

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 876 938**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2016 E 18194107 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3434762**

(54) Título: **Células asesinas naturales modificadas y líneas de células asesinas naturales que tienen mayor citotoxicidad**

(30) Prioridad:

29.07.2015 EP 15178899
02.03.2016 GB 201603655
31.03.2016 GB 201605457
10.06.2016 GB 201610164

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2021

(73) Titular/es:

ONK THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
C/O Coll & Company, Pier Road, Barna Village
Co. Galway H91 V6KV, IE

(72) Inventor/es:

O'DWYER, MICHAEL EAMON PETER

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 876 938 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

Células asesinas naturales modificadas y líneas de células asesinas naturales que tienen mayor citotoxicidad

5 **Introducción**

[0001] La presente invención se refiere a la modificación de células asesinas naturales (NK) y líneas de células NK para producir derivados de las mismas con un fenotipo más citotóxico. Además, la presente invención se refiere a 10 métodos de producir células NK y líneas de células NK, composiciones que contienen las células y líneas de células y usos de tales composiciones en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención.

[0002] Normalmente, las células inmunes requieren que una célula diana presente antígeno a través del complejo 15 principal de histocompatibilidad (MHC) antes de desencadenar una respuesta inmune que resulte en la muerte de la célula diana. Esto permite que las células cancerosas que no presentan MHC de clase I evadan la mayoría de las respuestas inmunitarias.

[0003] Sin embargo, las células NK son capaces de reconocer células cancerosas en ausencia de expresión de 20 clase I de MHC. Por lo tanto, desempeñan un papel crítico en la defensa del cuerpo contra el cáncer.

[0004] Por otra parte, en ciertas circunstancias, las células cancerosas demuestran una capacidad para amortiguar 25 la actividad citotóxica de las células NK, a través de la expresión de ligandos que se unen a receptores inhibidores en la membrana de las células NK. La resistencia al cáncer puede implicar un equilibrio entre estos y otros factores.

[0005] La citotoxicidad, en este contexto, se refiere a la capacidad de las células efectoras inmunes, por ejemplo, las 30 células NK, para inducir la muerte de las células cancerosas, por ejemplo, liberando compuestos citolíticos o uniendo los receptores a las membranas de las células cancerosas e induciendo la apoptosis de dichas células cancerosas. La citotoxicidad se ve afectada no solo por las señales que inducen la liberación de compuestos citolíticos, sino también por las señales que inhiben su liberación. Por lo tanto, un aumento en la citotoxicidad conducirá a una destrucción más eficiente de las células cancerosas, con menos posibilidades de que las células cancerosas humedezcan la actividad citotóxica de la NK, como se mencionó anteriormente.

[0006] Se ha sugerido la modificación genética para eliminar la función del receptor inhibitorio en las células NK 35 como un método para aumentar la citotoxicidad de las células NK contra las células cancerosas que carecen de la expresión de clase I del MHC pero que son capaces de reducir la citotoxicidad NK (Bodduluru et al. 2012). NKG2A se ha establecido como un receptor inhibidor que vale la pena silenciar en estas circunstancias, ya que se sabe que ciertas células cancerosas expresan MICA que se une a NKG2A e inhibe la citotoxicidad de las células NK en ausencia de expresión de MHC de clase I (Shook et al. 2011; WO 2006/023148).

[0007] Otro método para regular a la baja la expresión de NKG2A se ha demostrado en las células NK-92, en las 40 que se demostró que la transfección con un gen que codifica IL-15 está asociada con una reducción en la expresión de NKG2A (Zhang et al. 2004). Sin embargo, a pesar de un aumento observado en la citotoxicidad de las células NK, el aumento probablemente fue el resultado de un aumento concomitante en la expresión del receptor activador NKG2D. Esto se apoya en la observación de que el bloqueo de los receptores NKG2A en las células NK-92 no se 45 asoció con un aumento de la citotoxicidad contra las células de mieloma múltiple (Heidenreich et al. 2012). Sin embargo, vale la pena señalar que la línea celular NK-92 es una línea celular altamente citotóxica con una expresión muy baja de receptores inhibidores. Por lo tanto, cualquier aumento en la citotoxicidad asociada con la disminución de la expresión de NKG2A podría haber sido demasiado trivial para detectar.

[0008] Se han realizado estudios similares en ratones. Por ejemplo, los ratones expresan un receptor llamado Ly49 50 en las células NK, que es análogo a los receptores KIR inhibidores humanos. Se ha demostrado que al bloquear el receptor Ly49 con fragmentos de anticuerpos, las células NK son más citotóxicas y pueden matar células de leucemia murina *in vitro* e *in vivo* (Koh et al. 2001).

[0009] Es una consecuencia de la reducción de la función del receptor inhibitorio, sin embargo, las células "normales" en el cuerpo también se vuelven más susceptibles al ataque de las células NK modificadas, ya que las 55 células NK modificadas se vuelven menos capaces de distinguir entre las células "normales" y células cancerígenas. Esta es una desventaja significativa de reducir la función del receptor inhibitorio "clásico".

[0010] Otra forma en la que se sabe que las células NK matan las células cancerosas es mediante la expresión de TRAIL en su superficie. El ligando TRAIL es capaz de unirse a los receptores TRAIL en las células cancerosas e 60 inducir la apoptosis de dichas células cancerosas. Un enfoque especulativo describe la sobreexpresión de TRAIL en células NK para aprovechar este mecanismo anticancerígeno (EP1621550). Además, se ha informado que IL-12 regula al alza la expresión de TRAIL en células NK (Smyth et al. 2001). Aunque, las propias células NK expresan 65 receptores TRAIL y, por lo tanto, son una diana potencial para la muerte mediada por TRAIL (Mirandola et al. 2004).

Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado mecanismos evasivos y protectores para hacer frente a las células NK que expresan TRAIL. Los receptores señuelo TRAIL a menudo se expresan en las membranas de las células cancerosas y la unión de TRAIL a estos receptores señuelo no pueden inducir la apoptosis; aun no se han desarrollado los métodos para superar tales mecanismos.

5 [0011] La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia maligna hematopoyética que involucra células precursoras comprometidas con el desarrollo mieloide y representa una proporción significativa de leucemias agudas tanto en adultos (90%) como en niños (15-20%) (Hurwitz, Mounce et al. 1995; Lowenberg, Downing et al. 1999). A pesar de que el 80% de los pacientes lograron la remisión con quimioterapia estándar (Hurwitz, Mounce et al. 1995; Ribeiro, Razzouk et al. 2005), la supervivencia sigue siendo insatisfactoria debido a las altas tasas de recaída de la enfermedad residual mínima (MRD). Los cinco años de supervivencia dependen de la edad; 60% en niños (Rubnitz 2012), 40% en adultos menores de 65 años (Lowenberg, Downing et al. 1999) y 10% en adultos mayores de 65 años (Ferrara y Schiffer 2013). Estos resultados pueden mejorarse si los pacientes tienen un donante de células hematopoyéticas adecuado, pero muchos no, destacando la necesidad de un enfoque alternativo al tratamiento.

10 20 25 [0012] Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos citotóxicos, con fenotipos distintos y funciones efectoras que difieren de, por ejemplo, células T asesinas naturales (NK-T). Por ejemplo, mientras que las células NK-T expresan receptores de antígeno tanto de CD3 como de células T (TCR), las células NK no lo hacen. En general, se encuentra que las células NK expresan los marcadores CD16 y CD56, en donde CD16 funciona como un receptor de Fc y media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) que se discute más adelante. KHYG-1 es una notable excepción en este sentido. A pesar de que las células NK son naturalmente citotóxicas, se han desarrollado líneas de células NK con mayor citotoxicidad. NK-92 y KHYG-1 representan dos líneas de células NK que se han investigado exhaustivamente y son prometedoras en la terapéutica del cáncer (Swift et al. 2011; Swift et al. 2012).

30 35 40 45 [0013] La inmunoterapia celular adoptiva para uso en el tratamiento del cáncer comúnmente implica la administración de células T naturales y modificadas a un paciente. Las células T pueden modificarse de varias maneras, por ejemplo, genéticamente, para expresar receptores y/o ligandos que se unen específicamente a ciertas células cancerosas diana. La transfección de células T con receptores de células T de alta afinidad (TCR) y receptores de antígenos químéricos (CAR), específicos para antígenos de células cancerosas, puede dar lugar a respuestas de células T específicas de cáncer altamente reactivas. Una limitación importante de este enfoque inmunoterapéutico es que las células T deben obtenerse del paciente para la expansión ex vivo autóloga o deben usarse células T compatibles con MHC para evitar la erradicación inmunológica inmediatamente después de la transferencia de las células al paciente o, en algunos casos, el inicio de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Además, las células T transferidas con éxito a menudo sobreviven durante períodos prolongados de tiempo en la circulación, lo que dificulta el control de los efectos secundarios persistentes que resultan del tratamiento.

50 55 60 65 [0014] En el trasplante de haplotipos, se cree que el efecto de injerto contra leucemia está mediado por las células NK cuando existe una falta de coincidencia del receptor-ligando inhibidor de KIR, lo que puede conducir a una mejor supervivencia en el tratamiento de la LMA (Ruggeri, Capanni et al. 2002; Ruggeri, Mancusi et al. 2005). Además, la recuperación rápida de NK se asocia con un mejor resultado y un efecto más fuerte de injerto contra leucemia (GVL) en pacientes que se someten a un trasplante de células hematopoyéticas (HCT) con haplotipo T deplegado en la LMA (Savani, Mielke et al. 2007). Otros ensayos han usado células NK haploidénticas expandidas ex vivo para tratar la LMA en adultos (Miller, Soignier et al. 2005) y niños (Rubnitz, Inaba et al. 2010).

70 75 80 85 [0015] Se han establecido varias líneas de células NK permanentes, y la más notable es NK-92, derivada de un paciente con linfoma no Hodgkin que expresa marcadores de células NK típicos, con la excepción de CD16 (receptor gamma III de Fc). NK-92 ha sido sometido a extensas pruebas preclínicas y muestra una lisis superior contra una amplia gama de tumores en comparación con las células NK activadas y las células asesinas activadas por linfocinas (LAK) (Gong, Maki et al. 1994). Se ha establecido la citotoxicidad de las células NK-92 contra la LMA primaria (Yan, Steinherz et al. 1998).

90 95 [0016] Otra línea de células NK, KHYG-1, ha sido identificada como un potencial contendiente para uso clínico (Suck et al. 2005) pero ha reducido la citotoxicidad, por lo que ha recibido menos atención que NK-92. Se sabe que las células KHYG-1 son pre-activadas. A diferencia de las células NK endógenas, las células KHYG-1 están polarizadas en todo momento, lo que aumenta su citotoxicidad y las hace más rápidas para responder a los estímulos externos. Las células NK-92 tienen una citotoxicidad inicial más alta que las células KHYG-1,

[0017] Por lo tanto, está claro que los protocolos actuales de inmunoterapia adoptiva se ven afectados por la variabilidad del donante en la cantidad y calidad de las células efectoras, variables que podrían eliminarse si las líneas celulares efectivas estuvieran disponibles para proporcionar una terapia más estandarizada.

[0018] Se ha realizado una cantidad considerable de investigación sobre la citotoxicidad de las células NK utilizando modelos de ratón. Un ejemplo es el hallazgo de que el ARNm de la perforina y la granzima B se transcriben constitutivamente en células NK de ratón, pero se detectan niveles mínimos de proteína hasta la estimulación o

activación de las células NK (Fehniger et al, 2007). Si bien este trabajo y otro trabajo con células NK de ratón son interesantes, no se puede confiar en ellos como evidencia concluyente de la citotoxicidad de las células NK en humanos. En contraste con el ejemplo anterior, las células NK humanas expresan altos niveles de perforina y proteína granzima B antes de la estimulación (Leong et al, 2011). El resultado es que cuando el ratón o las células NK humanas están recién aisladas en el cultivo, las células NK del ratón tienen una actividad citolítica débil, mientras que las células NK humanas exhiben capacidades citolíticas fuertes.

[0019] Las células NK de ratón y humanas también varían mucho en sus marcadores de expresión, cascadas de señalización y distribución tisular. Por ejemplo, CD56 se usa como marcador para las células NK humanas, mientras que las células NK de ratón no expresan este marcador en absoluto. Además, un mecanismo bien establecido para regular la citotoxicidad de las células NK es a través de la unión de ligandos, la activación de NK y los receptores inhibidores. Se sabe que dos de los receptores de activación de NK humanos más prominentes son NKp30 y NKp44, ninguno de los cuales se expresa en células NK de ratón. Con respecto a los receptores inhibidores de NK, mientras que las células NK humanas expresan KIR que reconocen MHC de clase I y reducen la actividad citotóxica, las células NK de ratón no expresan KIR en absoluto, sino que expresan Ly49s (Trowsdale et al, 2001). En general, a pesar de que las células NK de ratón logran la misma función que las células NK humanas en su entorno fisiológico natural, los mecanismos que cumplen esta función varían significativamente entre las especies.

[0020] Por lo tanto, existe una necesidad de células NK humanas alternativas y preferiblemente mejoradas y líneas de células NK humanas, por ejemplo, con un perfil más citotóxico.

[0021] Un objeto de la invención consiste en proporcionar células NK y líneas celulares NK con un fenotipo más citotóxico. Otro objetivo consiste en proporcionar métodos para producir células NK modificadas y líneas celulares NK, composiciones que contengan las células o líneas celulares y usos de dichas composiciones en el tratamiento de cánceres. Las realizaciones más particulares pretenden proporcionar tratamientos para los cánceres identificados, por ejemplo, los cánceres de la sangre, como las leucemias. Las realizaciones específicas pretenden combinar dos o más modificaciones de las células NK y las líneas celulares NK para mejorar aún más la citotoxicidad de las células modificadas.

30 Sumario de la invención

[0022] Se proporcionan en este documento células NK modificadas y líneas celulares NK con un fenotipo más citotóxico, y métodos para fabricar las células y líneas celulares. También se proporcionan composiciones de células NK modificadas y líneas de células NK, y usos de dichas composiciones para tratar el cáncer.

[0023] La invención proporciona una célula asesina natural (NK) o una línea celular NK que se ha modificado para expresar una variante de TRAIL, en la que la variante de TRAIL tiene al menos un aumento del 25% en la afinidad para DR4, con respecto al TRAIL de tipo salvaje.

[0024] Además, la invención proporciona una célula asesina natural humana (NK) o una línea celular NK para uso en el tratamiento del cáncer, en la que la célula (NK) o la línea celular NK se ha modificado para expresar una variante de TRAIL con al menos un aumento del 25% en la afinidad para DR4, con respecto al TRAIL de tipo salvaje.

[0025] Además, las composiciones de la invención incluyen células NK y líneas celulares NK en las que se proporcionan dos o más modificaciones, en las que múltiples modificaciones potencian adicionalmente la actividad citotóxica de la composición.

[0026] De acuerdo con la descripción, se proporcionan métodos adicionales para tratar el cáncer, por ejemplo, cáncer de sangre, usando líneas de células NK modificadas, por ejemplo, derivados de células KHYG-1, en donde las líneas de células NK modificadas están diseñadas para que carezcan de la expresión de los receptores inhibidores del punto de control., expresar variantes de ligando TRAIL y/o expresar CARs y/o receptores Fc.

