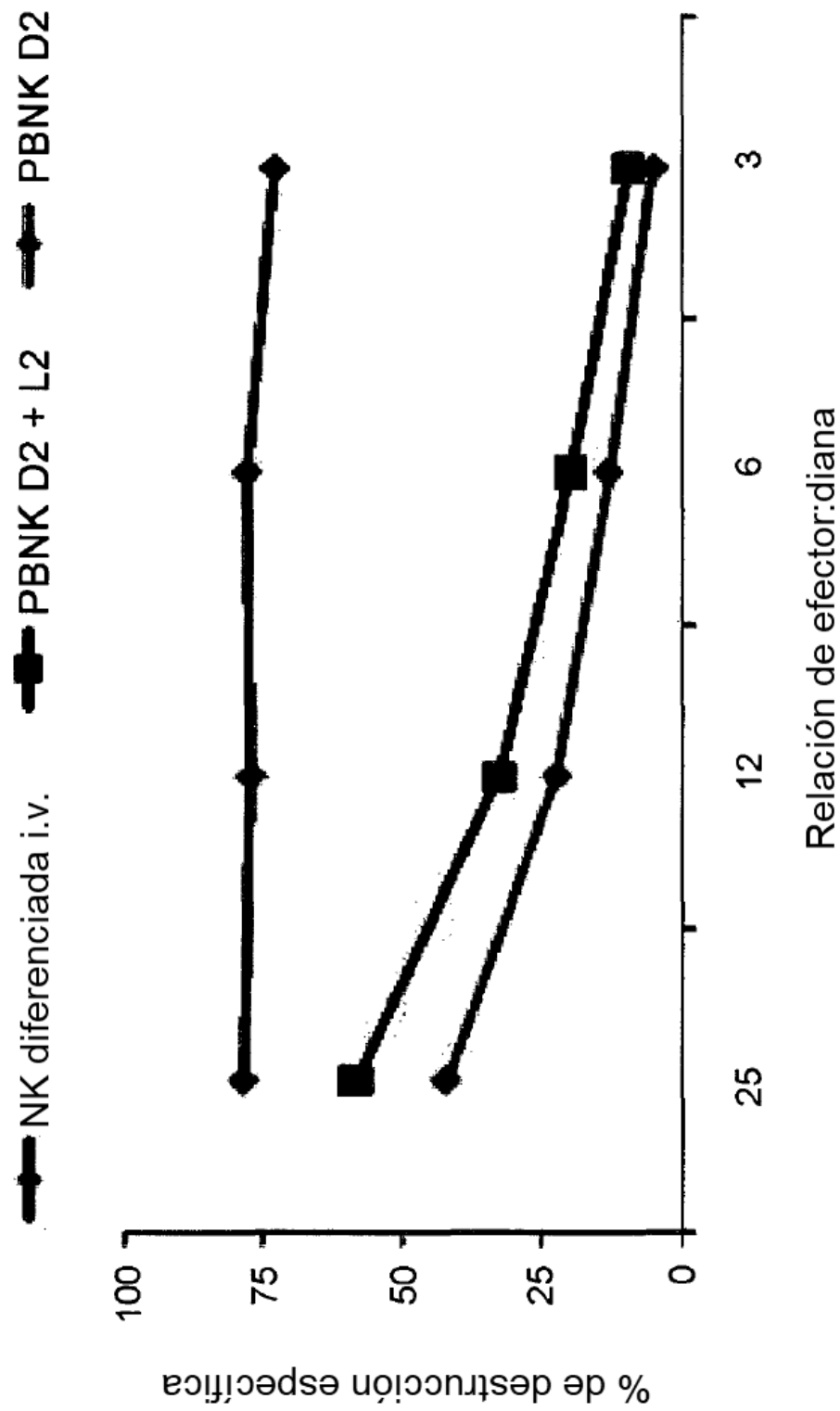


Fig.7

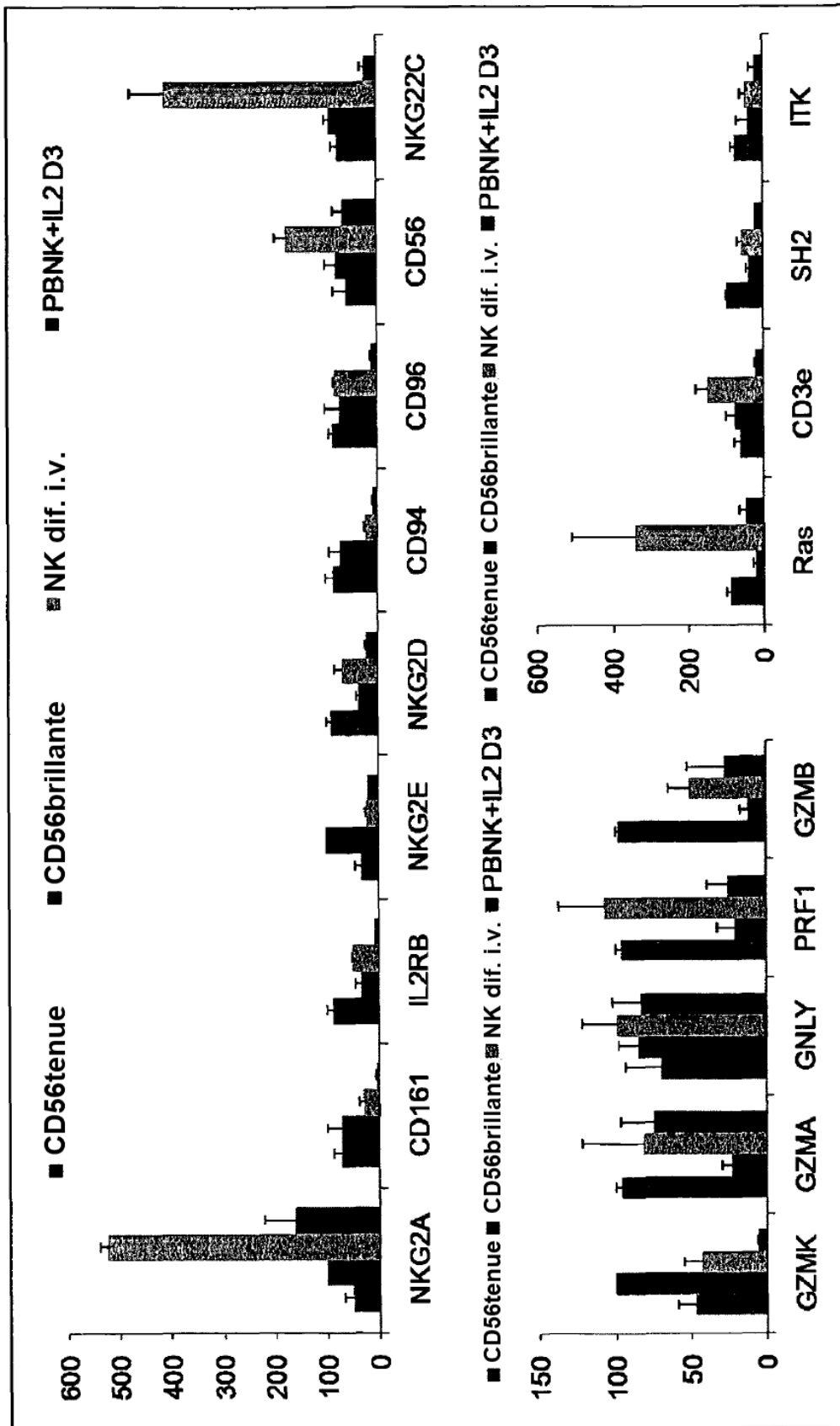


Fig.8

Médula ósea

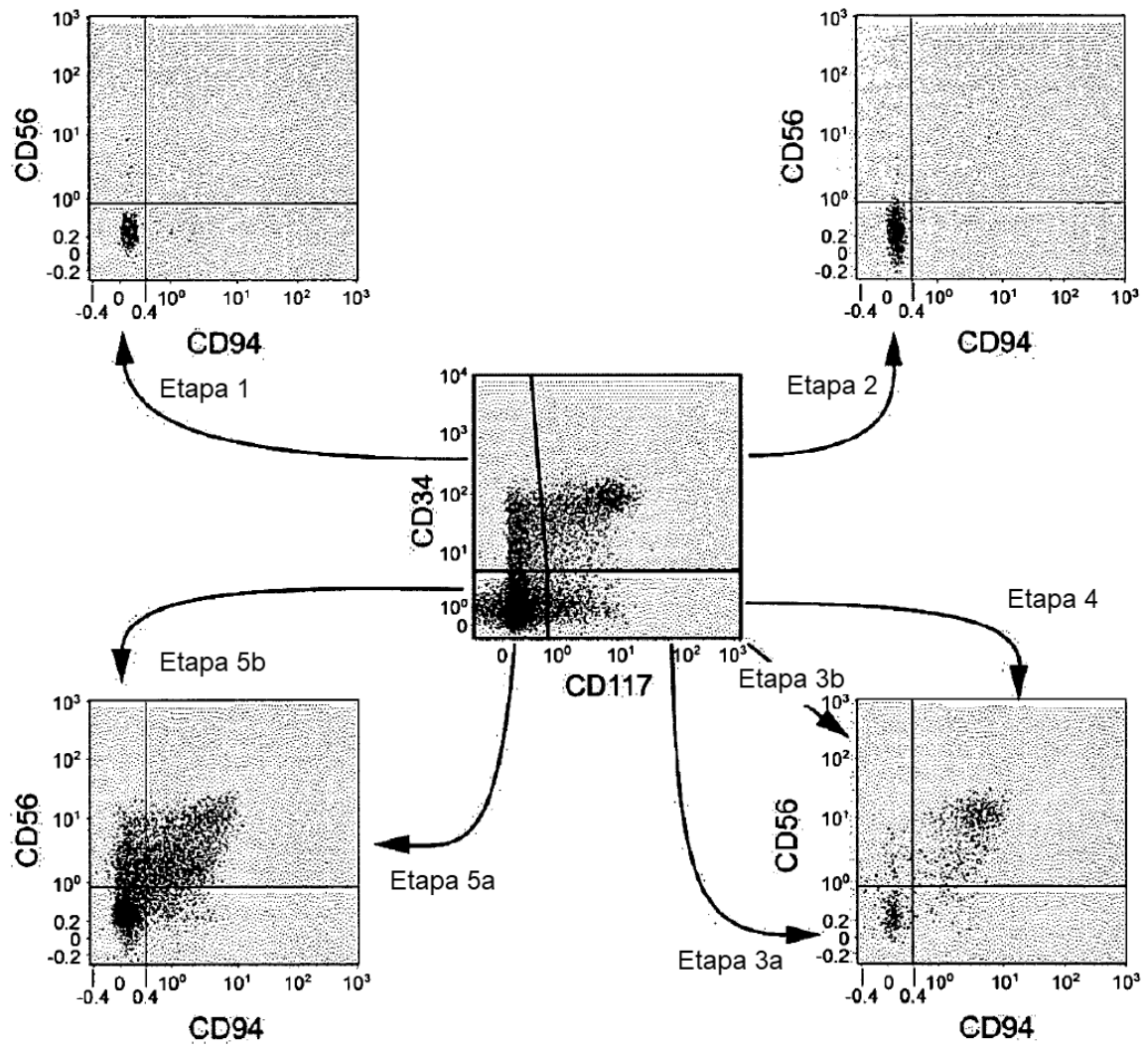


Fig. 9

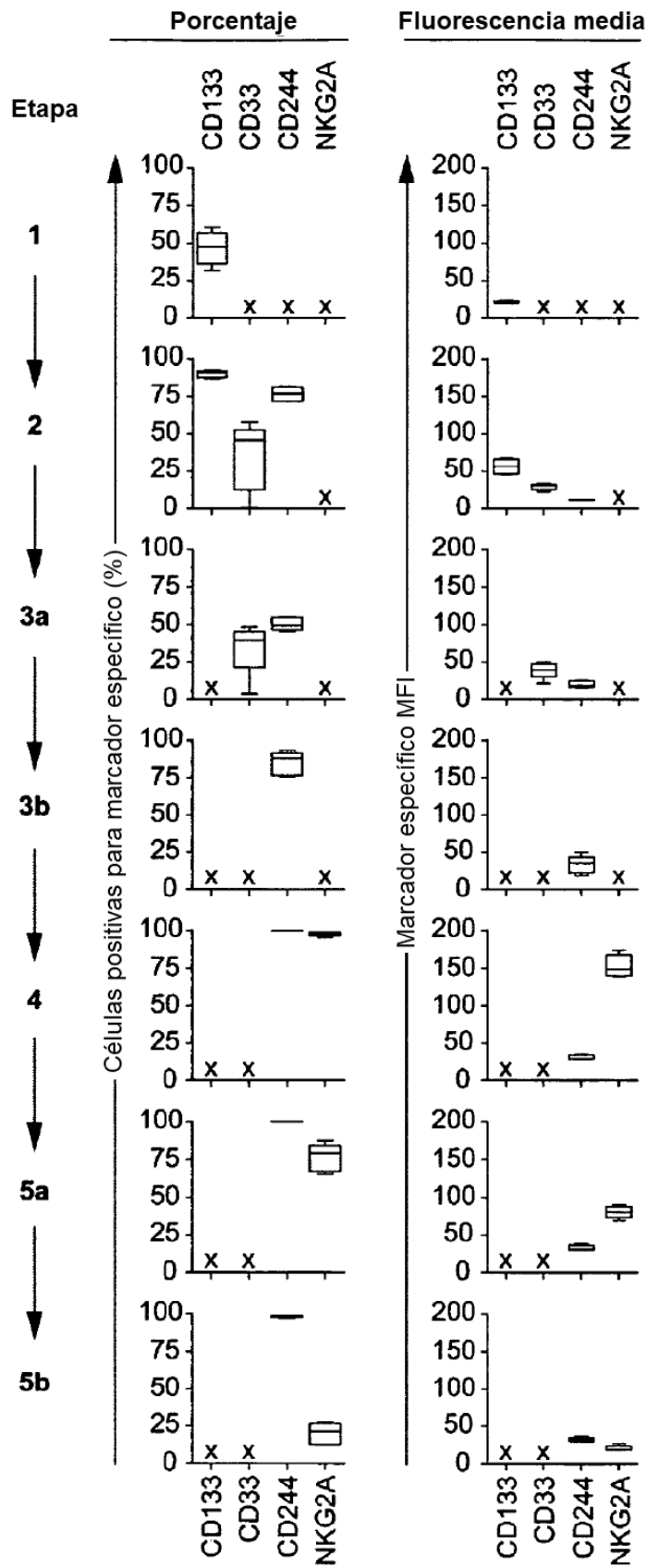


Fig. 10

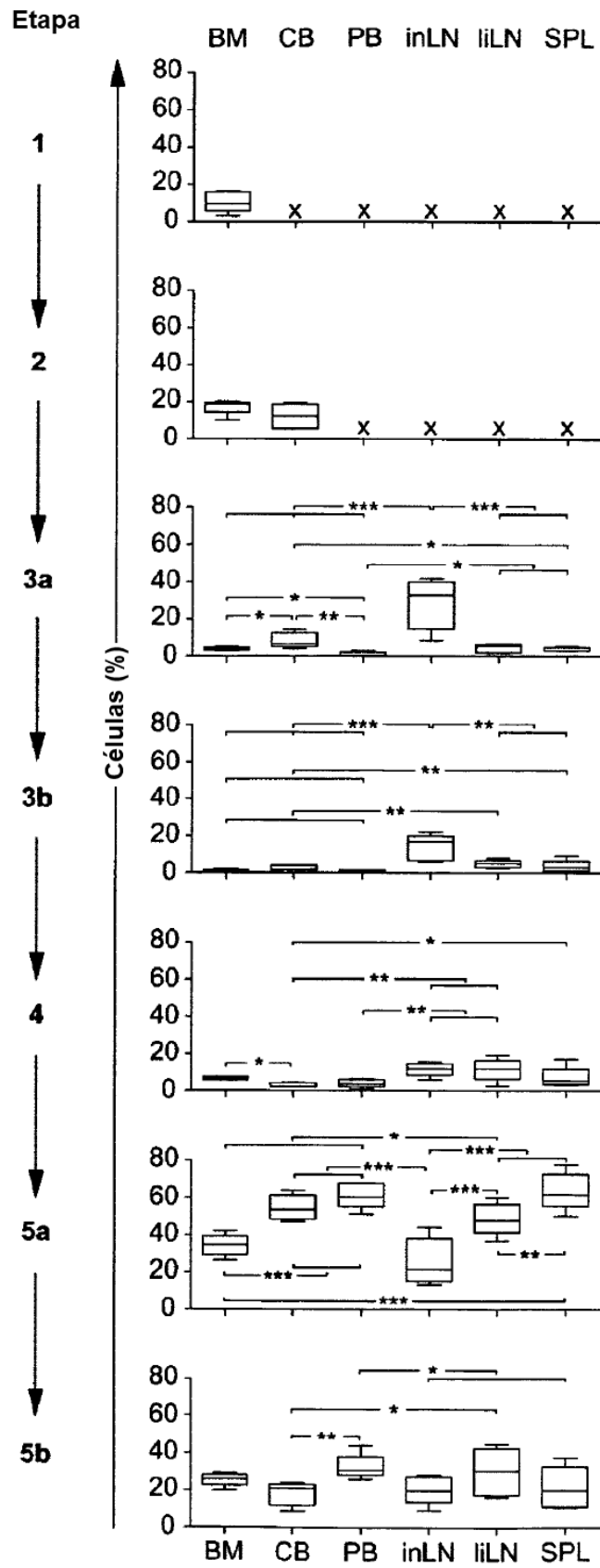


Fig. 11

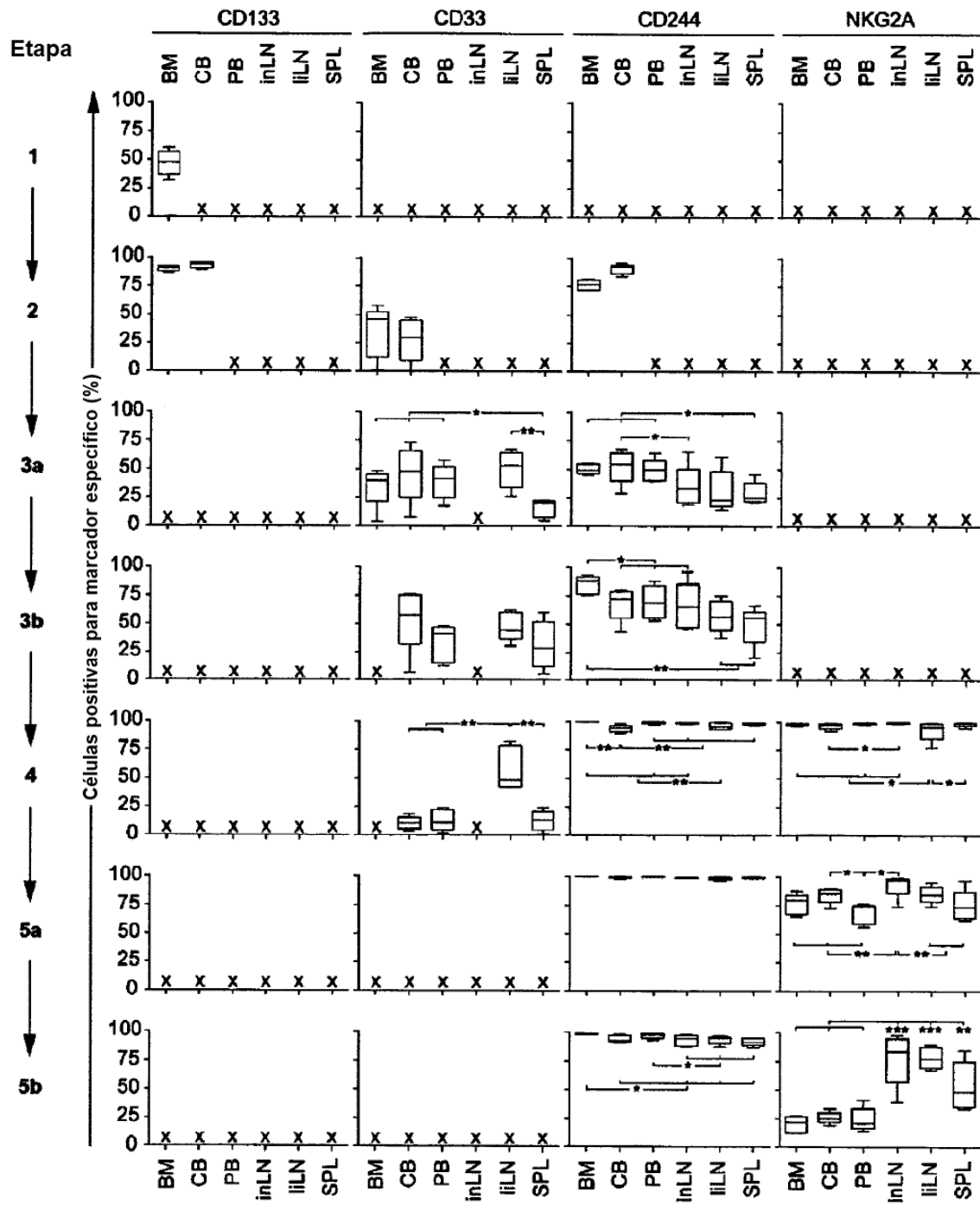


Fig. 12

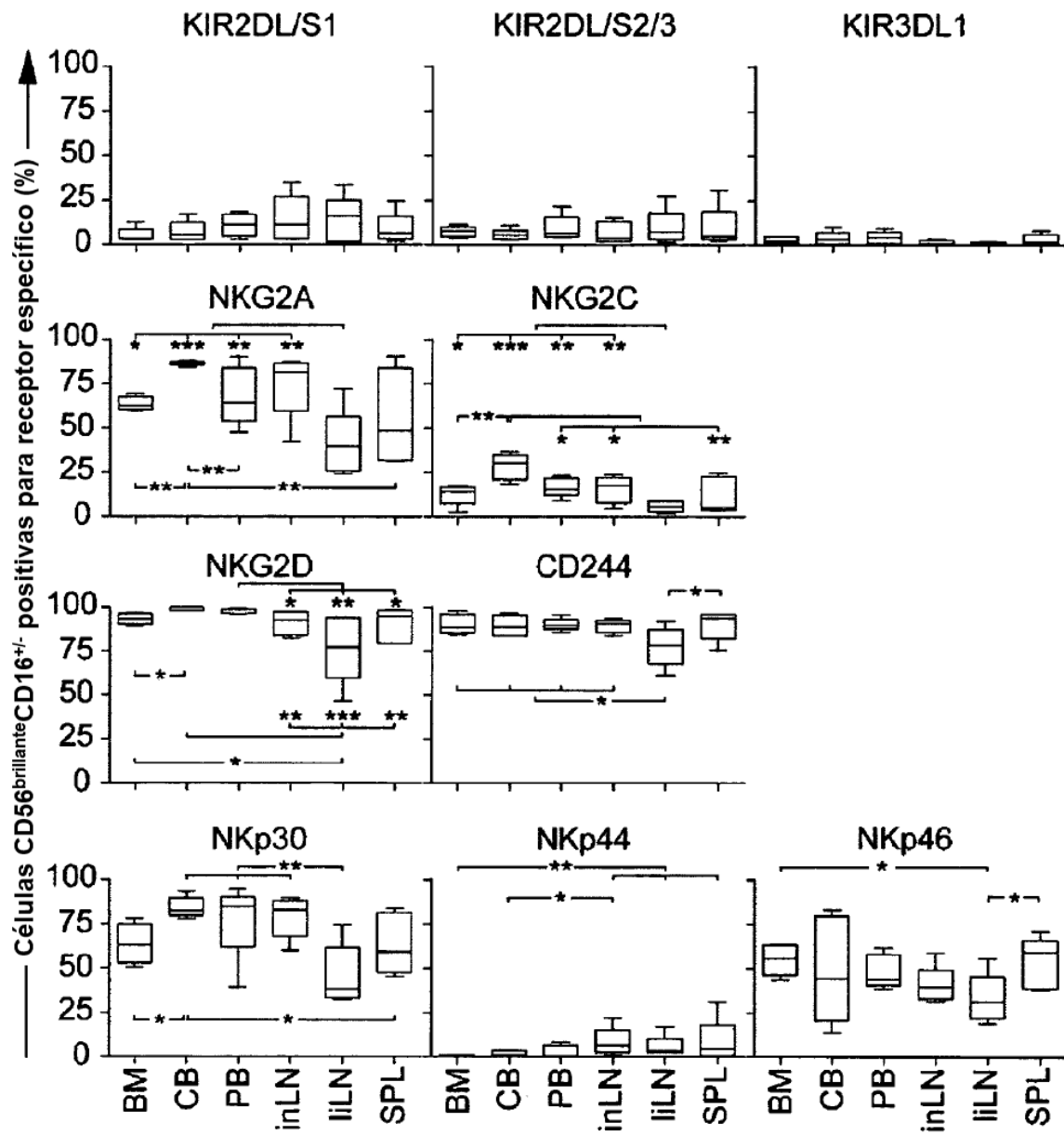


Fig. 13A