[0027] Las enfermedades particularmente tratables de acuerdo con la invención incluyen cánceres, cánceres de sangre, leucemias y leucemia mieloide especialmente aguda. Los tumores y cánceres en humanos en particular pueden ser tratados. Las referencias a tumores en el presente documento incluyen referencias a neoplasmas.

Detalles de la invención

[0028] Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una célula asesina natural (NK) o una línea de células NK que se ha modificado genéticamente para aumentar su citotoxicidad.

[0029] Como se describe en detalle a continuación en los ejemplos, las células NK y las líneas de células NK se han modificado genéticamente para aumentar su actividad citotóxica contra el cáncer.

[0030] Juntas, las células NK y las líneas celulares NK de la invención se denominarán células NK (a menos que el contexto requiera lo contrario).

5 [0031] En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan células NK que tienen una función del receptor inhibidor del punto de control reducida o ausente. Así, en los ejemplos a continuación, se producen células NK que tienen uno o más genes de receptores inhibidores de punto de control eliminados. Preferiblemente, estos receptores son receptores inhibidores de punto de control específicos. Aún así, preferiblemente, estos receptores inhibidores de punto de control son uno o más o todos de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y/o TIM-3,

10 [0032] En otras realizaciones, se proporcionan células NK en las que una o más vías de señalización del receptor inhibidor se eliminan o exhiben una función reducida, siendo el resultado nuevamente reducido o ausente la función del receptor inhibidor. Por ejemplo, las vías de señalización mediadas por SHP-1, SHP-2 y/o SHIP se eliminan por modificación genética de las células.

15 [0033] Las células NK resultantes exhiben una citotoxicidad mejorada y son de mayor utilidad por lo tanto en la terapia del cáncer, especialmente en la terapia del cáncer de la sangre, en particular en el tratamiento de las leucemias y el mieloma múltiple.

20 [0034] En una realización, la modificación genética se produce antes de que la célula se haya diferenciado en una célula NK. Por ejemplo, las células madre pluripotentes (por ejemplo, iPSCs) pueden modificarse genéticamente para perder la capacidad de expresar uno o más receptores inhibidores de punto de control. Las iPSC modificadas se diferencian para producir células NK modificadas genéticamente con mayor citotoxicidad.

25 [0035] Se prefiere reducir la función de los receptores inhibidores del punto de control sobre otros receptores inhibidores, debido a la expresión del primero que sigue a la activación de células NK. Los receptores inhibidores normales o "clásicos", como la mayoría de la familia KIR, NKG2A y LIR-2, se unen a MHC de clase I y, por lo tanto, participan principalmente en la reducción del problema de la autofocalización. Preferiblemente, por lo tanto, se eliminan los receptores inhibidores del punto de control. La función reducida o ausente de estos receptores de acuerdo con la divulgación evita que las células cancerosas supriman la función efectora inmune (que de lo contrario podría ocurrir si los receptores fueran completamente funcionales). Por lo tanto, una ventaja clave de estas 30 realizaciones de la divulgación reside en las células NK que son menos susceptibles a la supresión de sus actividades citotóxicas por las células cancerosas; como resultado son útiles en el tratamiento del cáncer.

35 [0036] Como se usa en el presente documento, las referencias a receptores inhibitorios generalmente se refieren a un receptor expresado en la membrana plasmática de una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula NK, con la cual se unen su ligando complementario que da como resultado señales intracelulares que son responsables de reducir la citotoxicidad de dicha célula efectora inmune. Estos receptores inhibitorios se expresan durante los estados de "reposo" y "activado" de la célula efectora inmune y a menudo se asocian con la proporción al sistema inmune de un mecanismo de "auto tolerancia" que inhibe las respuestas citotóxicas contra las células y tejidos del cuerpo. Un ejemplo es la familia de receptores inhibitorios "KIR" que se expresan en las células NK y reconocen la 40 clase I del MHC expresada en las células sanas del cuerpo.

45 [0037] También, como se usa en el presente documento, los receptores inhibidores de punto de control se consideran usualmente como un subconjunto de los receptores inhibidores anteriores. Sin embargo, a diferencia de otros receptores inhibidores, los receptores inhibidores del punto de control se expresan a niveles más altos durante la activación prolongada y la citotoxicidad de una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula NK. Este fenómeno es útil para amortiguar la citotoxicidad crónica en, por ejemplo, sitios de inflamación. Los ejemplos incluyen los receptores inhibidores de punto de control PD-1, CTLA-4 y CD96, todos los cuales se expresan en células NK.

50 [0038] La invención por lo tanto también proporciona una célula NK que se modifica adicionalmente para que carezca de un gen que codifica un receptor inhibidor del punto de control seleccionado de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y TIM-3.

55 [0039] Una célula NK que carece de un gen puede referirse a una delección total o parcial, a una mutación o de otro modo que da lugar a que no se exprese ningún producto génico funcional. En las formas de realización, la célula NK carece de genes que codifican dos o más de los receptores inhibidores.

60 [0040] Las realizaciones más específicas comprenden una célula NK que carece de un gen que codifica un receptor inhibidor del punto de control seleccionado de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4) y CD279 (PD-1). Realizaciones preferidas comprenden una célula NK que es un derivado de KHYG-1,

65 [0041] En los ejemplos descritos a continuación, los inventores han mostrado de manera fiable los efectos citotóxicos del uso de ARNip para eliminar la expresión del receptor inhibidor de punto de control CD96 en células KHYG-1, CD96 knockdown (KD) Las células KHYG-1 demostraron una mayor citotoxicidad contra las células de leucemia en una variedad de relaciones efector:diana (E:T).

[0042] Como se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, las modificaciones de las células NK que

mejoran la citotoxicidad también incluyen el aumento de la expresión del ligando TRAIL y/o variantes del ligando TRAIL mutado.

5 [0043] Las células NK resultantes exhiben una unión aumentada a los receptores TRAIL y, como resultado, una mayor citotoxicidad contra los cánceres, especialmente los cánceres de la sangre, en particular las leucemias.

10 [0044] Los mutantes/variantes preferiblemente tienen menor afinidad (o, en efecto, no afinidad) por los receptores de señuelo, en comparación con la unión de TRAIL de tipo salvaje a los receptores de señuelo. Dichos receptores señuelo representan una clase de receptores TRAIL que se unen al ligando TRAIL pero no tienen la capacidad de iniciar la muerte celular y, en algunos casos, actúan para antagonizar la vía de señalización de la muerte. Los ligandos de TRAIL mutantes/variantes se pueden preparar de acuerdo con el documento WO2009/077857.

15 [0045] Los mutantes/variantes pueden tener una afinidad incrementada por separado para los receptores TRAIL, por ejemplo, DR4 y DR5. El tipo natural de TRAIL es conocido por tener una K_D de >2 nM para DR4, >5 nM para DR5 y >20 nM para el receptor DcR1 señuelo (documento WO2009/077857; medido por resonancia de plasmón de superficie), o alrededor de 50 a 100 nM para DR4, 1 a 10 nM para DR5 y 175 a 225 nM para DcR1 (Truneh, A. et al. 2000; medido por calorimetría de titulación isotérmica y ELISA). Por lo tanto, una afinidad aumentada para DR4 se define adecuadamente como una K_D de <2 nM o <50 nM, respectivamente, mientras que una afinidad incrementada para DR5 se define adecuadamente como una K_D de <5 nM o <1 nM, respectivamente. Una afinidad reducida para el receptor de señuelo DcR1 se define adecuadamente como una K_D de >50 nM o >225 nM, respectivamente. En cualquier caso, un aumento o disminución en la afinidad exhibida por la variante/mutante de TRAIL es relativa a una afinidad de línea de base exhibida por TRAIL de tipo salvaje. La afinidad aumenta preferiblemente al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 25%, en comparación con la exhibida por TRAIL de tipo salvaje.

20 [0046] La variante de TRAIL tiene preferiblemente una afinidad incrementada por DR5 en comparación con su afinidad por DR4, DcR1 y DcR2. Preferiblemente, la afinidad es al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces o más para DR5 que para uno o más de DR4, DcR1 y DcR2. Más preferiblemente, la afinidad es al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces o más para DR5 que para al menos dos, y preferiblemente todos, de DR4, DcR1 y DcR2.

25 [0047] Una ventaja clave de estas realizaciones de la invención reside en las células NK que tienen una mayor potencia para matar células cancerosas.

30 [0048] Otras realizaciones específicas comprenden una célula NK que expresa un ligando TRAIL mutante que tiene una afinidad reducida o nula para los receptores de señuelo TRAIL. Preferiblemente, esta célula NK es un derivado de KHYG-1. Otras realizaciones específicas comprenden una célula NK que expresa un ligando TRAIL mutante que tiene una afinidad reducida o nula para los receptores de señuelo TRAIL y una afinidad aumentada para DR4 y/o DR5.

35 [0049] En los ejemplos de la invención, que se describen con más detalle a continuación, las células NK se modificaron genéticamente para expresar un TRAIL mutante. Las células KHYG-1 modificadas expresaron TRAIL mutante, y NK-92 expresó un TRAIL mutante. Las células KHYG-1 modificadas mostraron una citotoxicidad mejorada frente a líneas celulares de cáncer *in vitro*. Las células KHYG-1 expresan receptores TRAIL (por ejemplo, DR4 y DR5), pero a niveles bajos. Otras realizaciones preferidas de las células NK modificadas expresan ningún receptor de TRAIL nulo o sustancialmente nulo, o lo hacen solo a un nivel bajo - suficientemente bajo para que la viabilidad de las células NK modificadas no se vea afectada negativamente por la expresión del TRAIL mutante.

40 [0050] En una realización opcional, el tratamiento de un cáncer utilizando células NK modificadas que expresan TRAIL o una variante de TRAIL se mejora administrando a un paciente un agente capaz de regular la expresión de los receptores de muerte de TRAIL en las células cancerosas. Este agente puede administrarse antes de, en combinación con o posteriormente a la administración de las células NK modificadas. Sin embargo, es preferible que el agente se administre antes de administrar las células NK modificadas.

45 [0051] En una realización preferida, el agente regula positivamente la expresión de DR5 en células cancerosas. El agente puede ser opcionalmente un medicamento quimioterapéutico, por ejemplo, Bortezomib, y administrarse en una dosis baja capaz de regular al alza la expresión de DR5 en el cáncer.

50 [0052] La invención no se limita a ningún agente particular capaz de regular la expresión de DR5, pero los ejemplos de agentes inductores de DR5 incluyen Bortezomib, Gefitinib, Piperlongumina, Doxorubicin, Alfa-tocoferilo succinato e inhibidores HDAC.

55 [0053] De acuerdo con una realización preferida de la invención, el ligando TRAIL mutante/variante está unido a uno o más dominios coestimuladores de células NK, por ejemplo, 41BB/CD137, CD3zeta/CD247, DAP12 o DAP10. La unión de la variante a su receptor en una célula diana promueve señales apoptóticas dentro de la célula diana, así como estimula las señales citotóxicas en la célula NK.

- [0054] Según otras realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan células NK que ambas han reducido la función del receptor inhibidora del punto de control y también expresa un ligando TRAIL mutante, como se describe con más detalle anteriormente en relación con estas modificaciones respectivas de las células NK. En realizaciones aún más preferidas, una célula NK que expresa un ligando TRAIL mutante que tiene una afinidad reducida o nula para los receptores de señal TRAIL y puede ser un derivado de KHYG-1, además carece de un gen que codifica un receptor inhibidor de punto de control seleccionado de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y TIM-3,
- [0055] La presente descripción también proporciona células NK y líneas celulares NK, preferiblemente células KHYG-1 y derivados de las mismas, modificadas para expresar una o más CAR.
- [0056] Adecuadamente para usos de terapia contra el cáncer, los CAR se unen específicamente a uno o más ligandos en células cancerosas, por ejemplo, CS1 (SLAMF7) en células de mieloma. Para uso en el tratamiento de cánceres específicos, por ejemplo, mieloma múltiple, el CAR puede unirse a CD38. Por ejemplo, el CAR puede incluir las propiedades de unión de, por ejemplo, regiones variables derivadas de, similares o idénticas a las del conocido anticuerpo monoclonal daratumumab. Dichas células NK pueden usarse en la terapia del cáncer en combinación con un agente que inhibe la angiogénesis, por ejemplo, lenalidomida. Para uso en la terapia de cánceres, especialmente leucemias y LMA en particular, el CAR puede unirse a CLL-1.
- [0057] Los CAR-NK pueden ser biespecíficos, en donde su afinidad es por dos ligandos/antígenos distintos. Los CAR-NK biespecíficos se pueden usar para aumentar el número de posibles sitios de unión en las células cancerosas o, alternativamente, para localizar las células cancerosas en otras células efectoras inmunes que expresan ligandos específicos de la NK-CAR. Para su uso en la terapia del cáncer, un CAR biespecífico puede unirse a una célula tumoral y a una célula efectora, por ejemplo, una célula T, una célula NK o un macrófago. Así, por ejemplo, en el caso de mieloma múltiple, un CAR biespecífico puede unirse a un antígeno de células T (por ejemplo, CD3, etc.) y un marcador de células tumorales (por ejemplo, CD38, etc.). Un CAR biespecífico puede unirse alternativamente a dos marcadores de células tumorales separados, aumentando la afinidad de unión global de la célula NK por la célula tumoral diana. Esto puede reducir el riesgo de que las células cancerosas desarrollen resistencia al regular a la baja uno de los antígenos diana. Un ejemplo en este caso, en el mieloma múltiple, sería un enlace CAR tanto a CD38 como a CS-1/SLAMF7. Otro marcador de células tumorales dirigido de manera adecuada por el CAR es un marcador de tipo "no me coma" en los tumores, ejemplificado por CD47.
- [0058] Las características opcionales de la invención incluyen proporcionar modificaciones adicionales a las células NK y las líneas celulares NK descritas anteriormente, en donde, por ejemplo, un receptor Fc (que puede ser CD16, CD32 o CD64, incluidos los subtipos y derivados) se expresa en la superficie de la célula. En uso, estas células pueden mostrar un mayor reconocimiento de células cancerosas recubiertas con anticuerpos y mejorar la activación de la respuesta citotóxica.
- [0059] Otras características opcionales de la invención incluyen la adaptación de las células NK modificadas y las líneas celulares NK para adaptarse mejor a regiones específicas del cuerpo. Las células NK de la invención pueden dirigirse a ubicaciones específicas de células cancerosas. En realizaciones preferidas para el tratamiento de cánceres de sangre, los efectores de NK de la invención se adaptan al hogar de la médula ósea. Las células NK específicas se modifican por fucosilación y/o sialilación para albergar la médula ósea. Esto se puede lograr modificando genéticamente las células NK para expresar la fucosiltransferasa y/o sialiltransferasa apropiadas, respectivamente. El aumento de las células efectoras NK en los sitios tumorales también puede ser posible por la interrupción de la vasculatura del tumor, por ejemplo, por quimioterapia metrónómica, o mediante el uso de fármacos dirigidos a la angiogénesis (Melero et al, 2014) para normalizar la infiltración de células NK a través de vasos sanguíneos de cáncer.
- [0060] Otra característica opcional de la invención consiste en proporcionar células NK modificadas y líneas celulares NK con una capacidad intrínseca incrementada para un rápido crecimiento y proliferación en cultivo. Esto se puede lograr, por ejemplo, transfectando las células para sobreexpresar las citocinas inductoras de crecimiento IL-2 e IL-15. Además, esta alteración opcional proporciona una alternativa rentable para reponer el medio de crecimiento con citoquinas de forma continua.
- [0061] La invención proporciona además un método para fabricar una célula NK modificada o una línea celular NK, que comprende modificar genéticamente la célula o línea celular como se describe en el presente documento para aumentar su citotoxicidad. Esta modificación genética puede ser una desactivación estable de un gen, por ejemplo, por CRISPR, o una desactivación transitoria de un gen, por ejemplo, por ARNip.
- [0062] En una realización preferida de la divulgación, se usa una técnica de modificación genética estable, por ejemplo, CRISPR, para proporcionar una nueva línea de células NK con mayor citotoxicidad, por ejemplo, un derivado de células KHYG-1,
- [0063] En las formas de realización, el método es para hacer una célula NK o línea de células NK que se ha modificado para reducir la función del receptor inhibitorio. Preferiblemente, estos receptores inhibidores son

receptores inhibidores de punto de control.