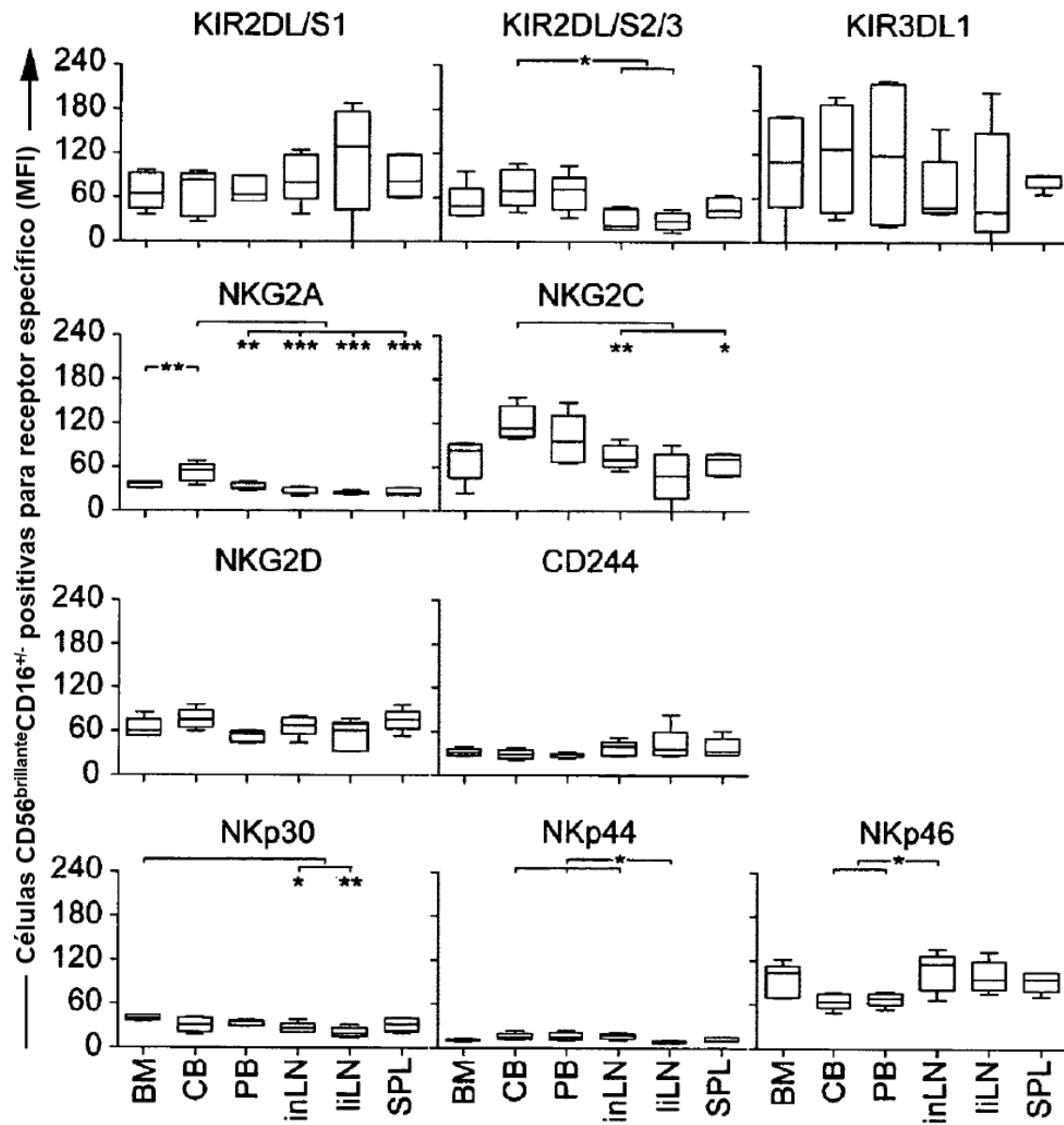


Fig. 13B

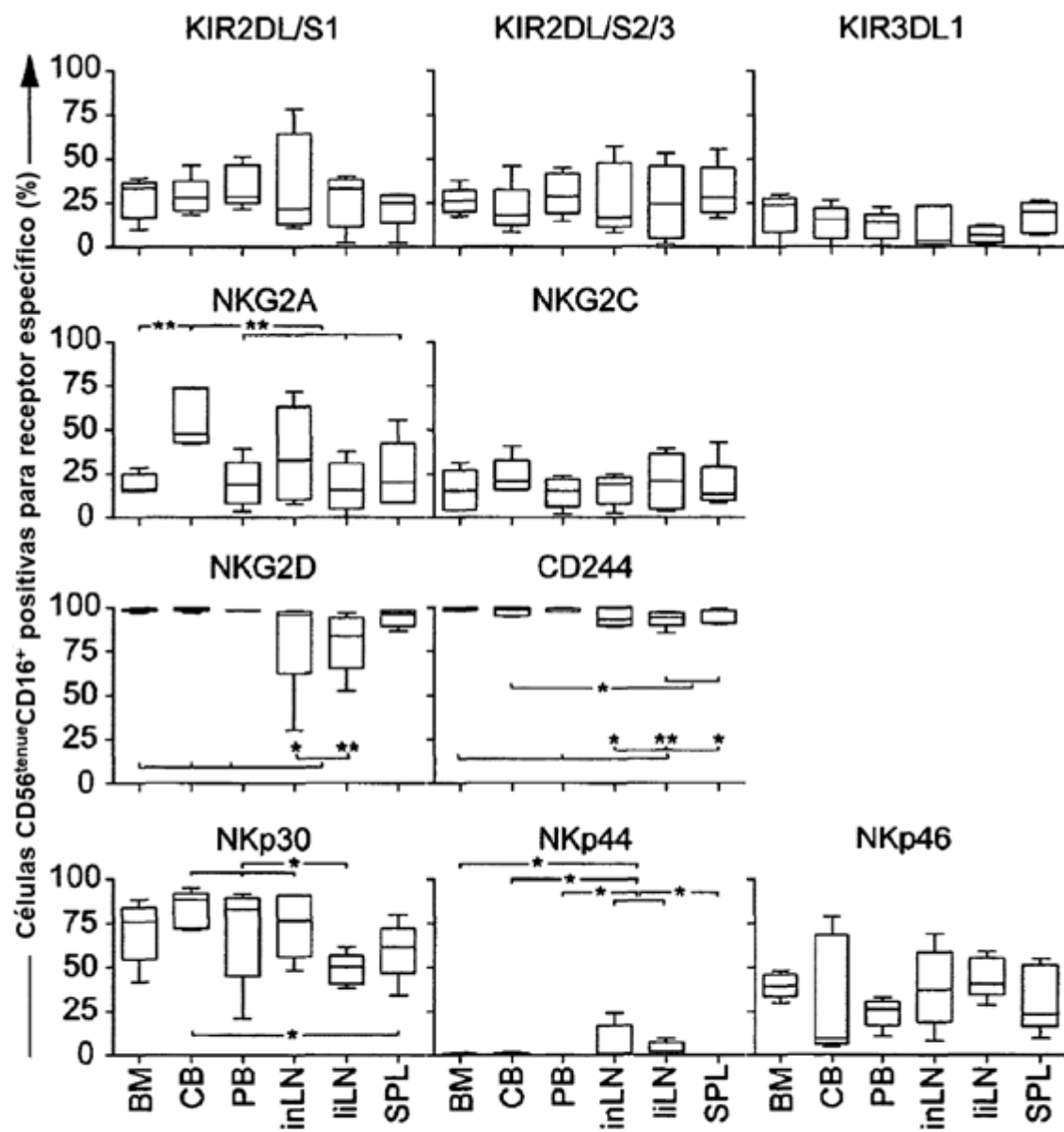


Fig. 14A

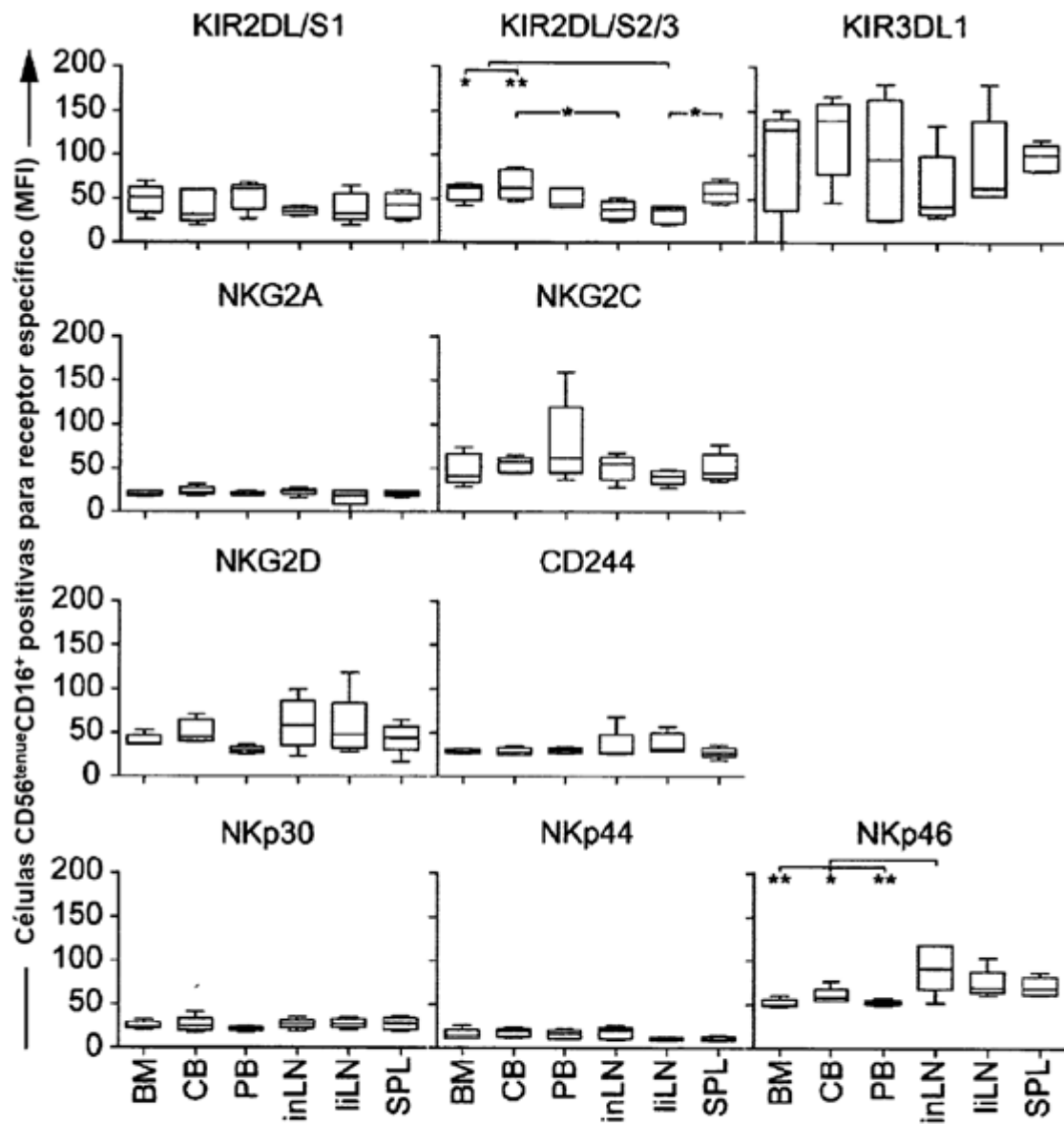


Fig. 14B

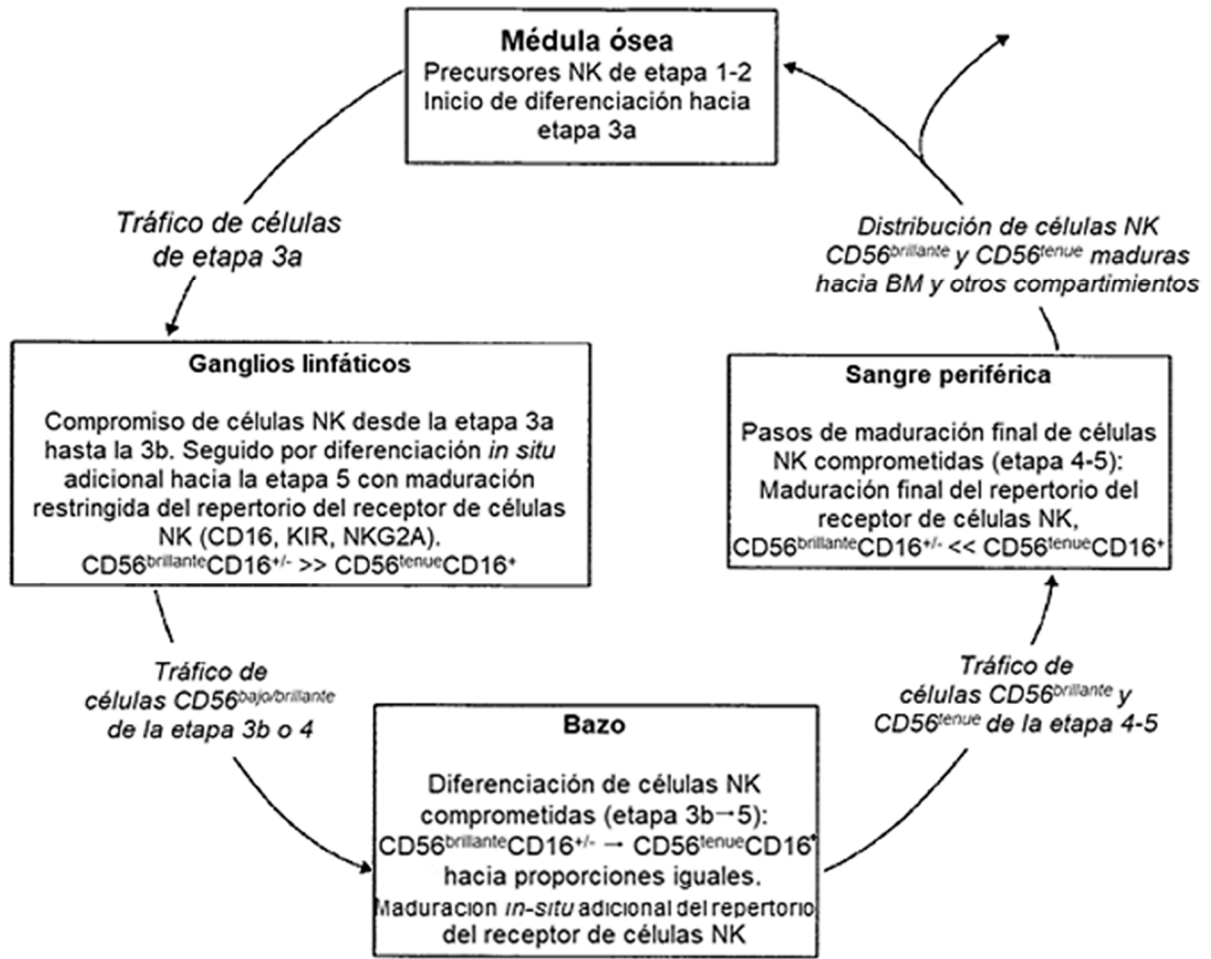


Fig. 15

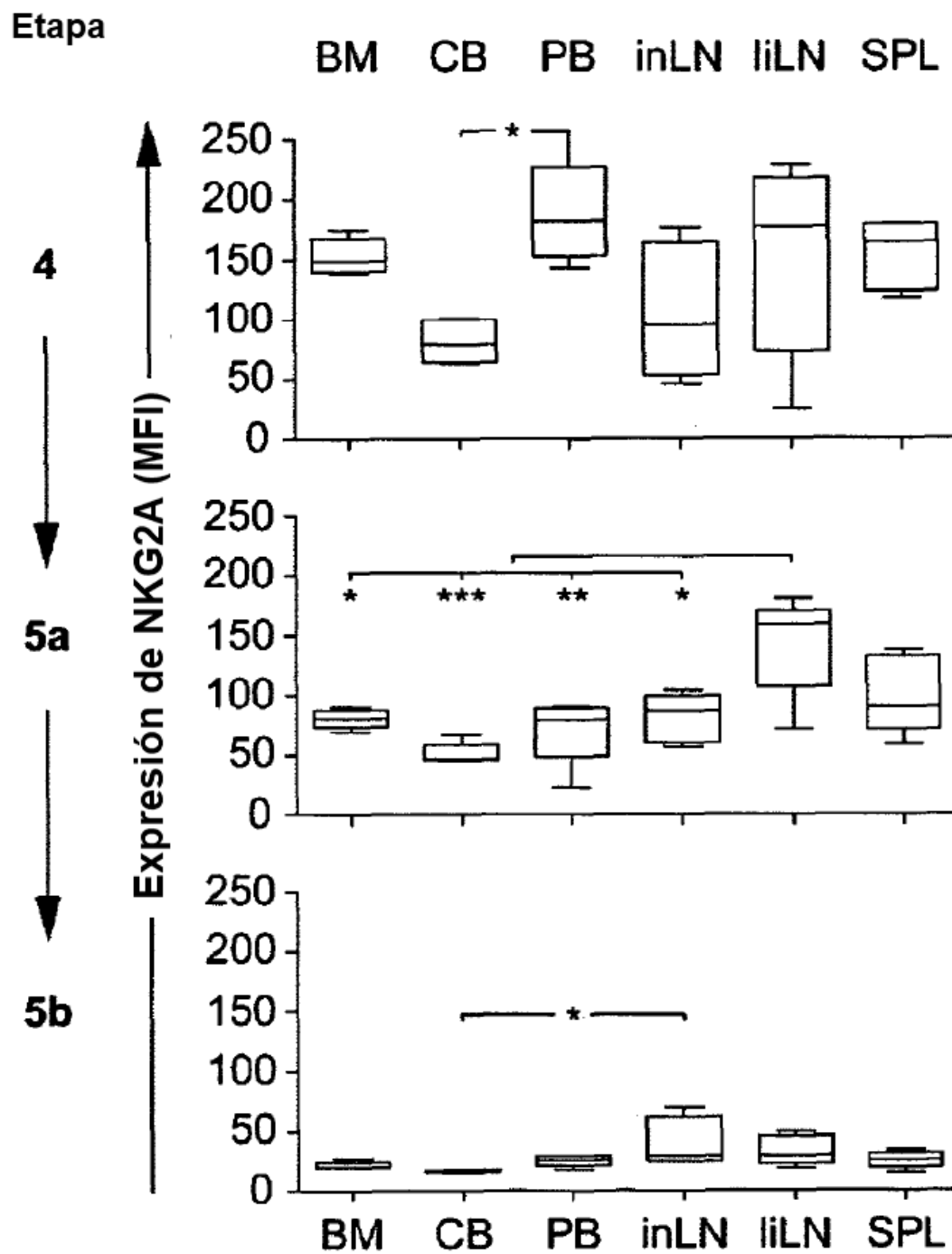


Fig. 16

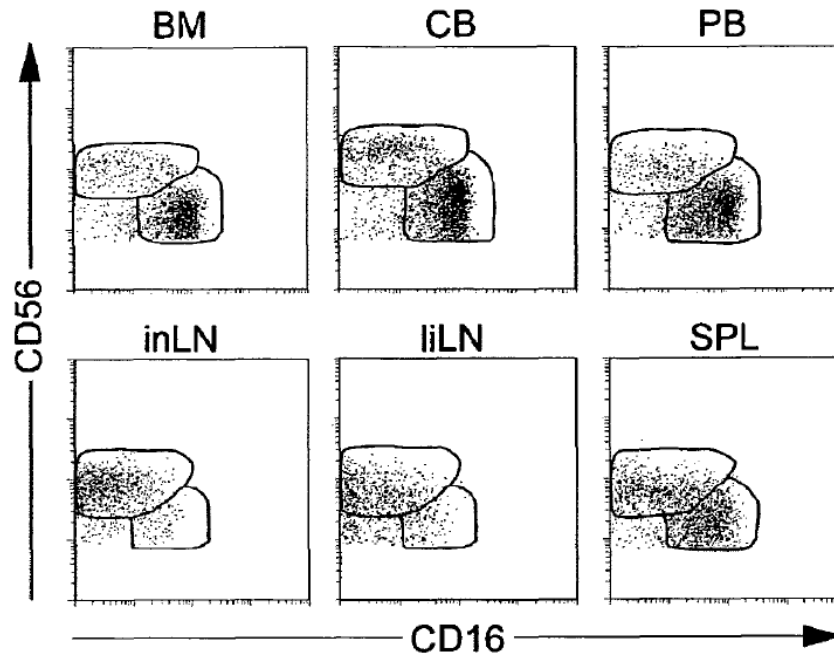


Fig. 17A

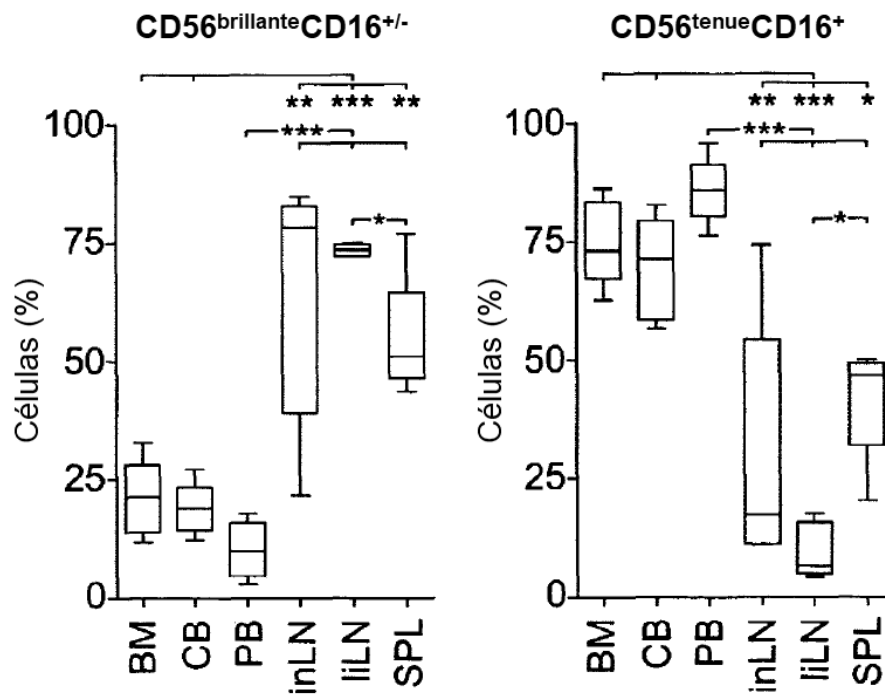


Fig. 17B

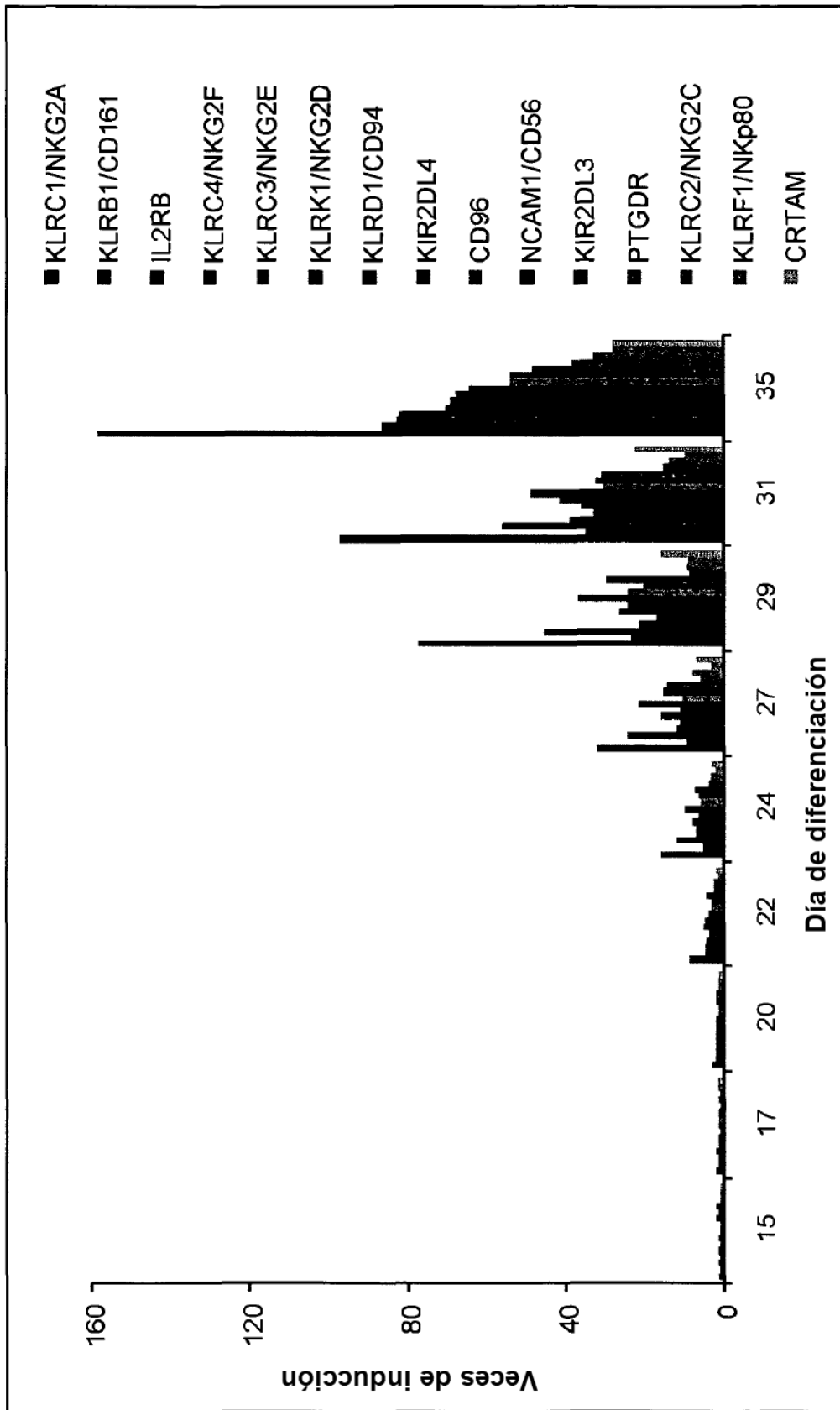