[0064] Las realizaciones más específicas de la divulgación comprenden un método para fabricar una línea de células NK o una línea de células NK con función de receptor inhibidor reducido, en donde los receptores inhibidores de punto de control se seleccionan de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y TIM-3.

[0065] En realizaciones preferidas, el método comprende modificar las células NK para reducir la función de dos o más de los receptores inhibidores.

[0066] La invención proporciona además un método para fabricar una célula NK modificada o una línea celular NK que comprende modificar genéticamente la célula o línea celular para expresar el ligando TRAIL o el ligando TRAIL mutante (variante).

[0067] En formas de realización, el método comprende modificar una célula NK o una línea de células NK para expresar el ligando TRAIL mutante que tiene una afinidad incrementada por los receptores TRAIL. Preferiblemente, los receptores TRAIL son DR4 y/o DR5. Las realizaciones preferidas proporcionan un método para modificar las células NK o las líneas celulares NK para expresar un ligando TRAIL mutante que tiene una afinidad reducida por los receptores TRAIL señuelo.

[0068] En otras formas de realización preferidas, el método comprende modificar una célula NK o una línea celular NK para eliminar la función de un receptor inhibidor del punto de control y también para expresar un ligando TRAIL mutante con una afinidad de unión reducida o nula para los receptores TRAIL señuelo.

[0069] Otras formas de realización típicas proporcionan un método para fabricar una célula NK o una línea celular NK, en la que se ha eliminado la función de uno o más receptores inhibidores del punto de control y/o se expresa un ligando TRAIL mutante, que se ha reducido o no la afinidad de unión para los receptores de señuelo TRAIL, y la célula se modifica aún más para expresar un CAR o un CAR biespecífico. Las propiedades del CAR son opcionalmente como se describe anteriormente.

[0070] En las formas de realización, el método comprende fabricar una célula NK o una línea celular NK, en la que se ha eliminado la función de uno o más receptores inhibidores del punto de control y/o se expresa un ligando TRAIL mutante, que tiene una unión reducida o no la afinidad por los receptores TRAIL señuelo, y la célula se modifica opcionalmente para expresar un CAR o un CAR biespecífico, y la célula se modifica aún más para expresar uno o más receptores Fc. Los receptores Fc adecuados se seleccionan entre CD16 (FcRIII), CD32 (FcRII) y CD64 (FcRI).

[0071] Las realizaciones preferidas de toda la divulgación anterior comprenden un método para fabricar células NK y líneas celulares NK que son un derivado de KHYG-1,

[0072] Según los objetos de la invención, las células NK modificadas, la línea de células NK o su composición con mayor citotoxicidad son para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, especialmente cáncer de sangre.

[0073] En las formas de realización preferidas, las células NK modificadas, la línea o la composición de las células NK se utilizan para tratar los cánceres de la sangre, incluida la leucemia linfocítica aguda (LLA), la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia linfocítica crónica (LCL), la leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, que incluye linfomas de células T y linfomas de células B, mieloma asintomático, mieloma múltiple latente (SMM), mieloma activo o mieloma de cadena ligera.

[0074] En realizaciones aún más preferidas, la invención es una línea de células NK obtenida como un derivado de KHYG-1 al reducir la función del receptor inhibidor del punto de control en una célula KHYG-1 y expresar un ligando TRAIL mutante en una célula KHYG-1 para su uso en el tratamiento del cáncer de sangre.

[0075] Las células NK modificadas, las líneas de células NK y las composiciones de las mismas descritas aquí, arriba y abajo, son adecuadas para el tratamiento del cáncer, en particular el cáncer en humanos, por ejemplo, para el tratamiento de cánceres de células sanguíneas o cánceres sólidos. Las células NK y sus derivados son células NK humanas.

[0076] El experto en la materia conocerá diversas vías de administración para administrar agentes activos y combinaciones de los mismos a un paciente que lo necesite. Las realizaciones de la invención son para el tratamiento del cáncer de sangre. La administración de las células NK modificadas y/o las líneas celulares NK puede ser sistémica o localizada, tal como, por ejemplo, a través de la vía intraperitoneal.

[0077] En otras realizaciones, el agente activo se administra más directamente. Por lo tanto, la administración puede ser directamente intratumoral, adecuada especialmente para tumores sólidos.

[0078] Se cree que las células NK en general son adecuadas para los usos y composiciones de la invención. Según

las células utilizadas en ciertos ejemplos en el presente documento, la célula NK puede ser una célula NK obtenida de una línea de células cancerosas. Ventajosamente, una célula NK, preferiblemente tratada para reducir su tumorigenicidad, por ejemplo, haciéndola mortal y/o incapaz de dividirse, puede obtenerse de una línea celular de cáncer de sangre y usarse en métodos de la invención para tratar el cáncer de sangre.

[0079] Para hacer que una célula derivada de cáncer sea más aceptable para uso terapéutico, generalmente se trata o pretrata de alguna manera para reducir o eliminar su propensión a formar tumores en el paciente. Las líneas de células NK modificadas específicas utilizadas en los ejemplos son seguras porque se han hecho incapaces de división; son irradiados y conservan su capacidad de matar, pero mueren dentro de unos 3-4 días. Las células y líneas celulares específicas son, por lo tanto, incapaces de proliferación, por ejemplo, como resultado de la irradiación. Los tratamientos de células NK potenciales para uso en los métodos de este documento incluyen la irradiación para evitar que se dividan y formen un tumor *in vivo* y la modificación genética para reducir la tumorigenicidad, por ejemplo, para insertar una secuencia que codifica un gen suicida que se puede activar para evitar que las células se dividan y formando un tumor *in vivo*. Los genes suicidas pueden activarse mediante agentes exógenos, por ejemplo, circulantes, que luego causan la muerte celular en aquellas células que expresan el gen. Otra alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a células NK específicas de la terapia. CD52, por ejemplo, se expresa en células KHYG-1 y la unión de anticuerpos monoclonales a este marcador puede dar lugar a citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y muerte celular KHYG-1.

[0080] Como se discutió en un artículo publicado por Suck et al, 2006, las células NK derivadas de cáncer y las líneas celulares se irradian fácilmente usando irradiadores como el Gammacell 3000 Elan. Se utiliza una fuente de cesio-137 para controlar la dosificación de la radiación y se puede usar una curva de dosis-respuesta entre, por ejemplo, 1 Gy y 50 Gy para determinar la dosis óptima para eliminar la capacidad proliferativa de las células, mientras que se mantienen los beneficios del aumento de la citotoxicidad. Esto se logra analizando la citotoxicidad de las células después de que se haya administrado cada dosis de radiación.

[0081] Hay beneficios significativos del uso de una línea de células NK irradiadas para la inmunoterapia celular adoptiva sobre el enfoque autólogo bien establecido o de células T emparejadas con MHC. En primer lugar, el uso de una línea celular NK con una naturaleza altamente proliferativa significa que la expansión de las líneas celulares NK modificadas se puede lograr más fácilmente y a nivel comercial. La irradiación de la línea de células NK modificada puede llevarse a cabo antes de la administración de las células al paciente. Estas células irradiadas, que conservan su citotoxicidad útil, tienen una vida útil limitada y, a diferencia de las células T modificadas, no circularán durante largos períodos de tiempo y causarán efectos secundarios persistentes.

[0082] Además, el uso de células NK modificadas alogénicas y líneas celulares NK significa que las células que expresan MHC de clase I en el paciente no pueden inhibir las respuestas citotóxicas NK de la misma forma que lo hacen con las respuestas citotóxicas NK autólogas. El uso de células NK alogénicas y líneas celulares para la muerte de células cancerosas se beneficia del efecto GVL mencionado anteriormente y, a diferencia de las células T, las células NK alogénicas y las líneas celulares no estimulan la aparición de GVHD, lo que las convierte en una opción muy preferida para el tratamiento del cáncer mediante inmunoterapia celular adoptiva.

Ejemplos

[0083] La presente invención se describe ahora con más detalles y específicos en relación con la producción de derivados de la línea de células NK KHYG-1, modificados para mostrar más actividad citotóxica y, por lo tanto, capacidad para causar la muerte de células leucémicas en seres humanos.

[0084] La invención se ilustra ahora en realizaciones específicas con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 50 La Fig. 1 muestra la secuencia de ADN de la región diana del gen LIR2 y marca las regiones flanqueantes del ARNg;
- La Fig. 2 muestra la secuencia de ADN de la región diana del gen CTLA4 y marca las regiones flanqueantes del ARNg;
- La Fig. 3 muestra el constructo de ARNg (vector de expresión) utilizado para la transfección;
- 55 La Fig. 4 muestra bandas de electroforesis en gel para ADN LIR2 parental y mutado, antes y después de la transfección;
- La Fig. 5 muestra bandas de electroforesis en gel para el ADN de CTLA4 parental y mutado, antes y después de la transfección;
- La Fig. 6A es un gráfico de FACS que muestra una exitosa caída de CD96 usando electroporación;
- 60 La Fig. 6B es una gráfica FACS que muestra una exitosa caída de CD96 usando electroporación;
- La Fig. 7 es un gráfico de barras que muestra una mayor citotoxicidad de las células KHYG-1 de eliminación de CD96 contra células K562 en varias relaciones E:T;
- La Fig. 8 muestra la eliminación de CD328 (Siglec-7) en células NK-92;
- La Fig. 9 muestra la citotoxicidad mejorada de las células NK con la caída de CD328 (Siglec-7);
- 65 La Fig. 10 muestra un gráfico de FACS de la expresión de línea de base de TRAIL en células KHYG-1;
- La Fig. 11 muestra una gráfica FACS de la expresión de TRAIL y la variante de TRAIL después de la

transfección de células KHYG-1;

La Fig. 12 muestra un gráfico FACS de la expresión de CD107a después de la transfección de células KHYG-1; La Fig. 13 muestra los efectos de la transfección de células KHYG-1 con TRAIL y la variante TRAIL en la viabilidad celular;

5 La Fig. 14 muestra un gráfico de FACS de la expresión de referencia de DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en células KHYG-1 y células NK-92;

Figs. 15, 16 y 17 muestran los efectos de la expresión de TRAIL o la variante de TRAIL en células KHYG-1 sobre la apoptosis de tres poblaciones de células diana: K562, RPMI8226 y MM1.S, respectivamente;

10 La Fig. 18 muestra dos gráficos FACS de la expresión de DR5 en células RPMI8226 y MM1.S, respectivamente, en donde se muestran los efectos del tratamiento con Bortezomib en la expresión de DR5;

La Fig. 19 muestra gráficos de FACS de apoptosis en células MM1.S tratadas/no tratadas con Bortezomib co-cultivadas con células KHYG-1 con/sin la variante TRAIL;

La Fig. 20 muestra un gráfico de FACS de los niveles de expresión de perforina en células KHYG-1 tratadas con CMA 100 nM durante 2 horas;

15 La Fig. 21 muestra gráficos de FACS de la viabilidad de las células KHYG-1 después del tratamiento con CMA o vehículo 100 nM;

La Fig. 22 muestra gráficos de FACS de apoptosis en células MM1.S co-cultivadas con células KHYG-1 con/sin la variante TRAIL y pretratadas con/sin CMA;

20 La Fig. 23 muestra gráficos de FACS de apoptosis en células K562 co-cultivadas con células KHYG-1 con CD96-siRNA y/o expresión de variante TRAIL; y

La Fig. 24 muestra gráficos de FACS de apoptosis en células MM1.S co-cultivadas con células KHYG-1 con CD96-siRNA y/o expresión de variante TRAIL.

[0085] Las secuencias de ADN, ARN y aminoácidos se mencionan a continuación, en las que:

25 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia completa de ADN de LIR2;

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de LIR2;

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ARNg de LIR2 g9;

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ARNg de LIR2 g18;

30 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia del cebador directo LIR2;

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia del cebador inverso LIR2;

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia completa de ADN de CTLA4;

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de CTLA4;

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ARNg de CTLA4 g7;

35 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de ARNg de CTLA4 g15;

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia del cebador directo CTLA4; y

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia del cebador inverso CTLA4.

Ejemplo 1 - Eliminación de la función del receptor inhibidor

CRISPR/Cas9

[0086] Las células se prepararon del siguiente modo, con la función del receptor inhibidor eliminado. Las construcciones de ARNg se diseñaron y prepararon para dirigirse a los genes que codifican el receptor inhibidor clásico LIR2 y el receptor inhibidor de punto de control CTLA4 en el genoma humano de las células NK. La edición del genoma CRISPR/Cas9 se usó para eliminar los genes diana LIR2 y CTLA4.

[0087] Se seleccionaron dos candidatos a ARNg para cada gen diana y se determinaron sus eficacias de escisión en células K562. Las secuencias de los candidatos a ARNg se muestran en la Tabla 1 y el Motivo Adyacente Protoespacial (PAM) se relaciona con las últimas 3 bases de la secuencia. Las regiones flanqueantes de las secuencias de ARNg en el gen LIR2 (SEQ ID NO: 1) y el gen CTLA4 (SEQ ID NO: 7) se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

55 Tabla 1, Candidatos de ARNg y secuencias

Gen	Nombre de plásmido	Secuencia
hLIR2	SM682.LIR2.g9	GAGTCACAGGTGGCATTGGCGGG (SEQ ID NO: 3)
	SM682.LIR2.g18	CGAATCGCAGGTGGTCGCACAGGG (SEQ ID NO: 4)
hCTLA4	SM683.CTLA4.g7	CACTCACCTTGAGAACAGACAGG (SEQ ID NO: 9)
	SM683.CTLA4.g15	CCTTGTGCCGCTGAAATCCAAGG (SEQ ID NO: 10)

[0088] Se transfecaron células K562 con las construcciones de ARNg preparadas (Figura 3) y se recogieron posteriormente para la amplificación por PCR. La presencia de la expresión de GFP se usó para informar la incorporación exitosa del constructo de ARNg en las células K562. Esto confirmó la expresión del gen Cas9 y, por lo

tanto, la capacidad de eliminar la expresión de los genes LIR2 y CTLA4.

[0089] La actividad de escisión de las construcciones de ARNg se determinó usando un ensayo de detección de despareamientos *in vitro*. La endonucleasa I T7E1 reconoce y escinde el ADN no perfectamente emparejado, lo que permite que los genes LIR2 y CTLA4 parentales se comparan con los genes mutados después de la transfección CRISPR/Cas9 y la unión final no homóloga (NHEJ).