Fig. 18A

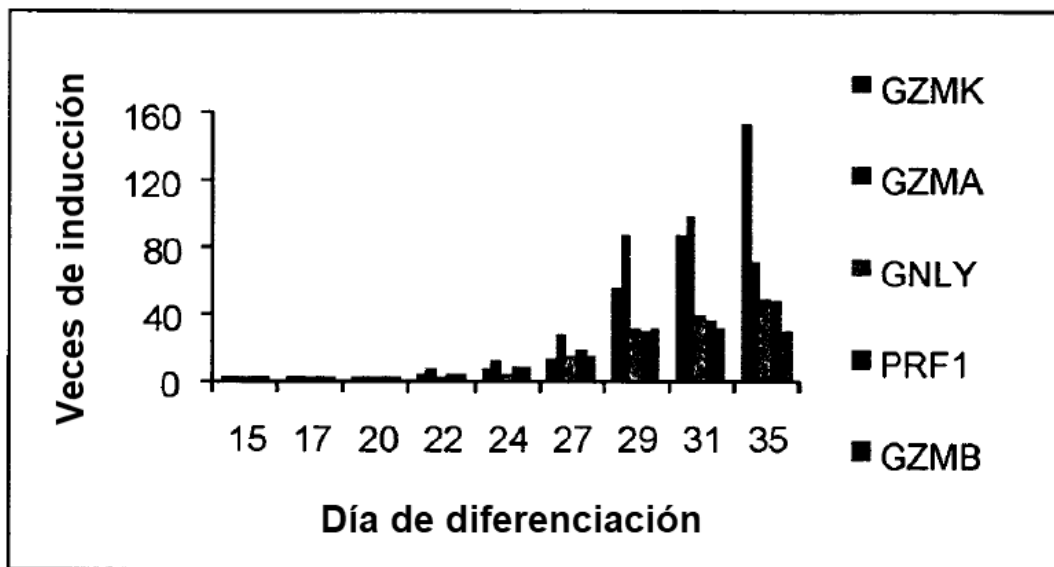


Fig. 18B

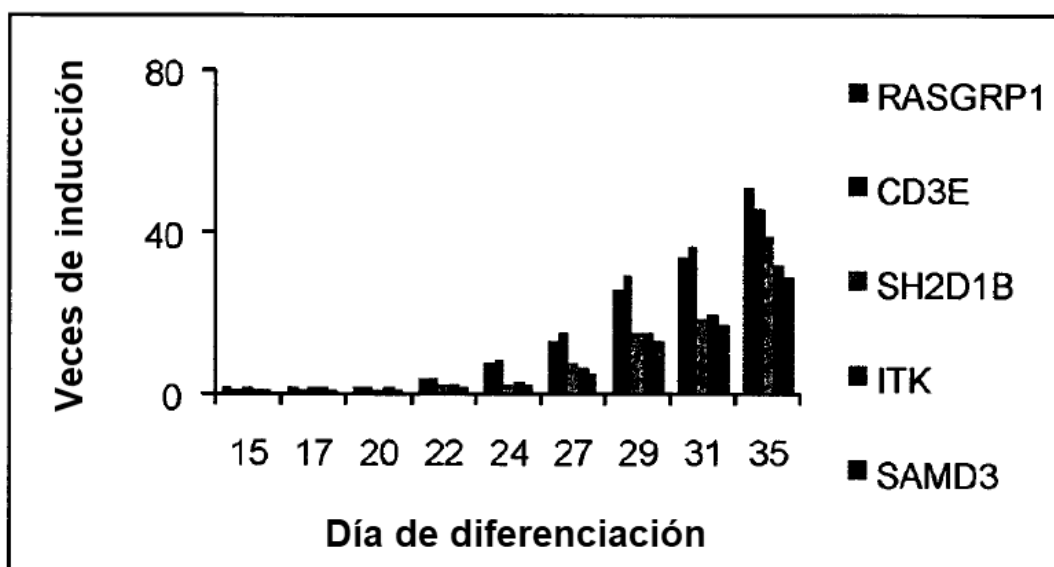


Fig. 18C

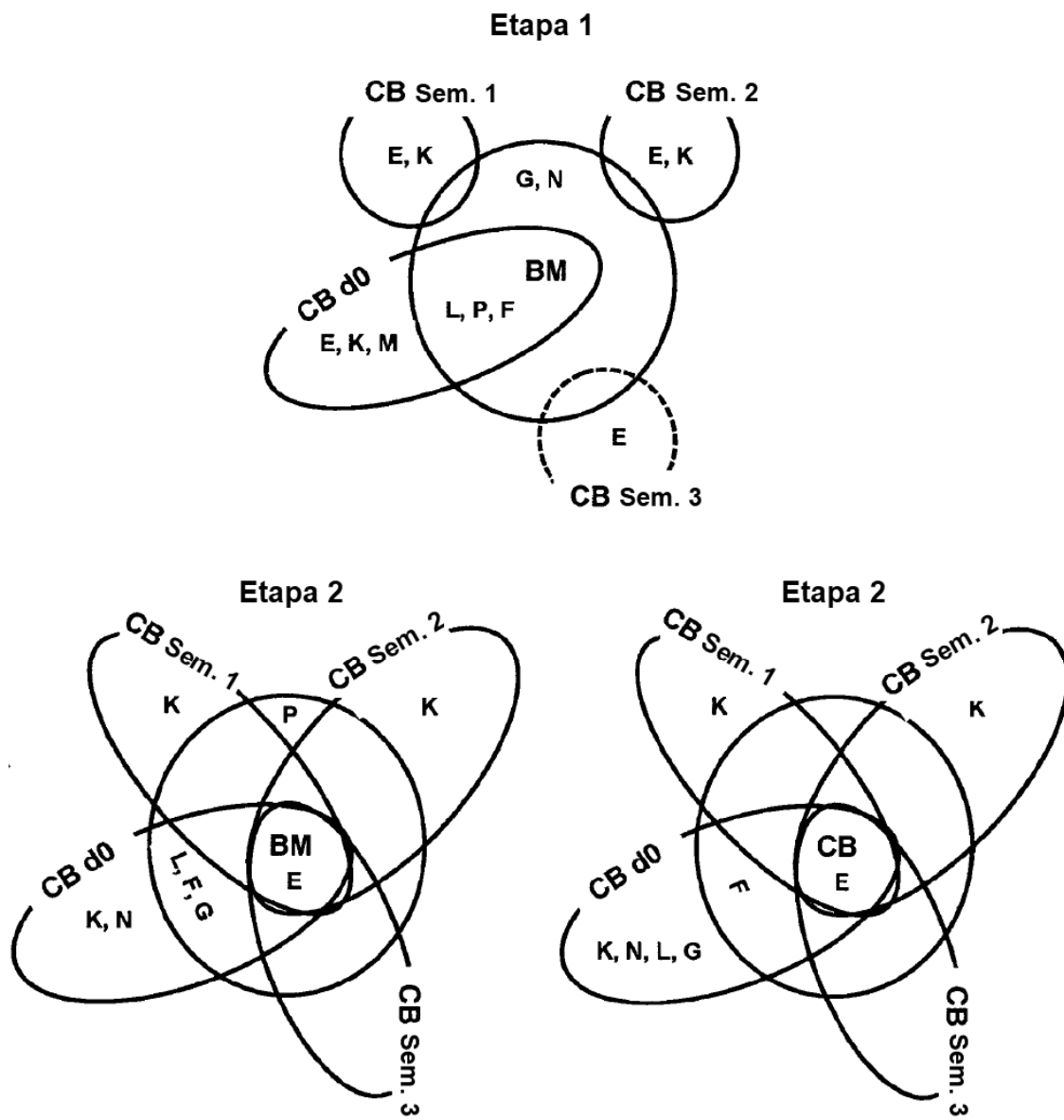


Fig. 19

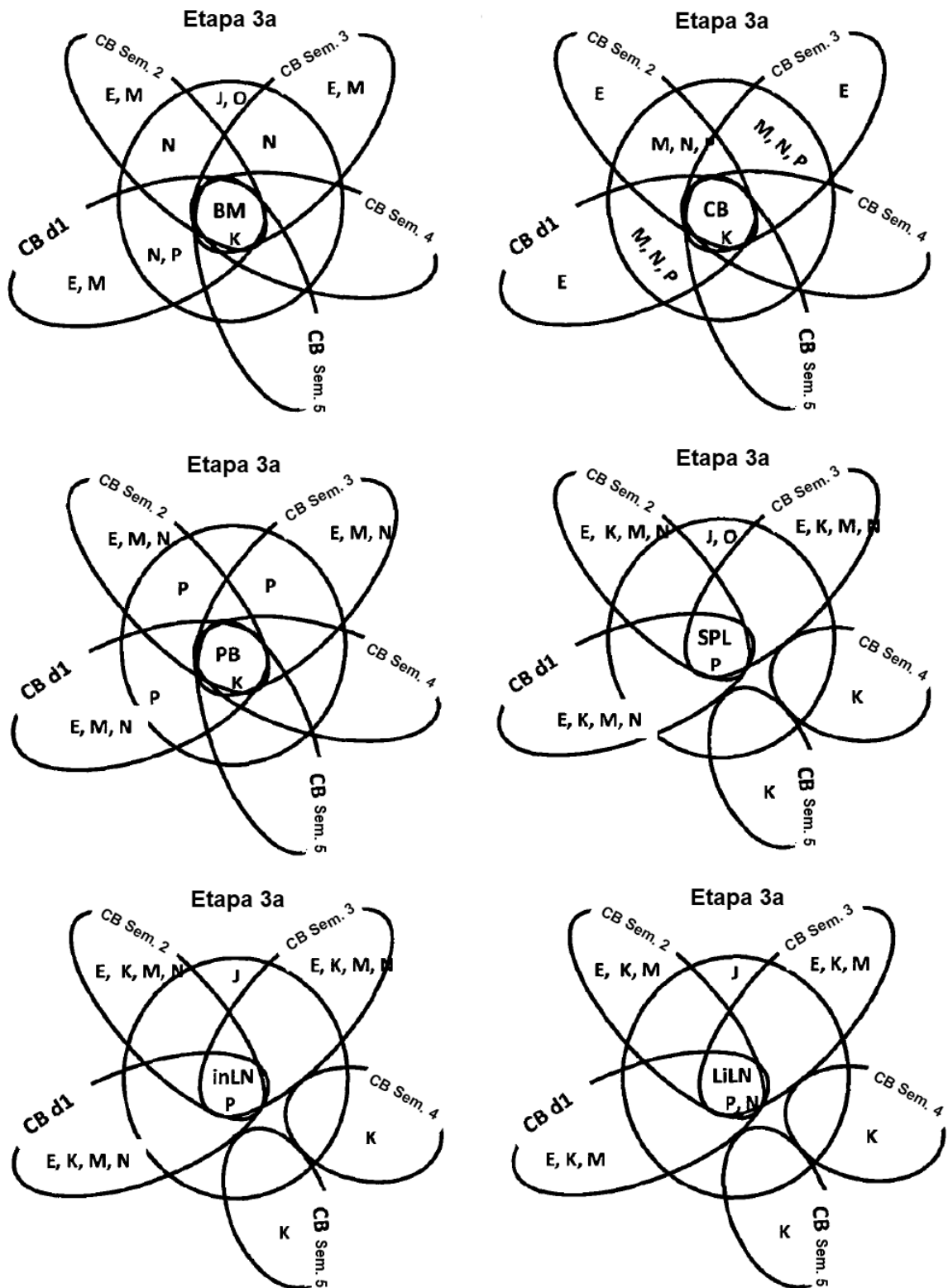


Fig. 20

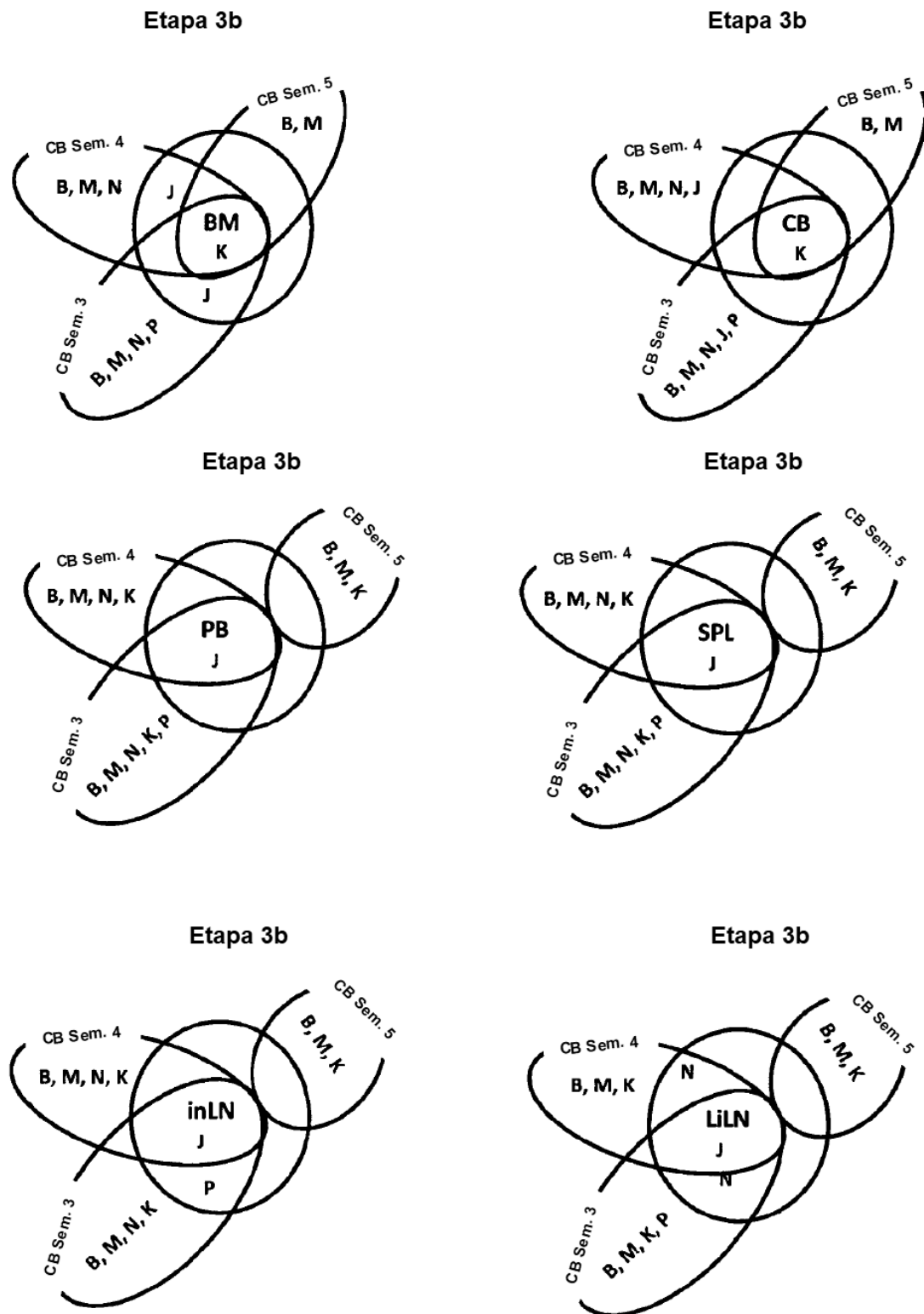


Fig. 21

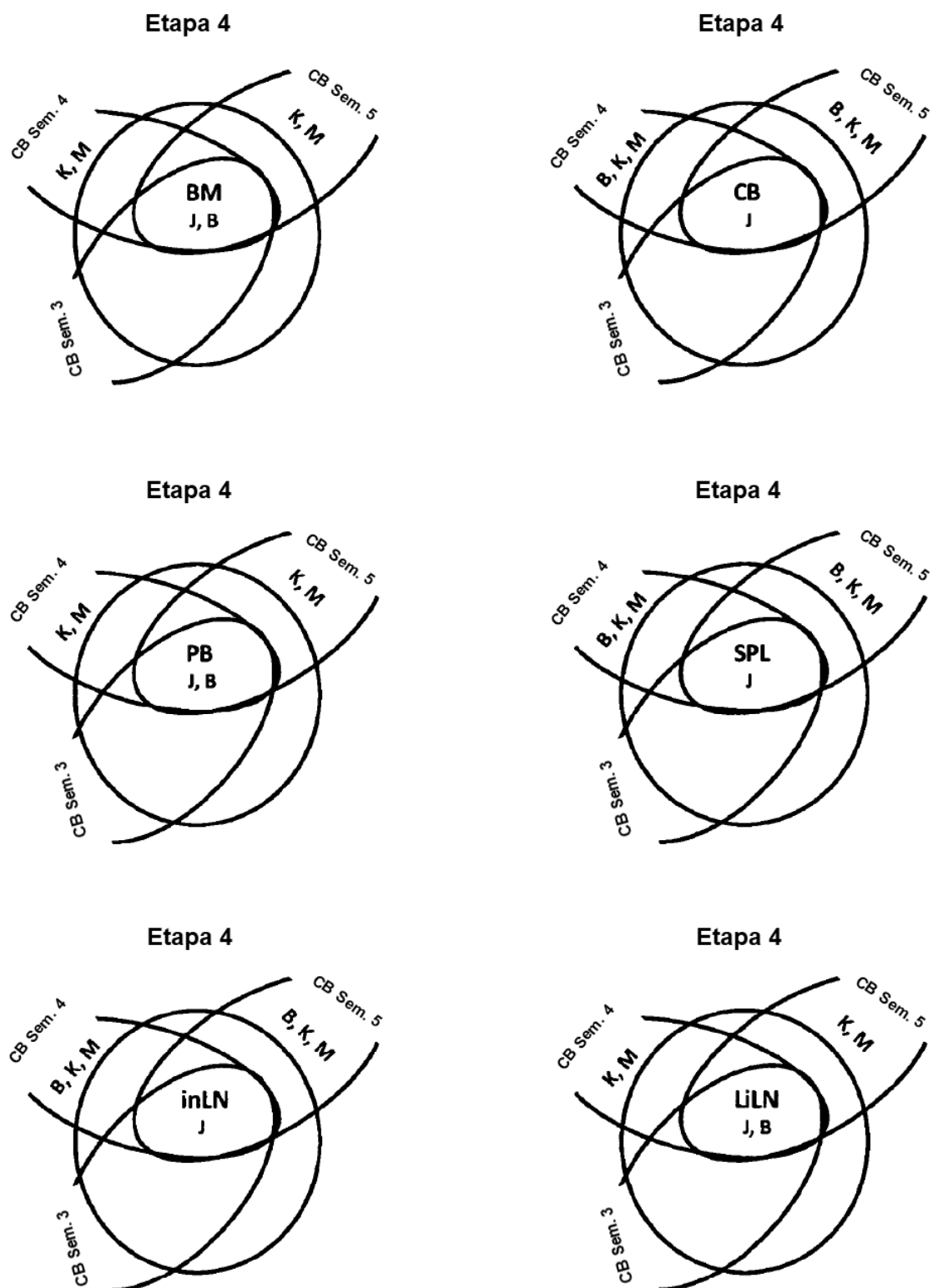


Fig. 22

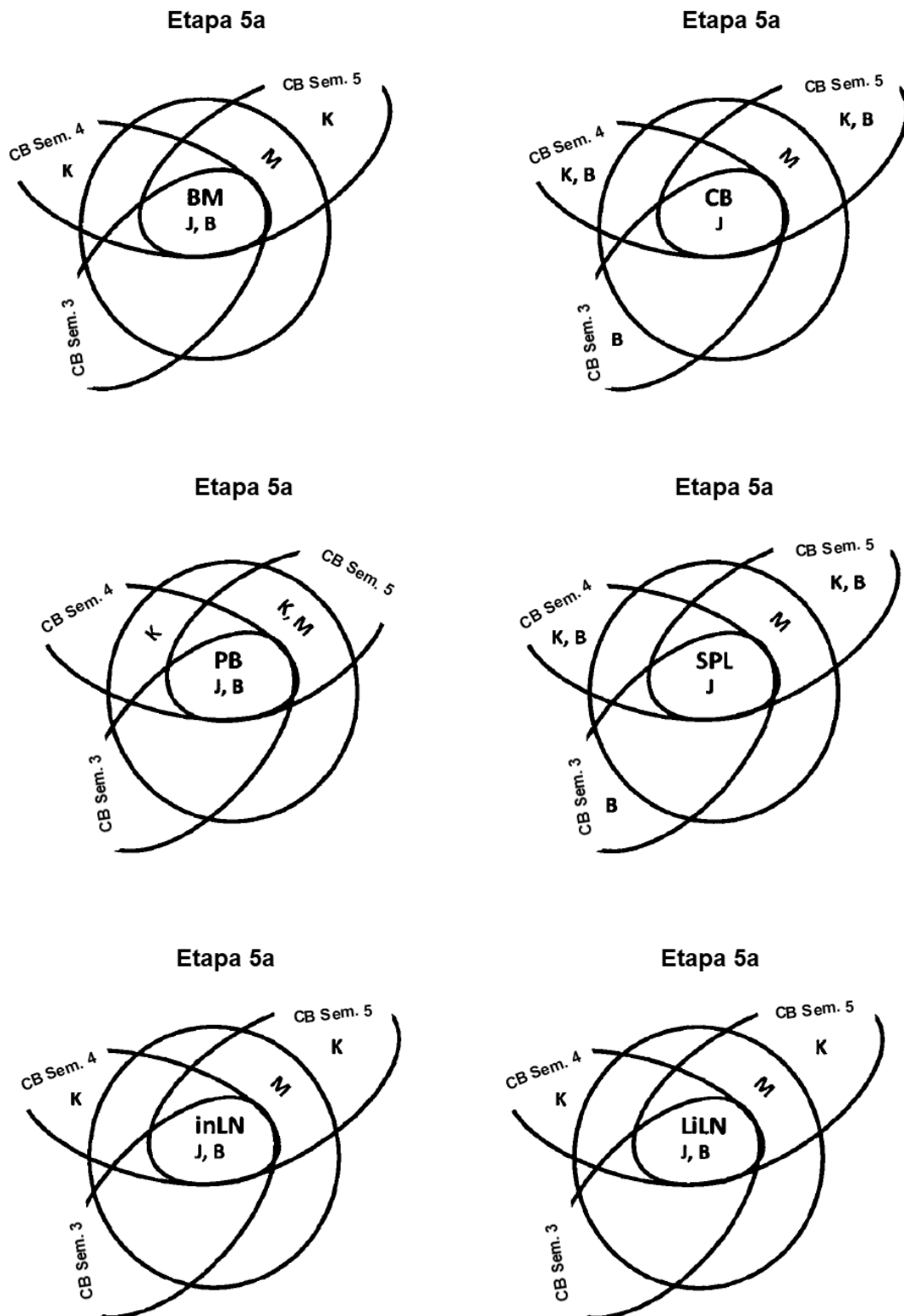


Fig. 23

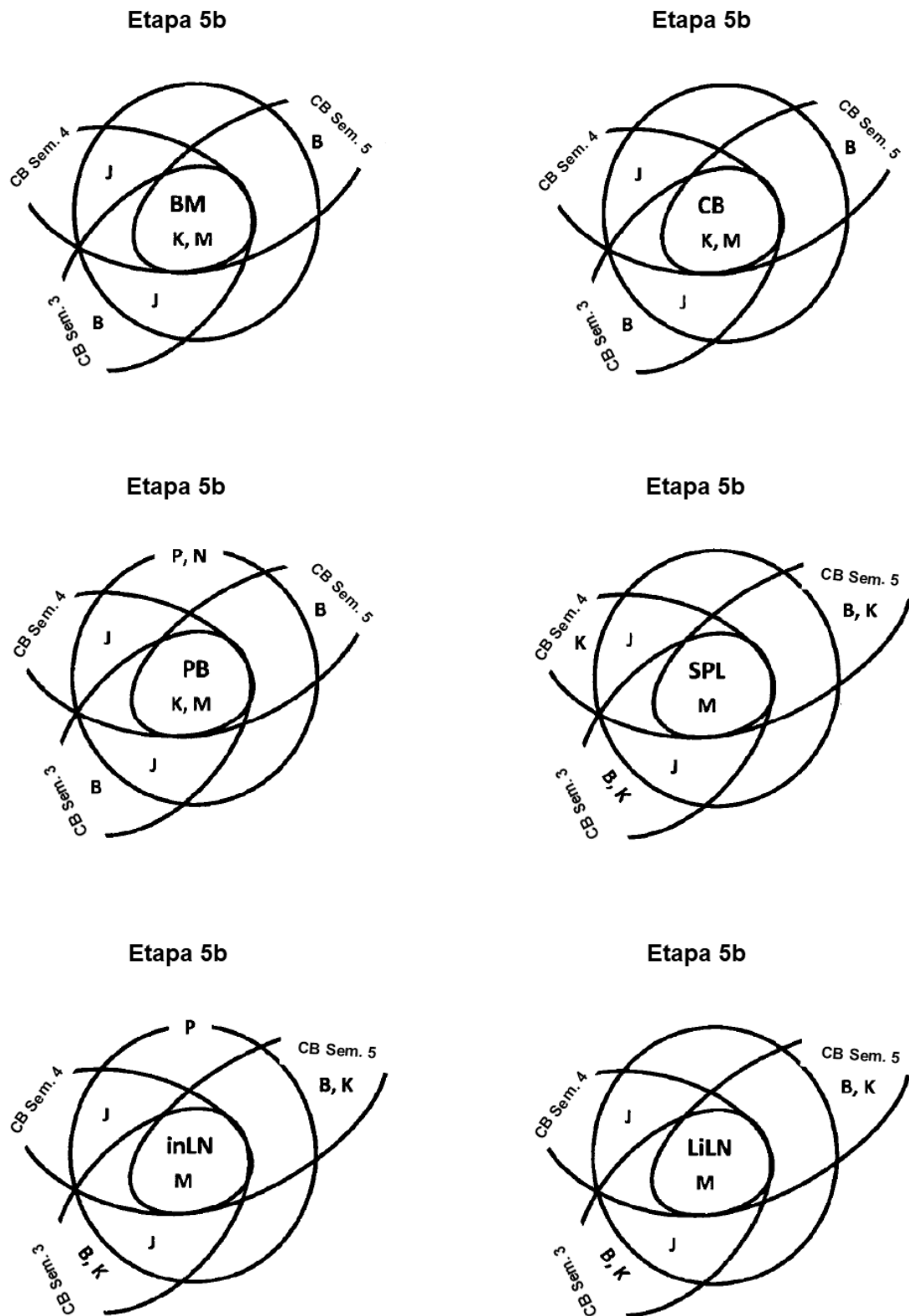


Fig. 24

Marcado de células NK

Primero determinamos las condiciones de marcado óptimas donde las células NK, resuspendidas en diferentes densidades celulares en PBS HCl 0.1 M pH 7.4, se incubaron con ^{111}In 10 MBq durante 15 min a temperatura ambiente

Mostramos que trabajar a alta densidad celular ($> 20 \times 10^6/\text{ml}$) no afecta la viabilidad de las células