[0090] La figura 4 muestra las bandas resultantes después de la electroforesis en gel de agarosa después de desactivación del gen LIR2 con las secuencias de ARNg g9 y g18. Las tres bandas correspondientes a cada mutación se relacionan con el gen parental y las dos cadenas resultantes después de la detección de una falta de coincidencia en la secuencia de ADN después de la transfección. La secuencia de ARNg de g9 dio como resultado una tasa de éxito del 11% de transfección, mientras que el ARNg de g18 dio como resultado un 10%.

[0091] La figura 5 muestra las bandas resultantes después de la electroforesis en gel de agarosa después de desactivación del gen CTLA4 con las secuencias de ARNg g7 y g15. La secuencia de ARNg de g7 dio como resultado una tasa de éxito de transfección del 32%, mientras que el ARNg de g15 dio como resultado un 26%.

[0092] Tras la eliminación exitosa de LIR2 y CTLA4 en células K562, las células KHYG-1 se transfecaron con construcciones de ARNg.

[0093] Se seleccionaron clones derivados de KHYG-1 que tenían delecciones homocigotas. Se usó un vector de expresión Cas9/puromicina acetiltransferasa (PAC) para este propósito. Se seleccionaron células transfectadas con éxito, en función de su resistencia al antibiótico puromicina.

25 Cas9 RNP

[0094] Otro protocolo utilizado para la desactivación de los receptores inhibidores del punto de control en células NK fue el de la transfección de RNP de Cas9. Una ventaja de usar este protocolo fue que se lograron eficiencias de transfección similares pero con una toxicidad significativamente menor en comparación con el uso de los plásmidos de ADN del protocolo CRISPR/Cas9.

[0095] Se recogieron 1×10^6 células KHYG1 para cada experimento de transfección. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron en una centrifugadora. El sobrenadante fue entonces descartado. Los materiales CRISPR RNP (proteína de unión a ARN) se prepararon de la siguiente manera:

- (1) Se preparó una solución de 20 μ M del ARNcr y ARNt sintetizados requeridos (comprados de Dharmacon).
- (2) Se mezclaron 4 μ l de ARNcr (20 μ M) y 4 μ l de ARNt (20 μ M).
- (3) La mezcla se añadió luego a 2 μ l de proteína Cas9 (5 μ g/ μ l).
- (4) Todos los componentes se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

[0096] Despues del sistema de transfección Neon®, las células se mezclaron con RNP Cas9 y se realizó la electroporación usando los siguientes parámetros:

- Voltaje: 1450v
 Ancho de pulso: 30ms
 Número de pulso: 1

[0097] Las células se transfirieron luego a un pocillo de una placa de 12 pocillos que contenía medio de crecimiento (incluyendo IL-2 e IL-15).

[0098] Las células se recogieron después de 48-72 horas para confirmar la eficacia de edición del gen mediante el ensayo de endonucleasa T7 y/o secuenciación de Sanger. Se confirmó la presencia de indeles, lo que indica una eliminación exitosa de CTLA4, PD1 y CD96 en células KHYG1.

55 Nucleasas específicas del sitio

[0099] Otro protocolo utilizado para la desactivación de los receptores inhibidores del punto de control en células NK fue el de la transfección con XTN TALEN. Una ventaja de usar este protocolo fue que se podía alcanzar un nivel de especificidad particularmente alto en comparación con el CRISPR de tipo salvaje.

60 Paso 1: Preparación de Reactivos

[0100] Se ensayaron células KHYG-1 para determinar ciertos atributos que incluyen eficacia de transfección, eficacia de clonación de células individuales y número de cariotipo/copia. Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

[0101] Según el receptor inhibidor del punto de control que está desactivado, las nucleasas se prepararon mediante un diseño personalizado de al menos 2 pares de XTN TALEN. El paso del diseño personalizado incluye la evaluación del locus genético, el número de copias y la evaluación funcional (es decir, homólogos, evaluación fuera del objetivo).

5 *Paso 2: Ingeniería de línea celular*

[0102] Las células fueron transfectadas con las nucleasas de la Etapa 1; esta etapa se repitió hasta 3 veces para obtener altos niveles de corte y los cultivos se dividieron y los cultivos intermedios se mantuvieron antes de cada transfección.

10 [0103] La selección inicial tuvo lugar varios días después de cada transfección; los conjuntos de células se ensayaron para determinar la eficacia de corte a través del ensayo Cel-1. Después de que el nivel de corte alcanzó niveles aceptables después de las transfecciones repetidas, las células se consideraron listas para la clonación de células individuales.

15 [0104] Las células agrupadas se clasificaron en una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos; el número de placas para cada grupo dependió de la eficiencia de clonación de una sola célula determinada en el Paso 1. Las placas se dejaron incubar durante 3-4 semanas.

20 *Paso 3 - Cribado y expansión*

[0105] Una vez que las células eran confluentes en las placas de 96 pocillos, los cultivos se consolidaron y se dividieron en placas de 96 pocillos por triplicado; una placa se congeló como respaldo, una placa se replató para continuar la expansión de los clones y la placa final se usó para la confirmación del genotipo.

25 [0106] Cada clon en la placa de genotipo se analizó para detectar la pérdida de la señal de qPCR, lo que indica que todos los alelos se habían modificado. Los clones negativos se amplificaron por PCR y se clonaron para determinar la naturaleza de los indeles y la ausencia de indeles de tipo salvaje o en el marco. Los clones con el knockout confirmado se consolidaron en no más de una placa de 24 pocillos y se expandieron más; por lo general se produjeron 5-10 croviales congelados que contenían 1×10^6 células por vial para hasta 5 clones individuales por knockout.

30 *Paso 4 - Validación*

35 [0107] Las células se acumularon en condiciones asépticas.

[0108] Los criterios básicos de liberación para todas las células almacenadas incluían el número de células viables (congelación previa y descongelación), confirmación de identidad a través de STR, aseguramiento básico de esterilidad y pruebas de micoplasma; se aplicaron otros criterios de liberación cuando fue necesario (cariotipo, expresión del marcador de superficie, esterilidad de alto nivel, evaluación de transcripción o proteína, etc.).

Ejemplo 2 - Knockdown de la función del receptor CD96 inhibidor del punto de control mediante iARN

40 [0109] El knockdown de ARNip de CD96 en células KHYG-1 se realizó por electroporación. El kit Nucleofection T se usó, junto con el Amaxa Nucleofector II, de Lonza, ya que es apropiado para el uso con líneas celulares y puede transfectar con éxito células tanto divididas como no divididas y logra eficiencias de transfección de hasta el 90%.

45 [0110] El control ARNip (número de catálogo: sc-37007) y CD96 ARNip (número de catálogo: sc-45460) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. RPMI-1640 libre de antibióticos que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM se usó para el cultivo posterior a Nucleofección. Se obtuvo CD96-APC antihumano de ratón (número de catálogo: 338409) de Biolegend para la tinción.

50 [0111] Se preparó una solución madre de ARNip 20 μ M. El dúplex de ARNip liofilizado se resuspendió en 33 μ l de agua libre de ARNasa (tampón de dilución de ARNip: sc-29527) a FITC-control/control-siRNA, en 165 μ l de agua libre de ARNasa para el gen diana ARNip (ARNip CD96). El tubo se calentó a 90°C durante 1 minuto y luego se incubó a 37°C durante 60 minutos. La reserva de ARNip se almacenó a -20°C hasta que fue necesario.

55 [0112] Las células KHYG-1 se pasaron de uno a dos días antes de Nucleofección, ya que las células deben estar en fase de crecimiento logarítmico.

60 [0113] La solución de Nucleofector se calentó a temperatura ambiente (100 μ l por muestra). También se precalentó una porción de medio de cultivo que contenía suero y suplementos a 37°C en un tubo de 50 ml. Se prepararon placas de 6 pocillos añadiendo 1,5 ml de medio de cultivo que contenía suero y suplementos. Las placas se incubaron previamente en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂.

[0114] Se mezclaron suavemente 2×10^6 células en 100 μl de solución de Nucleofección con 4 μl de solución de ARNip 20 μM (1,5 μg de ARNip). Se evitaron las burbujas de aire durante la mezcla. La mezcla se transfirió a cubetas certificadas por Amaxa y se colocó en el soporte de cubetas Nucleofector y se seleccionó el programa U-001.

5 [0115] Se permitió que el programa terminara, y las muestras en las cubetas se retiraron inmediatamente. Luego se agregaron 500 μl de medio de cultivo pre-equilibrado a cada cubeta. La muestra en cada cubeta se transfirió luego suavemente a un pocillo correspondiente de la placa de 6 pocillos preparada, para establecer un volumen final de 2 ml por pocillo.

10 [0116] Las células se incubaron luego en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂ hasta que se realizó el análisis de transfección. El análisis de citometría de flujo se realizó 16-24 horas después de la electroporación, para medir los niveles de expresión de CD96. Este protocolo de electroporación se llevó a cabo varias veces y se descubrió que daba como resultado la caída de CD96 en las células KHYG-1 (véase, por ejemplo, las Figuras 6A y 15 6B).

Ejemplo 3 - Citotoxicidad mejorada de células NK con un knockdown de CD96

20 [0117] Las células KHYG-1 con y sin la eliminación de CD96 se cultivaron conjuntamente con células K562 en diferentes relaciones efector:diana (E: T).

[0118] La citotoxicidad se midió 4 horas después del co-cultivo, usando el kit de citotoxicidad DELFIA EuTDA de PerkinElmer (número de catálogo: AD0116).

25 [0119] Las células diana K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM y antibióticos. Las placas de fondo en V de 96 pocillos (número de catálogo: 83.3926) se compraron a SARSTEDT. Se usó una centrífuga Eppendorf 5810R (con rotor de placa) para girar hacia abajo la placa. Se usó un FLASH VARIOSKAN (con el software Scanlt 2.4.3) para medir la señal de fluorescencia producida por células K562 lisadas.

30 [0120] Las células K562 se lavaron con medio de cultivo y el número de células se ajustó a 1×10^6 células/mL con medio de cultivo. Se agregaron 2-4 mL de células a 5 μl de reactivo BATDA y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan para formar un ligando hidrofílico, que ya no pasa a través de la membrana. Las células se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 minutos para lavar las células K562 cargadas. Esto se repitió 3-5 veces con medio que contenía Probenecid 1 mM (Sigma P8761). Después del lavado final, el sedimento celular se resuspendería en medio de cultivo y se ajustó a aproximadamente 5×10^4 células/mL.

35 [0121] Los pocillos se configuraron para la detección de fondo, liberación espontánea y liberación máxima. Se transfirieron 100 μl de células diana cargadas (5.000 células) a los pocillos en una placa con fondo en V y se agregaron 100 μl de células efectoras (células KHYG-1) a diferentes concentraciones celulares, para producir relaciones de efecto a objetivo que varían de 1:1 a 20:1. La placa se centrifugó a 100 x g durante 1 minuto y se incubó durante 4 horas en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C. Para los pocillos de liberación máxima, se agregaron 10 μl de tampón de lisis a cada pocillo 15 minutos antes de cosechar el medio. La placa se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos.

40 [0122] Se transfirieron 20 μl de sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se agregaron 200 μl de solución de europio precalentada. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos utilizando un agitador de placas. Como las células K562 son lisadas por las células KHYG-1, liberan ligando en el medio. Este ligando reacciona con la solución de europio para formar un quelato fluorescente que se relaciona directamente con la cantidad de células lisadas.

45 [0123] La fluorescencia se midió luego en un fluorómetro de resolución temporal utilizando VARIOSKAN FLASH. La liberación específica se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ liberación específica}}{\text{Liberación espontánea}} = \frac{\text{Liberación de experimento} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima}} - \frac{\text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima}}$$

[0124] El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad Prism 6,04. Se utilizó una prueba t pareada para comparar la diferencia entre las células KHYG-1 de eliminación de ARNip CD96 y los grupos de control ($n = 3$).

50 [0125] Se descubrió que la liberación específica se incrementó significativamente en los co-cultivos que contenían las células KHYG-1 de eliminación CD96. Este fue el caso en todas las relaciones E:T (véase Figura 7).

55 [0126] Al correlacionarse la fluorescencia directamente con la lisis celular, se confirmó que la reducción de la expresión de CD96 en las células KHYG-1 daba como resultado un aumento en su capacidad para destruir las células diana del cáncer K562.

Ejemplo 4 - Citotoxicidad mejorada de células NK con un knockdown de CD328 (Siglec-7)Reducción de CD328 mediada por ARNip en células NK-925 Materiales, reactivos e instrumentos.

10 [0127] Los ARNip de control (número de catálogo: sc-37007) y siARN CD328 (número de catálogo: sc-106757) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology. Para lograr eficiencias de transfección de hasta el 90% con una alta viabilidad celular (>75%) en células NK-92 con el dispositivo Nucleofector™ (Nucleofector II, Lonza), se utilizó un kit 15 T de Nucleofector™ de Lonza. RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM, sin antibióticos, se usó para el cultivo posterior a la nucleofección. Se adquirió CD328-APC antihumano de ratón (número de catálogo: 339206) de Biolegend.

Protocolo

15 15 [0128] Para hacer 10 µM de solución de reserva ARNip

- 20 • Resuspender el dúplex de ARNip liofilizado en 66 µl de agua libre de ARNasa (tampón de dilución de ARNip: sc-29527) a FITC-control/control-ARNip, en 330 µl de agua sin ARNasa para el gen diana ARNip (ARNip CD328).
- Calentar el tubo a 90°C durante 1 minuto.
- Incubar a 37°C durante 60 minutos.
- Almacenar la reserva de ARNip a -20°C si no se utiliza directamente.
- 25 • Una muestra de Nucleofección contiene (para cubeta estándar de 100 µl)
- Número de células: 2×10^6 células.
- ARNip: 4 µl de reserva de 10 µM
- Solución nucleofectora: 100 µl.

Nucleofección

30 30 [0129]

- 35 • Cultivar el número requerido de células. (Pase de uno o dos días antes de Nucleofección, las células deben estar en fase de crecimiento logarítmico).
- Preparar ARNip para cada muestra.
- Precalentar la solución de Nucleofector a temperatura ambiente (100 µl por muestra).
- Precalentar una porción de medio de cultivo que contenga suero y suplementos a 37°C en un tubo de 50 ml. Preparar placas de 6 pocillos llenando con 1,5 ml de medio de desecho que contiene suero y suplementos y placas pre-incubadas en una incubadora humidificada a 37°C/5% CO₂.
- 40 • Tomar una alícuota de cultivo celular y contar las células para determinar la densidad celular.
- Centrifugar el número requerido de células a 1.500 rpm durante 5 min. Desechar el sobrenadante completamente para que el medio residual no cubra el sedimento celular.
- Resuspender el sedimento celular en solución de Nucleofector a temperatura ambiente hasta una concentración final de 2×10^6 células/100 µl. Evitar almacenar la suspensión celular durante más de 15-20 min en la solución de Nucleofector, ya que esto reduce la viabilidad celular y eficiencia de transferencia de genes.
- 45 • Mezclar 100 µl de suspensión celular con ARNip.
- Transferir la muestra a una cubeta certificada por amaxa. Asegurarse de que la muestra cubra la parte inferior de la cubeta, evitar las burbujas de aire al pipetear. Cerrar la cubeta con la tapa azul.
- Seleccionar el programa Nucleofector apropiado (A-024 para células NK-92). Insertar la cubeta en el soporte de la cubeta (Nucleofector II: girar el carrusel hacia la derecha hasta la posición final) y presionar el botón "x" para iniciar el programa.
- 50 • Para evitar daños en las células, retirar las muestras de la cubeta inmediatamente después de que el programa haya finalizado (la pantalla muestra "OK"). Agregar 500 µl del medio de cultivo precalentado a la cubeta y transferir la muestra a la placa de 6 pocillos preparada.
- 55 • Incubar las células en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂. Realizar análisis de citometría de flujo y ensayo de citotoxicidad después de 16-24 horas.

60 [0130] Resultados: seguimos el protocolo anterior y realizamos un análisis de citometría de flujo del nivel de expresión de CD328 en células NK-92. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Fig. 8, lo que confirma la caída exitosa.

Knockdown de CD328 aumenta la citotoxicidad65 65 Materiales, reactivos e instrumentos.

[0131] El kit de citotoxicidad DELFIA EuTDA basado en el ligando potenciador de la fluorescencia (nº de catálogo: AD0116) se compró a PerkinElmer. Las células diana K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM y antibióticos. Las placas de fondo en V de 96 pocillos (número de catálogo: 83.3926) se compraron a SARSTEDT. Se usó la centrífuga Eppendorf 5810R (con rotor de placa) para girar hacia abajo la placa. VARIOSKAN FLASH (con el software Scanlt 2.4.3) se utilizó para medir la señal de fluorescencia producida por células K562 lisadas.

Protocolo

[0132]

- Cargue células diana K562 con el ligando de mejora de fluorescencia DELFIA reactivo BATDA
- Lave las células K562 con medio, ajuste el número de células a 1×10^6 células/mL con medio de cultivo.
- Añadir 2-4 mL de células a 5 µL de reactivo BATDA, incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Gire hacia abajo a 1.500 RPM durante 5 minutos para lavar las células K562 cargadas de 3 a 5 veces con medio que contiene 1 mM Probenecid (Sigma P8761).
- Despues del lavado final, vuelva a suspender el sedimento celular en medio de cultivo y ajústelo a aproximadamente 5×10^4 células/mL.

Ensayo de citotoxicidad

[0133]

- Configure pozos para detección de fondo, liberación espontánea y liberación máxima.
- Pipete 100 µL de células diana cargadas (5.000 células) en una placa con fondo en V.
- Agregue 100 µL de células efectoras (NK-92) de concentraciones celulares variables. La relación entre efector y objetivo varía de 1:1 a 20:1,
- Gire la placa a 100xg de RCF durante 1 minuto.
- Incube durante 2 horas en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C. Para pozos de liberación máxima, agregue 10 µL de tampón de lisis a cada pocillo 15 minutos antes de cosechar el medio.
- Gire la placa a 500 x g durante 5 minutos.
- Transfiera 20 µL de sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo plano, agregue 200 µL de solución de Europio precalentada, incube a temperatura ambiente durante 15 minutos usando un aparato para hacer platos.
- Mida la fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal utilizando VARIOSKAN FLASH. El lanzamiento específico fue calculado utilizando la siguiente fórmula:
- % de liberación específica = liberación de experimento - liberación espontánea/liberación máxima - liberación espontánea

[0134] Resultados: seguimos lo anterior para determinar el efecto sobre la citotoxicidad de la caída de CD328. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la figura 9, Como se ve, la citotoxicidad contra las células diana se incrementó en las células con la eliminación de CD328.

Ejemplo 5 - Protocolo para la terapia del cáncer de sangre por knockdown/knockout de los receptores inhibidores del punto de control

[0135] Como se demostró en los Ejemplos anteriores, la función del receptor inhibidor del punto de control puede ser derribada o eliminada de varias maneras. El siguiente protocolo se desarrolló para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer de la sangre: después del diagnóstico de un paciente con un cáncer tratado adecuadamente con la invención, se puede descongelar y cultivar una parte alícuota de células NK modificadas antes de la administración al paciente.

[0136] Alternativamente, se puede preparar una mutación transitoria usando, por ejemplo, ARNip dentro de uno o dos días, como se describió anteriormente. La plataforma de electroporación MaxCyte Flow ofrece una solución adecuada para lograr transfecciones rápidas a gran escala en la clínica.

[0137] La eliminación de ciertos receptores inhibidores del punto de control puede ser más beneficiosa que otros. Es probable que esto dependa del paciente y del cáncer. Por esta razón, el cáncer se realiza una biopsia opcional y las células cancerosas se cultivan en cultivo ex vivo. Una variedad de células NK con diferentes modificaciones del receptor inhibitorio del punto de control pueden, por lo tanto, analizarse para determinar la citotoxicidad contra el cáncer específico. Este paso se puede usar para seleccionar la célula NK más apropiada o su derivado para la terapia.

[0138] Tras una modificación exitosa, las células se resuspenden en un vehículo adecuado (por ejemplo, solución

salina) para inyección intravenosa y/o intratumoral en el paciente.

Ejemplo 6 - KHYG-1 Knock-in de la TRAIL/variante TRAIL

5 [0139] Las células KHYG-1 se transfecaron con las TRAIL y variante TRAIL, con el fin de evaluar su viabilidad y capacidad para matar las células cancerosas después de la transfección.

10 [0140] La variante de TRAIL utilizada es la descrita en el documento WO2009/077857. Está codificado por el gen TRAIL de tipo salvaje que contiene la mutación D269H/E195R. Esta mutación aumenta significativamente la afinidad de la variante TRAIL para DR5, mientras que reduce la afinidad para ambos receptores de señal (DcR1 y DcR2).

Expresión de línea de base TRAIL

15 [0141] La expresión de TRAIL (CD253) basal en células KHYG-1 se analizó utilizando citometría de flujo.

[0142] Ratón anti-humano CD253-APC (número de catálogo de Biolegend: 308210) y control de isotypio (número de catálogo de Biolegend: 400122) se usaron para teñir muestras celulares y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II.

20 [0143] Se cultivaron células KHYG-1 en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM, penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 mg/mL) e IL-2 (10 ng/mL). Se recogieron 0,5-1,0 X 10⁶ células/prueba por centrifugación (1.500 rpm durante 5 minutos) y se aspiró el sobrenadante. Las células (suspensión de células individuales) se lavaron con 4mL de tampón FACS enfriado con hielo (PBS, BSA al 0,5 - 1%, NaN3 - azida sódica al 0,1%). Las células se resuspendieron en 100 µL de tampón FACS enfriado con hielo, se añadieron 5µL de anticuerpo a cada tubo y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron luego en 500 ml de tampón FACS enfriado con hielo y se mantuvieron temporalmente en la oscuridad sobre hielo.

30 [0144] Las células se analizaron posteriormente en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II) y los datos generados se procesaron utilizando el software FlowJo 7.6.2.

[0145] Como se puede ver en la Fig. 10, el análisis FACS mostró una expresión de referencia débil de TRAIL en la superficie celular KHYG-1,

Knock-in de TRAIL/variante TRAIL por electroporación

35 [0146] El ARNm de TRAIL de tipo salvaje y la variante de TRAIL (D269H/195R) se sintetizó mediante TriLink BioTechnologies, se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80°C. CD253-APC antihumano de ratón (nº de catálogo de Biolegend: 308210) y control de isotypio (nº de catálogo de Biolegend: 400122) y CD107a-PE antihumano de ratón (nº de catálogo de eBioscience: 12-1079-42) y control de isotypio (nº de catálogo de eBioscience: 12-4714) se usaron anticuerpos para teñir muestras de células y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Se usó el colorante de ADN SYTOX-Green (nº de catálogo de Life Technologies: S7020; Solución 5 mM en DMSO). Para lograr eficiencias de transfección de hasta el 90% con una alta viabilidad celular en células KHYG-1 con el dispositivo Nucleofector™ (Nucleofector II, Lonza), se utilizó un kit T Nucleofector™ de Lonza. Se utilizó RPMI 1640 libre de antibióticos que contenía FBS al 10%, L-glutamina (2 mM) e IL-2 (10 ng/ml) para el cultivo posterior a la nucleofección.

50 [0147] Las células KHYG-1 y NK-92 se pasaron uno o dos días antes de la nucleofección, ya que las células deben estar en la fase de crecimiento logarítmico. La solución de Nucleofector se precalentó a temperatura ambiente (100 µl por muestra), junto con una porción de medio de cultivo que contenía suero y suplementos a 37°C en un tubo de 50 mL. Las placas de 6 pocillos se prepararon rellenando con 1,5 mL de medio de cultivo que contenía suero y suplementos y se incubaron previamente en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂. Se preparó una alícuota de cultivo celular y se contaron las células para determinar la densidad celular. El número requerido de células se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, antes de descartar el sobrenadante por completo. El sedimento celular se resuspendió en una solución nucleofectora a temperatura ambiente hasta una concentración final de 2x10⁶ células/100 µl (tiempo máximo en suspensión = 20 minutos). Se mezclaron 100 µl de suspensión celular con 10 µg de ARNm (volumen de ARN <10 mL). La muestra se transfirió a una cubeta certificada por Amixa (asegurándose de que la muestra cubriera el fondo de la cubeta y evitando las burbujas de aire). Se seleccionó el programa Nucleofector apropiado (es decir, U-001 para células KHYG-1). Las cubetas se insertaron en el soporte de la cubeta. Se agregaron 500 µl de medio de cultivo precalentado a la cubeta y la muestra se transfirió a una placa de 6 pocillos preparada inmediatamente después de que el programa hubo terminado, para evitar daños a las células. Las células se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂. El análisis de citometría de flujo y los ensayos de citotoxicidad se realizaron 12-16 horas después de la electroporación. La tinción de citometría de flujo se llevó a cabo como anteriormente.

65 [0148] Como se puede ver en las Fig. 11 y 12, la expresión de TRAIL/variante TRAIL y el CD107a (marcador de

activación NK) aumentó la post-transfección, confirmando el éxito de la inserción de los genes TRAIL en las células KHYG-1.

[0149] La Fig. 13 proporciona evidencia de la viabilidad de las células KHYG-1 antes y después de la transfección mediante electroporación. Se puede observar que no se observan diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular después de la transfección de las células con la TRAIL/variante TRAIL, lo que confirma que la expresión de TRAIL de tipo salvaje o variante no es tóxica para las células. Esta observación contradice los hallazgos correspondientes en las células NK-92, que sugieren que el gen de la variante TRAIL es tóxico para las células (datos no mostrados). Sin embargo, esto probablemente se explica por los niveles de expresión relativamente altos de los receptores de TRAIL DR4 y DR5 en la superficie de las células NK-92 (véase Fig. 14).

Efectos de la TRAIL/variante TRAIL en la citotoxicidad celular KHYG-1

[0150] Se usó anticuerpo anti-CD2-APC de ratón (nº de catálogo de BD Pharmingen: 560642). Se utilizó el anticuerpo anexina V-FITC (nº de catálogo de ImmunoTools: 31490013). Se usó el colorante de ADN SYTOX-Green (nº de catálogo de Life Technologies: S7020). Se utilizó una placa de cultivo celular de 24 pocillos (nº de catálogo de SARSTEDT AG: 83.3922). Las células celulares de leucemia mielógena K562, la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226 y MM1.S se utilizaron como células diana. K562, RPMI8226, MM1.S se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2mM y penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 mg/mL).

[0151] Como se explicó anteriormente, las células KHYG-1 se transfecaron con la TRAIL/variante TRAIL.

[0152] Las células diana se lavaron y se sedimentaron mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. Las células transfecadas con KHYG-1 fueron diluidas a $0,5 \times 10^6$ /mL. La densidad de la célula diana se ajustó luego en medio RPMI 1640 precalentado, con el fin de producir relaciones de efector:diana (E: T) de 1:1.

[0153] Se mezclaron entonces 0,5 mL de células KHYG-1 y 0,5 mL de células diana en una placa de cultivo de 24 pocillos y se colocaron en una incubadora humidificada a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 durante 12 horas. El análisis de citometría de flujo se utilizó luego para analizar la citotoxicidad de las células KHYG-1; las células cultivadas (en diferentes momentos) se lavaron y luego se tiñeron con el anticuerpo CD2-APC (5 μL /prueba), Anexina V-FITC (5 μL /prueba) y SYTOX-Verde (5 μL /prueba) usando Anexina V tampón de unión.

[0154] Los datos se analizaron adicionalmente usando el software FlowJo 7.6.2. Se establecieron puertas CD2-positivas y CD2-negativas, que representan las poblaciones de células KHYG-1 y células diana, respectivamente. Las células positivas Anexina V-FITC y SYTOX-Green en la población negativa para CD2 se analizaron para detectar apoptosis inducida por TRAIL.

[0155] Las Figs. 15, 16 y 17 muestran los efectos de ambas células KHYG-1 que expresan la TRAIL o variante TRAIL en la apoptosis para las tres líneas celulares diana: K562, RPMI8226 y MM1.S, respectivamente. Es evidente para todas las poblaciones de células diana que la expresión de TRAIL en las células KHYG-1 aumentó el nivel de apoptosis, en comparación con las células normales KHYG-1 (no transfecadas con TRAIL). Además, la expresión de la variante de TRAIL en las células KHYG-1 aumentó aún más la apoptosis en todas las líneas celulares diana, en comparación con las células KHYG-1 transfecadas con TRAIL de tipo salvaje.

[0156] Las células de la invención, que expresan la variante de TRAIL, ofrecen una ventaja significativa en la terapia del cáncer, debido a que muestran afinidades más altas para el receptor de muerte DR5. Cuando son desafiadas por estas células de la invención, se evita que las células cancerosas desarrollen estrategias defensivas para evitar la muerte a través de un cierto camino. Por lo tanto, los cánceres no pueden eludir eficazmente la muerte celular inducida por TRAIL mediante la regulación al alza de los receptores de señuelo TRAIL, ya que las células de la invención se modifican para que permanezcan citotóxicas en esas circunstancias.

Ejemplo 7 - Protocolo para el tratamiento del cáncer de sangre utilizando células NK con variantes de TRAIL integradas

[0157] Las células KHYG-1 se transfecaron con la variante TRAIL, como se describe anteriormente en el Ejemplo 6. El siguiente protocolo se desarrolló para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer de la sangre: Tras el diagnóstico de un paciente con un cáncer tratado adecuadamente con la invención, se administra un agente inductor de DR5, por ejemplo Bortezomib, antes de la administración de las células NK modificadas, y por lo tanto se usa a dosis bajas para aumentar la expresión de DR5 en el cáncer, haciendo más efectiva la terapia con células NK modificadas.

[0158] Una parte alícuota de células NK modificadas se descongela luego, se cultiva y se administra al paciente.

[0159] Dado que la variante TRAIL expresada por las células NK utilizadas en la terapia tiene una afinidad más baja por los receptores señuelo que TRAIL de tipo salvaje, hay una mayor unión de los receptores de muerte en la superficie de las células cancerosas y, por consiguiente, como resultado una mayor apoptosis de las células

cancerosas.

[0160] Otra opción, antes de la implementación del protocolo anterior, es la realización de una biopsia del cáncer y cultivar células cancerosas ex vivo. Este paso se puede usar para identificar los cánceres que expresan niveles particularmente altos de receptores señal y/o niveles bajos de receptores de muerte, para ayudar a determinar si un agente inductor de DR5 es apropiado para un paciente determinado. Este paso también puede llevarse a cabo durante la terapia con el protocolo anterior, ya que un cáncer dado podría adaptarse para, por ejemplo, reducir su expresión de DR5 y, por lo tanto, puede ser adecuado para tratar con un agente inductor de DR5 a la mitad del tratamiento.