NK y permite una recuperación de ^{111}In $> 80\%$. La escalada del procedimiento de marcado con 100 millones de células NK conduce a resultados similares

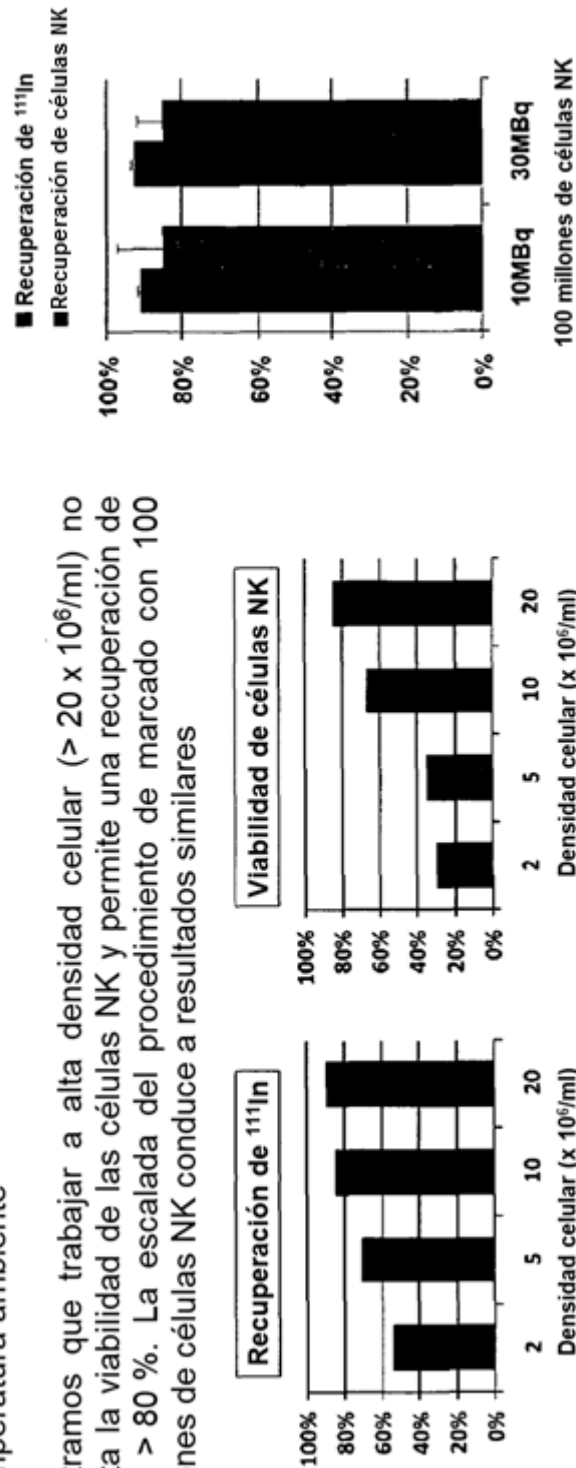


Fig. 25

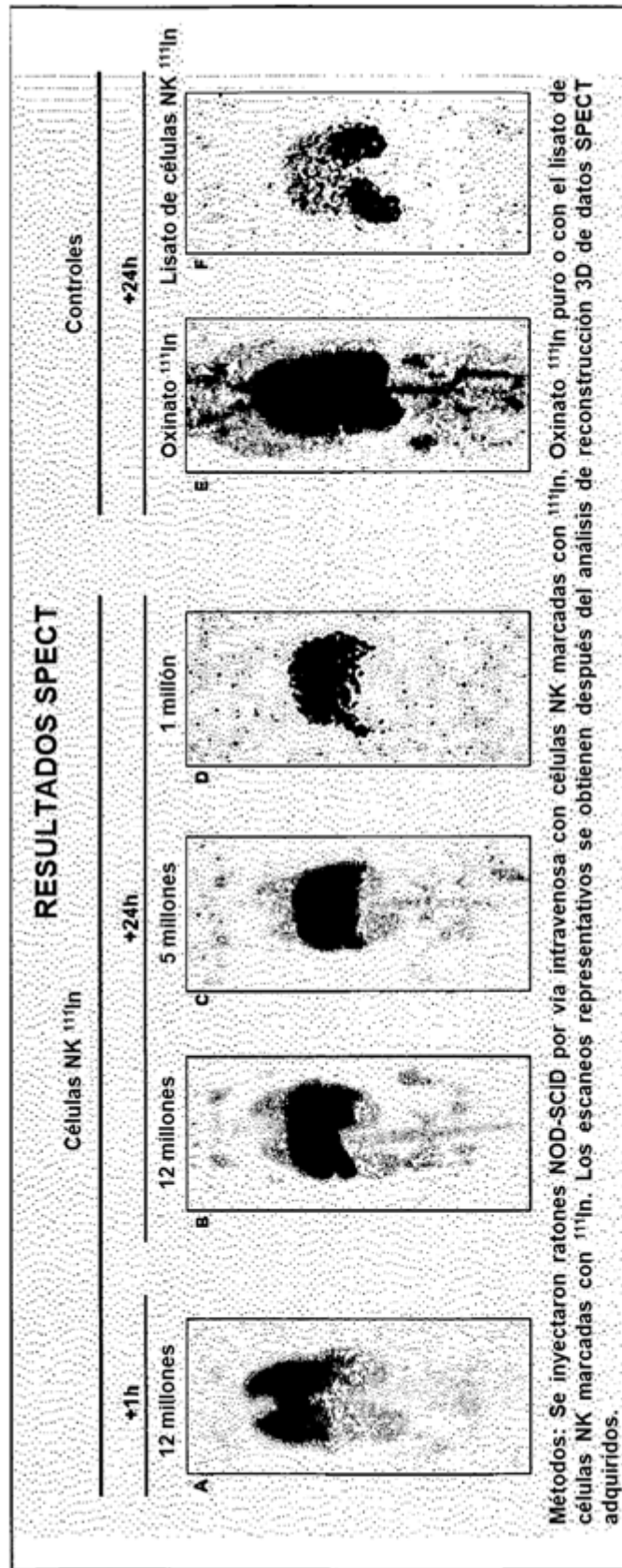


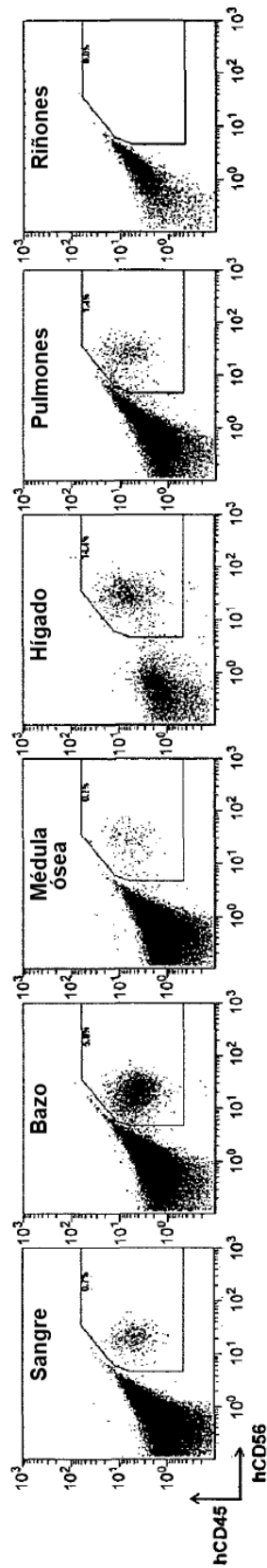
Fig. 26

Biodistribución de células NK ^{111}In y nivel de detección *in vivo*

La viabilidad de monitorización *in vivo* se investigó en ratones NOD-SCID infundidos con número en aumento de células NK marcadas con ^{111}In (1, 5 y 12×10^6 células) por vía intravenosa.

1) Mediante formación de imágenes de SPECT, se visualizó primero la señal específica a ^{111}In en los pulmones (1 h, escaneo A) y luego en el hígado, el bazo y la médula ósea de ratones inyectados (24 h, escaneos B-D). La presencia de células NK viables se confirmó adicionalmente mediante análisis FACS *ex vivo* de órganos visualizados.

Análisis FACS *ex vivo*



2) El análisis *ex vivo* de los órganos recolectados mostró que la biodistribución de células NK es altamente reproducible entre animales, independiente de las dosis inyectada de células NK, con 2.7 0.6 % y 66.4 2.5 % de la actividad total encontrada en el bazo e hígado respectivamente.

3) La señal específica a ^{111}In aún se visualizó en la dosis inferior de células NK infundidas (1 millón, escaneo D). Bajo estas condiciones de marcado específicas, la señal encontrada en el bazo, donde las células están en proximidad cercana, corresponde a 0.03 MBq, lo que indica el nivel de detección de la formación de imágenes de SPECT.

Fig. 27