Ejemplo 8 - El bortezomib de dosis baja sensibiliza las células cancerosas a las células NK que expresan la variante TRAIL

[0161] El bortezomib (Bt) es un inhibidor del proteasoma (fármaco similar a la quimioterapia) útil en el tratamiento del mieloma múltiple (MM). Se sabe que Bortezomib regula al alza la expresión de DR5 en varios tipos diferentes de células cancerosas, incluidas las células MM.

[0162] Las células KHYG-1 fueron transfectadas con la variante TRAIL, como se describe anteriormente en el Ejemplo 6, antes de ser usadas para atacar células MM con o sin exposición a Bortezomib.

Expresión de DR5 inducida por bortezomib

[0163] Bortezomib fue comprado de Millennium Pharmaceuticals. El ratón anti-humano DR5-AF647 (nº de catálogo: 565498) se compró a BD Pharmingen. Las muestras de células teñidas se analizaron en BD FACS Canto II.

(1) Las líneas celulares MM RPMI8226 y MM1.S se cultivaron en medio RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementadas con L-glutamina 2mM, HEPES 10 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, 0,01% de antibióticos y 10% de suero bovino fetal (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C.

(2) Se sembraron células MM en placas de 6 pocillos a 1x10⁶/ml, 2 mL/pocillo.

(3) Las células MM se trajeron con diferentes dosis de Bortezomib durante 24 horas.

(4) La expresión de DR5 en células MM tratadas con Bortezomib/no tratadas fue luego analizada por citometría de flujo (Fig. 18).

[0164] Se encontró que el tratamiento con bortezomib de dosis baja aumentaba la expresión de DR5 en ambas líneas celulares MM (Fig. 18). La regulación positiva de DR5 se asoció con una inducción menor de apoptosis (datos no mostrados). Se encontró, sin embargo, que la expresión de DR5 no podía ser regulada al alza por altas dosis de Bortezomib, debido a la alta toxicidad que causaba que la mayoría de las células MM murieran.

Sensibilización inducida por bortezomib de células cancerosas

[0165] Las células KHYG-1 se transfectaron con la variante TRAIL (TRAIL D269H/E195R), como se describe anteriormente en el Ejemplo 6,

(1) Las células MM1.S tratadas/no tratadas con Bortezomib se usaron como células diana. Las células MM1.S se trajeron con 2,5 nM de Bortezomib o vehículo (control) durante 24 horas.

(2) 6 horas después de la electroporación del ARNm variante de TRAIL, las células KHYG-1 se cultivaron luego con células MM en una placa de 12 pocillos. Después del lavado, las concentraciones celulares se ajustaron a 1x10⁶/mL, antes de mezclar las células KHYG-1 y MM1.S en una proporción 1:1 con el cultivo durante 12 horas.

(3) Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo de la citotoxicidad de las células KHYG-1. Las células co-cultivadas se recolectaron, se lavaron y luego se tiñeron con el anticuerpo CD2-APC (5 uL/prueba), AnnexinV-FITC (5 uL/prueba) y SYTOX-Green (5 uL/prueba) utilizando el tampón de unión AnnexinV.

(4) Los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software FlowJo 7.6.2. La población CD2 negativa representa células MM1.S. Las células KHYG-1 son fuertemente positivas para CD2. Finalmente, se analizaron las células positivas para AnnexinV-FITC y SYTOX-Green en la población negativa para CD2.

[0166] El análisis citométrico de flujo de la apoptosis se realizó en células MM1.S pretratadas/no tratadas con Bortezomib co-cultivadas con células KHYG-1 electroporadas con/sin variante TRAIL (Fig. 19).

[0167] Se encontró que Bortezomib indujo la sensibilidad de las células MM a las células KHYG-1 que expresan la variante TRAIL. Por lo tanto, los datos indicaron que un agente que indujo la expresión de DR5 fue efectivo en el modelo para aumentar la citotoxicidad contra las células cancerosas y, por lo tanto, puede ser útil para mejorar la terapia contra el cáncer de la presente invención.

Ejemplo 9 - Confirmación de la apoptosis inducida por la variante TRAIL

[0168] A pesar de la evidencia concluyente de un aumento de la citotoxicidad de las células NK como resultado de la expresión de la variante TRAIL en los ejemplos anteriores, quisimos confirmar si el aumento de la citotoxicidad resultó de la inducción de la apoptosis de las células cancerosas (lo más probable) o de la activación inadvertida de las células NK para exhibir un fenotipo más citotóxico y, por tanto, mata las células cancerosas a través de la secreción de perforina.

[0169] Se ha demostrado que la concanamicina A (CMA) inhibe la actividad citotóxica mediada por perforina de las células NK, principalmente debido a la degradación acelerada de la perforina por un aumento en el pH de los gránulos líticos. Investigamos si la citotoxicidad de las células KHYG-1 que expresan la variante TRAIL podría destacarse cuando la citotoxicidad mediada por perforina se eliminó parcialmente con la CMA.

Reducción de la expresión de perforina inducida por CMA

[0170] Se adquirió perforina-AF647 de ratón (nº de catálogo: 563576) de BD pharmingen. Concanamicina A (nº de catálogo: SC-202111) se compró a Santa Cruz Biotechnology. Las muestras de células teñidas se analizaron utilizando un BD FACS Canto II.

- (1) Las células KHYG-1 se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% (suero bovino fetal), L-glutamina 2mM, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 mg/ml) e IL-2 (10 ng/ml).
- (2) Se trataron adicionalmente células KHYG-1 (6 horas después de la electroporación, cultivadas en medio RPMI1640 libre de penicilina/estreptomicina) con CMA 100 nM o un volumen igual de vehículo (DMSO) durante 2 horas.
- (3) Las células se recogieron (1×10^6 células/prueba) por centrifugación (1.500 rpm durante 5 minutos) y se aspiró el sobrenadante.
- (4) Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución de PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- (5) Las células se lavaron con 4 mL de tampón FACS (PBS, BSA al 0,5-1%, azida sódica al 0,1%) dos veces.
- (6) Las células se permeabilizaron con 1 ml de tampón PBS/saponina al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- (7) Las células se lavaron con 4 mL de PBS/0,1% de tampón saponina.
- (8) Las células se resuspendieron en 100 uL de PBS/0,1% de tampón de saponina, antes de agregar 5 uL del anticuerpo a cada tubo e incubar durante 30 minutos en hielo.
- (9) Las células se lavaron con PBS/tampón de saponina al 0,1% 3 veces mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. (10) Las células se resuspendieron en 500 uL de tampón FACS helado y se mantuvieron en la oscuridad en hielo o a 4°C en una nevera brevemente hasta su análisis.
- (11) Las células se analizaron en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II). Los datos fueron procesados utilizando el software FlowJo 7.6.2.

[0171] El tratamiento con CMA disminuyó significativamente el nivel de expresión de la perforina en células KHYG-1 (Fig. 20) y no tuvo efectos negativos en la viabilidad de las células KHYG-1 (Fig. 21).

Citotoxicidad de las variantes de TRAIL de células NK en presencia de CMA

[0172] Las células KHYG-1 se transfecaron con la variante TRAIL (TRAIL D269H/E195R), como se describe anteriormente en el Ejemplo 6,

- (1) Se usaron células MM1.S como células diana.
- (2) 6 horas después de la electroporación del ARNm de TRAIL, las células KHYG-1 se trataron con CMA 100 mM o un volumen igual de vehículo durante 2 horas.
- (3) Las células KHYG-1 se lavaron con medio RPMI1640 mediante centrifugación y se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía IL-2, ajustando las concentraciones celulares a 1×10^6 /mL.
- (4) Las células MM1.S se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía IL-2 ajustando las concentraciones de células a 1×10^6 /mL.
- (5) Las células KHYG-1 y MM1.S se mezclaron en una proporción de 1:1 y se cultivaron conjuntamente durante 12 horas.
- (6) Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo de la citotoxicidad de las células KHYG-1. Las células cocultivadas se lavaron y se tiñeron con anticuerpo CD2-APC (5 uL/prueba).
- (7) Después del lavado, se realizó una tinción adicional con AnnexinV-FITC (5 uL/prueba) y SYTOX-Green (5 uL/prueba) utilizando el tampón de unión AnnexinV.
- (8) Los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software FlowJo 7.6.2. La población CD2 negativa representa células MM1.S. Las células KHYG-1 son fuertemente positivas para CD2. Luego se analizaron las células positivas para AnnexinV-FITC y SYTOX-Green en una población negativa para CD2.

[0173] Se mostró de nuevo que las células NK que expresan la variante de TRAIL muestran una mayor citotoxicidad que las células de control que carecen de expresión de la variante de TRAIL (Fig. 22). En este Ejemplo, sin embargo, se demostró además que CMA no pudo disminuir significativamente la actividad citotóxica de las células

NK que expresan la variante TRAIL, en contraste con el hallazgo de células NK de control tratadas con CMA.

[0174] Se demostró que las células NK sin la variante TRAIL (control o células NK simuladas) inducen 48% de muerte de células cancerosas en ausencia de CMA y 35,9% de muerte de células cancerosas en presencia de CMA (Fig. 22). Las células NK que expresan la variante TRAIL pudieron inducir más muerte de células cancerosas que las células NK de control, tanto en presencia como en ausencia de CMA. De hecho, incluso con la presencia de CMA, las células NK que expresan la variante TRAIL indujeron más muerte de células cancerosas que las células NK de control en ausencia de CMA.

[0175] Por lo tanto, estos datos muestran la importancia de la variante TRAIL para aumentar la citotoxicidad de las células NK contra las células cancerosas a través de un mecanismo menos susceptible a la regulación por disminución relacionada con la perforina. Dado que las células NK utilizan comúnmente la perforina para destruir las células diana, y muchas células cancerosas han desarrollado mecanismos para reducir la expresión de la perforina de las células NK, con el fin de evadir el ataque citotóxico, las células NK de la invención representan una poderosa alternativa menos susceptible de atenuación por células cancerosas.

Ejemplo 10 - Expresión combinada de la variante de TRAIL mutante y knockdown del CD96 del receptor inhibidor del punto de control en células KHYG-1

[0176] Se observaron aumentos en la citotoxicidad de las células NK al eliminar la expresión del receptor CD96 inhibidor del punto de control y también al expresar la variante TRAIL. También ensayamos la combinación de las dos modificaciones genéticas para provocar un efecto sinérgico en la citotoxicidad de las células NK.

[0177] La expresión de CD96 se redujo en células KHYG-1, como se describe en el Ejemplo 2.

[0178] Se transfectaron células KHYG-1 con la variante TRAIL (TRAIL D269H/E195R), como se describe anteriormente en el Ejemplo 6.

(1) 12 horas después de la electroporación, las células KHYG-1 se cultivaron conjuntamente con células diana (K562 o MM1.S) a una concentración de 1×10^6 /mL en placas de 12 pocillos (2 mL/pocillo) durante 12 horas. La relación E:T fue de 1:1,
(2) 12 horas después del cocultivo, las células se recogieron, se lavaron, se tiñeron con CD2-APC, se lavaron de nuevo y se tiñeron nuevamente con AnnexinV-FITC (5 uL/prueba) y SYTOX-Green (5 uL/prueba) usando AnnexinV tampón de unión.

(3) Las muestras celulares se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACS canto II. Los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software FlowJo 7.6.2. La población CD2 negativa representa células MM1.S. Las células KHYG-1 son fuertemente positivas para CD2. Luego se analizaron las células positivas para AnnexinV-FITC y SYTOX-Green en la población negativa para CD2.

[0179] Al mismo tiempo, se eliminó la expresión de CD96 y se expresó la variante de TRAIL en las células KHYG-1 para aumentar sinérgicamente la citotoxicidad de las células contra las células diana K562 (Fig. 23) y las células diana MM1.S (Fig. 24). Esto fue indicado por el hecho de que en ambos grupos de células diana, más muerte celular resultó de la modificación genética simultánea que resultaron de las modificaciones individuales en aislamiento.

[0180] Al mismo tiempo, se obtuvieron pruebas adicionales que demuestran que la eliminación de CD96 aumenta la citotoxicidad de las células NK (Fig. 23 y 24), además de pruebas adicionales que muestran la expresión del mutante TRAIL/variante aumenta la citotoxicidad de las células NK (Fig. 23 y 24).

[0181] La invención proporciona así células NK y líneas celulares para uso en terapia de cáncer de sangre.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0182]

55 <110> Onkimmune Limited

<120> CÉLULAS ASESINAS NATURALES MODIFICADAS Y LÍNEAS DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES QUE HAN AUMENTADO LA CITOTOXICIDAD

60 <130> P40153EP

<160> 12

<170> PatentIn versión 3,5

65 <210> 1

ES 2 876 938 T3

<211> 9540
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 1

	ctctggcctc tgttcttct tggagtcgg tctacacttg gggttccac atgtctttt	60
10	ctgctcatga ctttgatact ctgggtattt cagaatgtt acacatacgt ttctccatta	120
	cggtcagatg tgacatctt agtggactca tcaatcacct acagaatgtg gagtccaaca	180
15	gcaagatcct ctcacgtccc aaagcctcag gtcttaccct ggtctggaaa tcaaggccaa	240
	atgagccct cccaatgtcc caggcaccac tgacccaca accactgtga cgagtggat	300
20	tcatgacaac aatctgc当地 ggaagaaaact gaggctcagt gatggacat tacaaaccaa	360
	ggtcacgtag gcagcggatg ataaccagtc atcaaataaa tatcaactcc ctccccact	420
	ccccaaatca aagctcaaac ataagtattt gttccaaaaa tgttgaccag gaattgaggt	480
25	gcagagggac ggctaaggac gcaatggca ccgaggaggc agggaaagact cagaggttc	540
	ttcccgaaaa ggagggagtg gacgctggag caaaaacatt taaaaagggg aagttaagag	600
	gggactattt ggttgaaaga aaacccacaa tccagtgtca agaaagaagt caactttct	660
30	tcccctactt ccctgcattt ctctctgtg ctcaactgcc cacacagctc aacctggaca	720
	gcacagccag aggcgagatg cttctctgtt gatctgagtc tgccctgcagc atggacctgg	780
35	gtctccctg aagcatctcc agggctggag ggacgactgc catggtaagg accccacaaac	840
	gctgtgctga tggatggctt gaaggaggga gggtgaccat gtggaaagct gtgagaagga	900
	aggggaagcc actgctaccc tcattcaggaa gggcagacac aagaagcacc agttctattt	960
40	gctgctacat cccggctctc ggtgagacga ggagaaacca gacagacagt ggctgggggt	1020
	caggaaagac cccattacag tctgaaatgt ctgcagaggg cccagtgcct gccccacct	1080
45	cagctctaaa agaatgagag tcaggctctt gggagggcag ttccgcttct tggatggctg	1140
	cagatgacaa cacccatga gaaggaccca gcctctgagt gtccacacag ggtggaaagg	1200
	aggggaggct atttctctt gtgtgtctt gtcccgccag caccgaggc tcattccatcc	1260
50	gcagagcagg gcagtggag gagacgccat gacccatc gtcacagtcc tgatctgtct	1320
55		
60		
65		

ES 2 876 938 T3

	cggtgagatt tgaagagaga gggagcttc taacctagga gggacctcac cccacagcca	1380
5	aactctggtc cctaaggaga ccccaggggc tcacaaagat cccagggagg ggaggacctg	1440
	ctcaggcttc agggggcaaa tccctcacag ggaactctct tccagggctg agtctgggcc	1500
	ccaggacccg cgtcagaca ggtgagtctg tccccagctc tcccaggtcc ctccctcctca	1560
10	ctggggacaa ggggccacct ccgtcagct ggggatgggg attagaagtt ctggactgac	1620
	tgtatggggc atctggaggg tcctggctg agagctgaga tctgttgggt gggaaatgac	1680
15	ttcgaatctg acctttgatt tccttcagg gaccatcccc aagcccaccc tgtggctgta	1740
	gccagactct gtgatcaccc aggggagtcc cgtcaccctc agttgtcagg ggagccttga	1800
	agcccaggag taccgtctat atagggagaa aaaatcagca tcttggatta cacggatacg	1860
20	accagagctt gtgaagaacg gccagttcca catcccatcc atcacctggg aacacacagg	1920
	gcgatatggc tgtcagtatt acagccgcgc tcgggtgtct gagctcagtg accccctgg	1980
25	gctggtgatg acaggtgaga ggacactca ggtatcccagg cccaggctct gccctcagga	2040
	aggaggctct caggggtgtc tccctctcac agcccagccc tggggatgtat gtgggaggtg	2100
	ggagccccat ttaacacat gcctccttct ctccttagag cctacccaaa acccaccctc	2160
30	tcagcccagc ccagccctgt ggtgacactca ggaggaaggg tgaccctcca gtgtgagtca	2220
	caggtggcat ttggcggctt cattctgtgt aaggaaggag aagatgaaca cccacaatgc	2280
35	ctgaactccc agccccatgc ccgtgggtcg tcccgcgccca tcttctccgt gggccccgtg	2340
	agcccgaaatc gcaggtggtc gcacaggtgc tatggttatg acttgaactc tcccttatgt	2400
	tggtcttcac ccagtgtatc cctggagctc ctggtcccag gtgagaaatt cacagcattg	2460
40	tctggagttc cctgagtttc cctgagtttc caggcaggtg gggagcagcc gtgtctcagg	2520
	gcagttccag gtgggatgtat gtggggcga gagggctca gggtcctggg gccagagaca	2580
	caggaagatc agcagtggtg aggacccggg ggagagggag ggtttgtggg gaagcctgag	2640
45	ggtcggctcc tggaaaccat gagcaccttt tcccaggtgt ttctaagaag ccatactct	2700
	cagtgcagcc gggcctgtc atggccctgt gggaaaggct gaccctccag tgtgtctctg	2760
50	atgtcggcta tgacagattt gttctgtaca aggaggggaa acgtgacattt cggccagctcc	2820
	ctggccggca gccccaggct gggctctccc aggccaacctt caccctgggc cctgtgagcc	2880
	gctcctacgg gggccagtac agatgctacg gtgcacacaa cctctctct gagtgtctgg	2940
55	cccccaagcga cccccctggac atcctgtatca caggtgagga gcccagcggg ttcagtcagg	3000
	gacccagact ctgcacaggc cctgccgggg gaatccaatt agtgtatggcc aggatgaggc	3060
60	gggggggttgtt cccaaaggag ggagagacag agagagagac aggggatggg tggggagggg	3120
	aagactcaga gaaaacagag acagaggctc ctagagaggc ctggggaggt ctcagctcag	3180
	agcaagggtgg ggcagccctt caccatctt tcttctctcc aggacagatc cgtggcacac	3240
65		

ES 2 876 938 T3

	ccttcatctc agtgcagcca ggccccacag tggcctcagg agagaacgtg accctgtgt	3300
5	gtcagtcatg gcggcagttc cacacttcc ttctgaccaa ggccggagca gctgatgccc	3360
	cactccgtct aagatcaata cacgaatatac ctaagtacca ggctgaattc cccatgagtc	3420
	ctgtgacctc agcccacgcg gggacctaca ggtgctacgg ctcactcaac tccgaccct	3480
10	acctgctgtc tcacccagt gagccctgg agctcggtt ctcaggtggg ggccttgacc	3540
	ctgtcctctc tgagctaaa ggctcagtc aggccctgcc ccccaggaga gctctggct	3600
	gggatggagt gagcgggggt ctgagcgggg ctcagccagt gggagactca ccctcagagg	3660
15	gaaggaggac aacaggccct cccaggcctg cgcacactca gcccacatcgc cagcatcatg	3720
	gacaggagag gcgggtggag ggagggccct ggggaggcca cagggcccat gtagagaaat	3780
20	ttggttttag gtggagactt caggaaagcc ccagctcctc accctctct cattttca	3840
	cccaggaccc tccatgggtt ccagcccccc accccaccggt cccatctcca cacctggta	3900
	gtccctgagg cctctggctc gaagggagcg cagcggacccc cagggcagct ttgagtgcc	3960
25	aggaggatcc cattcccttc agggactcaa tcaaggcctt ctgtccaggg agctggcag	4020
	agccagagga ggggccacag ggtccccagg gctctgagc tgggatggtg aggggtgggg	4080
	ggtcaaggca gagagaaatg ttggggccca gcctggggga ggagcagccg ggctgatgtg	4140
30	gggagcaggg cagccccagc ctcacactcc ccgtcctgac ccagcaggcc ctgaggacca	4200
	gcccctcacc cccactgggt cgatccccaa aagtggtagtg tgagggctc tgagtggag	4260
	gtggcgggg tccccggggag gcaggggtgg gttctgtctt aggttcaggc tcctctggag	4320
35	gtgggtatgt agacaggctc ctccccgtcc tgggcctcag tttctccaag tgtaaaggag	4380
	agaggcctgc aggtggaaaa gttcctttca gctctcaactc ccagctgtga ctcctggga	4440
40	gaggaggccc ctcagggaaag actccaagac tcgattccgc gggggcctgt cccgtccac	4500
	ctgcagcaga gacgggtgacc tggggcaggg gagggggagca gagtcgttgt tcaggacgg	4560
	aaggctctt ccctgcagct ccggggctcg gctctggta aggaacaagg gctgcaggta	4620
45	agactcccgag gctcccttcc cagctctgcc gttctctggc tggggggcccg gggcaggcga	4680
	ttccctctc tgagcgtcag ttttcatct ttagagtggtt tgggggtggat gtttgtgtgc	4740
	tgcacgactg ttgtgggggt tggaggttgtt gaacagaagg tccagcagtc acctgcacac	4800
50	ataggcgtcatttcaatg acatcaccatc catccctgac atcatcgtgc tcaaggtctg	4860
	ggaaggcacc tgggggttgtt gatcggcatttggccg tcgtcctact gtccttcctc	4920
	ctccctctcc tcttcctcat cctccgacat cgacgtcagg gcaaacactg gacatcgagt	4980
55	gagtagggaa gggaaaccc tggggccga ccgagggtgg gtcaggcga cagccaaaga	5040
	aatccaaac cactggccaa atgcagcttt gagaaactgt tccagcattt ctcaccaggt	5100
60		

ES 2 876 938 T3

	gaatggagaa agcacttaac gtcagtccca tctacaataaaa taaagtgtcc tccgggctca	5160
5	gtccccatcta caaatgtaaa gtgtccttcg gactctgtcc atctcatgag gcatttgaa	5220
	catggaggca ggagtgttt taggttccct tccttacctt cgagctgtgt gtgcagggca	5280
10	gggggctcca atgttcccag ggctgaggct ctgtccttct tccccagcc cagagaaagg	5340
	ctgatttcca acatcctgca ggggctgtgg ggccagagcc cacagacaga ggcctgcagt	5400
	ggaggttaatt ctgcccgaag accccagact cccacctgct cgtggccat acactgcccc	5460
15	taaagctccc attcctcccc caggtccagc ccagctgccc acgcccagga agaaaacctc	5520
	tgtgagttag aggaagaggt gaccagccag gagggagata ggggccccga agtttccgta	5580
	gcaatgggaa aaggggcacc ggctggaaag ggtctggggc tcagggtgag atcatctcac	5640
20	cccacactgt gggacactcag ggacattgca gcccctccct gcatctcagt agccccatct	5700
	gggagcaggc caggggctgg caggactcag aggtcccagg gaaccttccc aagagacgaa	5760
25	cccctgctc tgccccagca gatgctgccc tgaaggacac acagcctgaa gatggggtgg	5820
	agatggacac tcgggtgaga ccccgccccct gtcccaggca ccaaaggcct cctggtgcca	5880
	gatctaattcc agcaggactt ctctgtcctc otccccccgg ctctcagcat cgtcacggtg	5940
30	gacccttact tgtccagcac gctgactccc gcatgctgtg acctcactct ctctgctgt	6000
	cctggacact cgtgggcctc ctccgggtc cccttcctgc tcctcatcct ctgtttggcc	6060
35	gtctgggtgt tagagcgctc cccaggcctc tggaggatga ggaataaatg aaccaccccg	6120
	gtccccctggg ctccccattca ttcatcaac cagttagtgt tcccaggag ctcactgtgg	6180
	atcaggctcc ccatgggagc tgcagacaca gcagggagca aagccgcccc cgcctcctga	6240
40	gctcacctca tgggtggaga caaaatgcaa ataaatgcgc catgtccagg agtgcaacgt	6300
	gcttaaagga acatacacca gggaaaggc agagagtgtg gggcagtggg gccagtctga	6360
	atggaagggg agggctgtct gtcagctgt catctgagaa gcctggacag agtggggcac	6420
45	acgatcctct aatggacgag cccctgcagg cagagaaac agccgtgcaa aggccccgag	6480
	gcagcagcga gtcattgcgg gaaggccat gaggctgcag ccaaattggc aaggtcaaag	6540
50	tgaggagcag aggccagaac cacaggaagg gagcggccag accctccacg gccttagggc	6600
	gtccctgaga ttccatcgaa aaaggatgt aatcgatca ccccgaaac agtgaggaaa	6660
	attgactcca ggaggtcagg gggactcaag gacacccccc accactgtct ctctccagca	6720
55	gagccacat gatgaagacc cccaggcagt gacatatgcc ccggtaaaac actccagacc	6780
	taggagagaa atggcctctc ctccctcccc actgtccggg gaattcctgg acacaaagga	6840
	cagacaggca gaagaggaca gacagatgga cactgagaga gtccttcct ctccaggccc	6900
60	ccaggcctcc cccaccccca ccacgttccct tacctctcac tctccccggc tgcaggctgc	6960
	tgcattcgaa gccccccagg atgtgaccta cgcccagctg cacagttga ccctcagacg	7020

ES 2 876 938 T3

	gaaggcaact gagcctcctc catcccagga aaggaaacct ccagctgagc ccagcatcta	7080
5	cggccaccctg gccatccact agcccgagg gtacgcagac tccacactca gtagaaggag	7140
	actcaggact gctgaaggca cgggagctgc ccccagtgg a caccatgaa ccccagtctag	7200
10	cctggacccc taacaaagac catgaggaga tgctggaaac tttggactc acttgattct	7260
	gcagtcgaaa taactaatat ccctacattt tttaattaaa gcaacagact tctcaataat	7320
	caatgagttt acccgagaaaa ctaaaatcag aagtaagaat gtgctttaaa ctgaatcaca	7380
15	atataaaat tacacatcac acaatgaaat tgaaaaagta caaaccacaa atgaaaaaaag	7440
	tagaaacgaa aaaaaaaaaac taggaaatga atgacgttgg ctttcgtata aggaatttag	7500
	aaaaagaata accaattatt ccaa atgaaag gtgtaagaaa gggataaga agaagaagag	7560
20	ttgctcatga ggaaaaacca aaacttggaaa attcaacaaa gccaatgaaag ctcatttttg	7620
	aaaatattaa ttacagtcat aaatccta ac tacattgagc aagagaaaga aagagcaggc	7680
25	acgcatttcc atatgggagt gagccagcag acagcccagc agatcctaca cacattttca	7740
	caaactaacc ccagaacagg ctgcaaacct ataccaatat actagaaaat gcagattaaa	7800
	tggatgaaat attcaaaact ggagtttaca taatgaacgt aagagtaatc agagaatctg	7860
30	actcatttta aatgtgtgt tatgtgtgt tatatatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgt	7920
	tgtgtgtgaa aaacattgac tgtaataaaa atgttcccat cgtatcaact ccagttcagg	7980
35	aagtttcaact ggtgatttct tacaatattt gacgcactaa tgaaacacac aaacacaccc	8040
	agagcatcac aaatgtttct tgagaataga aaaagaggca atgtccccgg gtgcgggtggc	8100
	tcacgcctgt aatctcaaca cctaggggagg cagaggccac agattactg aggccgggag	8160
40	ttcaagacca gcatggccaa caaggcaaaa ccccatctt actaaaaata caaaaattag	8220
	ctggacatgg tggcgacacgc tgcaatccca gctacttggg aggcagaggc aggaggatca	8280
	cttgaatgaa cccgggaggt ggaggttggaa gtgagcaaaa acaaaccccc tacaattcag	8340
45	cctaggatat gtttatttttttttacatttgc tctttttct taagattgtt ttgttattca	8400
	tcctctttttt ggttccatata gaatttttagg attttttct aattctgtga aaaaaatgtat	8460
50	gttgatattt tgatggaaat tgcattgaac ctaaatattt gttggaaag tgtgatcatt	8520
	ttcacaatata tgattctgcc aatccatgag catggatata atttcttattt tgctgtgtca	8580
	tctacgattt ctttctgcag catttttttgc ttcttcttgc agagatcttt cacctcctca	8640
55	gttaggtata ttcttagata ttttttttttttgcactg atgtacaagg gattgagttt	8700
	tgcagcaacc tggatgagct ggaggccatt attcatgaca ccacatccag ctaatttttgc	8760
60	tatttttttttgcactg atgtacaagg ttttgcatttgc ttttttttttttgcactg ttttgcatttgc	8820
	caagtgaccc gcccccccttgc acctcccaaa gtgctggac tgcaggcatg agccacgggtg	8880

ES 2 876 938 T3

	cctggccat catagcactt ttgatcatta ggataattcc ttctccttgt catttttggaa	8940
5	cacatgcttc ccacatgcct catctccag agagggttc caccaggct gtgtgggag	9000
	ttaaggctgg aaaaggggag atgggccac ctgccagtgc cacatgagtc tactcaggc	9060
10	tgttaaccagc agggagggtc cagtgtgagc ctcagactcg catgtggac agacgcccatt	9120
	gtgtgacaac gctgcagtga atctgtttca cacacatgga ggaggccgct cagggctgac	9180
	catggacctg agtcaatgag cagagatatac ccagtgccat ccacaaaac acggggagaag	9240
15	gagccacaac ttcccactt catccaaaac cccgaccctt ccctgtctgt gagggccctg	9300
	gggttctcct ctgtctcata cagaggcaga aacccccc ttagtgaccc ccagctttgc	9360
	aagtccaccag cagccccctcg gcgctggcat cttctgttc ttaaggtttca ctgcctatgaa	9420
20	caggaagtct catttctcat tttcttcatt ggaccatggc tacatatttc agacacattaa	9480
	taagtaggtt ttcccagtgt taggagcaga tgtggctgt tgagcacata agtcaactcac	9540
25	<210> 2 <211> 101 <212> PRT <213> Homo sapiens	
30	<400> 2	

35	Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala Gln Pro Ser Pro Val Val 1 5 10 15	
40	Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala Phe 20 25 30	
45	Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp Glu His Pro Gln Cys 35 40 45	
50	Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser 50 55 60	
55	Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr Gly 65 70 75 80	
60	Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu 85 90 95	
65	Glu Leu Leu Val Pro 100	
	<210> 3 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 3	

ES 2 876 938 T3

	gagtcacagg tggcattgg cg	23
	<210> 4	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
10	cgaatcgcag gtggtcgcac agg	23
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
20	gggagccca ttaaacacga	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
30	gggagactca ggaaactcca	20
	<210> 7	
	<211> 7375	
	<212> ADN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	ctttggacct tcttcaactc tgtttgtct ctgttgagtt aaggcttta agaacacctg	60
	aattcttcc ttctgcaaaa ccagaggcag cttctttcc gcctatttc agtttatttc	120
	ttgtgatttt agttttttc tcttaaccaa atgctaaatg gattnaggag aaataaaactt	180
40	atttgtaaag ctgtcaaggg accattagaa ggatggtgct tcacagatag aatacagttt	240
	ttattaatga tgcctagaca aatcctgcca ttagcccaag ggctcagaaa gttagcagcc	300
45	tagtagtttt ggagttgtca atgaaatgaa ttggactgga tggtaagga tgcccagaag	360
	attgaataaa attgggattt aggaggaccc ttgtactcca ggaaattctc caagtctcca	420
	cttagttatc cagatcctca aagtgaacat gaagcttcag tttcaaattt aatacatttt	480
50	ccatccatgg attggcttgt tttgttcagt tgagtgcctt aggttgtctt ttgcacgtaa	540
	cagctaaacc cacggcttcc tttctcgtaa aaccaaaaca aaaaggcttt ctattcaagt	600
55	gccttctgtg tgtgcacatg tgtaatacat atctggatc aaagctatct atataaagtc	660
	cttgattctg tggggttca aacacatttc aaagcttcag gatectgaaa gttttgctc	720
	tacttcctga agacctgaac accgctccca taaagccatg gttgcctt gatttcagcg	780
60		

ES 2 876 938 T3

	gcacaaggct cagctgaacc tggctaccag gacctggccc tgcactctcc tgtttttct	840
5	tctcttcatc cctgtttct ccaaaggtaa gtgagactt tggagcatga agatggagga	900
	ggtgtttctc ctacctgggt ttcatgtt tcagcagtca aaggcagtga tttatagcaa	960
10	agccagaagt taaaggtaaa actccaatct ggcttggtc gctctgtatt ccagggccag	1020
	caggagcag ttgggcggca gcaaataagg caaagagata gctcagaaca gagcgccagg	1080
	tatttagtag gggcttcatg aatgcatgtg agttggttt gtagagagac acaggcaatt	1140
15	tcagaccctt ctagagact ggaagtgtt taagagggaa aggatagcca tagtcctgaa	1200
	tacatttgag ctgggttca ggatgagctc acaagttcct taaaaaaaaa ttgacttaag	1260
20	caaattcctgg gaagagttt ttgtctatac aattcaaggt ttaagggtcc tcggattcat	1320
	atactttata aatgaattag ccagcttggtt taaaatgttag ggaaattgtg ggaagaatgc	1380
	cttcttact taattcaagg ttttaagggt ctcttaatca attctactag ctaattagcc	1440
25	aattatttaa aaataaaaagt ttgaaattgc caaaaaaaaaa agacaaggaa aaggaaagaa	1500
	agaaagccac cagtctgttt ggcataacaat acttaattgt tgcctgacct acgtgtgggt	1560
30	ttcagatgca gatcctcagt ttctagctct tcagagactg acaccagggt ttttacacgg	1620
	cttaaaatga tgagtatatc cattgaatct caaccttatac tctctctaga ccttcttgggt	1680
	taagaaacca tttttttttt atgaagtagg tactcaaaag atatttgcg atttaatttt	1740
35	tactggagaa gaaatattca tatatgtttt ctatttta catgtttaa atatgtaaag	1800
	attaaataaa cactctttaga agtatttaaa ttccctaaag taaatttatac tcaaccagta	1860
	acaggaccct cccaaatactg gaaaggtagg tttttttttt atgagtgtga	1920
40	gcttgcttgg ggagagggca ggacatttag gatttcttaa gcttagagtc aatacaataa	1980
	agattattga gtgctcactt ggggtggcta taatcactgc tcacaggagt tcatgaacca	2040
45	caagtaaaag agtggggaaa tatgatttagc tcacaaataa cttaatatac gagcggaaaag	2100
	taatgaacta ctgcaatggaa gttatcacag tgcttaaggat gctcagaggg catctctgtat	2160
	aggcagaggt gagggttagg gaaggaagct gtatgttagc tagctagagc tgctggaaa	2220
50	gacatgacaa tggctgctgc caaactgttt tctcttctga ggacagatgt cccgtgcaag	2280
	tggcttgggtt gaaaggacta gtgtctctaa tataagggtga tttataagca ggaaagtgtg	2340
55	tccttagaaat tcagaccaga gtgatagatt ggaattggat catggggac tcattgaatg	2400
	ttattttttt tattttttt tgctgatcgt gttttttttt tttttttttt ttattttttt ttattttttt	2460
	tgagtgacat catgcaacac aagtttttagt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	2520
60	ctggtagttt acagggaaatgtt aattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	2580
	tctctgtatg gagagctgggtt ctccttatac ctgtggggaaa agagaacaaa ggagcatgggg	2640
	agtgttcaag ggaaggagaaa ataaaggca gagaggcagc ggtgggtgtca ggggaagccc	2700
65		

ES 2 876 938 T3

5	acaggagtt acagcagggt tgcctcaacc tagagaggaa gcgacctggc gccctcggt ctgtggcttc ctcatctaa caacatcttc cactctacaa caatgccagg gaaggcggag gctggtagac tgcataaga cacagctact cctgggtgac agaggtagc ggccagctca ctaagttaggc agaagttttt gacatatact ttgagagata aagcaagatt ctgtacctca acttcagaa tttccccctac cactcattat agttccggag ctatatact octatcattc tatcataacc tttagataacc agagaacata tcatactcatc taattatctc ttactatatg tgaaaaaat gaaggacatg gggaaagtgt gacttgcccc aaatcacata tttcatggta gagccaggc ttctgtttgt catatcagtg ttcttcctgc cacaaccatc ttgaagaatc tatttctcag taagaaaata tctttatgga gagtagctgg aaaacagttg agagatggag gggaggctgg ggggtgtggag aggggaaggg gtaagtgata gattcgttga aggggggaga aaaggccgtg gggatgaagc tagaaggcag aagggttcgc ctgggttgg ccatgaagg gcatgagttc actgagttcc ctggcgttt tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct gctgtggtagc tggccagcag ccgaggcattc gccagcttg tggtagtgc tgcatctcca ggcaaagcca ctgaggtccg ggtgacagtg ctccggcagg ctgacagcca ggtgactgaa gtctgtgcgg caacctacat gatggggat gagttgaccc tcctagatga ttccatctgc acgggcaccc ccagtggaaa tcaagtgaac ctcactatcc aaggactgag ggccatggac acgggactct acatctgca ggtggagctc atgtacccac cgccatacta cctggcata ggcaacggaa cccagattta tgtaattggt gagcaaagcc atttcactga gttgacaccc gttgcattgc agtcttctat gcacaaaaac agtttgcgc cttaatttca ggaggttac ttttagact gtggacattc tcttaagag ttctgtacca catggtagcc ttgttattg tgggtggcaa ccttaataagc attctgactg taaaataaaa tgatttgggg aagttggggc tctcgctctg gagtgctaac catcatgacg tttgatctgt actttgata tgatatgatg ctctggggaa agtagtccca aatagccaaa cctattggg ggctacccat gcaattttagg ggtggaccc tcaggcgttga agctctaattg tccttttcc accaatgttg gggagtagag ccctagagtt taaaactgtc tcaggcgttgc tctgtttgt tttctgttgc agatccagaa ccgtgcccag attctgactt cctcctctgg atccttgcag cagttgttc ggggttgc ttttagatgt ttctcctcac agctgtttct ttgagcaaaa tggtagtgc ggtgctgatg gtgcaccatg tctgatgggg ataccttag tggatcaac tggccaaaag atgatgttga gttttagtgc ttttagatgtc gatgaggcaaa taaatgaaga ggaaggacag tggtaaagaa cgcaactagaa ccgtaggcat tggcatttgc ggttccagaa tgactaatat tttagatgt ttttagtgc atttaatgtt catgtgttc tggcaatgggt ttcaatttgc gtaaccgttgc 45	2760 2820 2880 2940 3000 3060 3120 3180 3240 3300 3360 3420 3480 3540 3600 3660 3720 3780 3840 3900 3960 4020 4080 4140 4200 4260 4320 4380 4440 4500 4560
---	--	--

ES 2 876 938 T3

5	caataaacatg gggcagctgt tttgctctt gtcttcatga caactgtact taagctaaca	4620
	gccctgaaaac atgagattag gctgggcaga atgctgctag agaggaccac ttggatggc	4680
10	tttattctcc ttctccatgt ccctctccat cacctggaag tcacctctgg gtgccactct	4740
	ggtgcccttc ttgtcgaaagc tgttagctgtcacatgacac ctatccctgt tatccagtt	4800
	gcttgactgg gacgaaaaatc cttcccccttc agccaggaag tgaaagtccc agttttatt	4860
15	tatcacaggt gttggtatttgc ttgttgcataagc aggtagaatt atgaaatcag gcctcctgtc	4920
	aggatttctt ttgtacagtc ccttcagac acctctgcct aaggccagct ttgccattac	4980
20	aaactctccc ttctccctat ctcccttctt ctcttcctct tccttcttct cgcttcttct	5040
	ctctctctct ttctccctct ctgtctctta tacacatataca caaagatata ctctattcca	5100
	acatccctcta cccaaacctga cagagatgtc ctttgctgtatggcagtgag tggggatgag	5160
25	aaatacagct ctcaaaccagg ataactaaag cttattatct tatcaagctt gttcccttgc	5220
	agacaagatt gatcaattat cataaggctt ctgggtgttc tttctgaagc tttctcaaag	5280
30	tctctttctc ctatcttcca ttcaaggcaa atgattgcca tttaacatca aaatcacagt	5340
	tatttatcta aaataaaattt taatagctga atcaagaaaa tctcctgagg tttataattc	5400
	tgtatgctgt gaacattcat ttttaaccag cttagggaccc aatatgtgtt gagttctatt	5460
35	atggtagaa gtggcttccg tattcctcag tagtaattac tgtttcttt tgggtttgac	5520
	agctaaagaa aagaaggccct cttacaacag gggctatgt gaaaatgccc ccaacagagc	5580
40	cagaatgtga aaagcaattt cagcatttattt ttattccat caattgagaa accattatga	5640
	agaagagagt ccataattca atttccaaga gctgaggcaa ttctaaacttt tttgctatcc	5700
	agctattttt atttgggtgt gcatttgggg ggaattcattc tctctttaat ataaagttgg	5760
45	atgcggacc caaattacgt gtactacaat tttaagcaaa ggagtagaaa gacagagctg	5820
	ggatgtttct gtcacatcag ctccacttgc agtggaaagca tcacttggga ttaatatgg	5880
50	gatgcagcat tatgatgtgg gtcaaggaat taagtttaggg aatggcacag cccaaagaag	5940
	gaaaaggccag ggagcgaggg agaagactat attgtacaca ccttatattt acgtatgaga	6000
	cgttatagc cgaaatgatc tttcaagtt aaattttatg ctttttattt cttaaaca	6060
55	tgtatgatta catcaaggct tcacatggct atgttttagc cagtgtatgt	6120
	aaaggttgta ttgcataat acatataat atatataat atatataat atatataat	6180
60	atatataat atatataattt taatttgata gtatttgca tagagccacg tatgttttg	6240
	tgtatgtttt aatgggttga atataaacac tatatggcag tgtcttcca cttgggtcc	6300
	cagggaaagtt ttgtggagga gctcaggaca ctaatacacc aggtagaaca caaggtcatt	6360
65	tgctaacttag cttggaaaact ggatgaggc atagcagtgc ttgattgcgt ggaattgtgc	6420
	tgagttggtg ttgacatgtg ctttggggct ttacaccag ttccttcaa tggtttgcaa	6480

ES 2 876 938 T3

5	ggaagccaca gctggtggt a tctgagttga cttgacagaa cactgtctt a aagacaatgg	6540
	c ttactccag gagaccac a ggtatgacct tcttaggaagc tccagttcg a tggggccaaat	6600
10	tcttacaaac atgtggtaa tgccatggac agaagaaggc agcaggtggc agaatggggt	6660
	gcatgaaggt ttctgaaaat taacactgct t gttttttta actcaatatt ttccatgaaa	6720
	atgcaacaac atgtataata ttttaatta aataaaaatc t gtttttttc gttttccgga	6780
15	gttgtcttta tcattcattgc atttgaatat t gttttttttt attcattcag	6840
	tatctggtgg agtctccaat attagaaata ctggaaacaa actgaaaaac cacaaaagga	6900
	caaataatgc ttcatgagtc agcttgcac cagccattac ctgcaagtca ttcttggaaag	6960
20	gtatccatcc tttttttttt tgatttcttc accactattt gggatataac gtgggttaac	7020
	acagacatag cagtcattta taaatcaatt ggcattgtgt ttaacacagg ttcttcacct	7080
25	cccccttctt accgcctgct ttctcagctc aactatcaca ggcattacag ttgtcatggc	7140
	aaccccaatg ttggcaacca cgtcccttgc agccattttt gatctgccttc ctgaaatata	7200
	gagctttcc ctgtggcttc caaatgaact attttgc aaaa t gttttttttt acacacacct	7260
30	gtggccttat gttgctatca gctggcacac ctaggcctgg cacactaagc cctctgtgat	7320
	tcttgcttaa ccaatgtata gtctcagcac atttggtttc cacttaaggt ttccct	7375
	<210> 8	
35	<211> 36	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
40		
	Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala	
	1 5 10 15	
45		
	Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro	
	20 25 30	
50		
	Val Phe Cys Lys	
	35	
55	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
60	<400> 9	
	cactcacctt tgccagaagac agg 23	
	<210> 10	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

ES 2 876 938 T3

<400> 10
ccttgtgccg ctgaaatcca agg 23

5 <210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 11
aggacccttg tactccagga aattctcca 29

<210> 12
<211> 26
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
agcccctact aaataccctgg cgctct 26
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula asesina natural humana (NK) o una línea celular NK que ha sido modificada para expresar una variante TRAIL, en la que la variante TRAIL tiene al menos un 25% de aumento en la afinidad por DR4, en relación con TRAIL de tipo salvaje.
- 10 2. Una célula NK humana o una línea celular NK según la reivindicación 1, en la que la variante TRAIL tiene una afinidad reducida, con respecto a TRAIL de tipo salvaje, para receptores de señuelo TRAIL.
- 15 3. Una célula NK humana o una línea celular NK de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que haya sido modificada adicionalmente para reducir la expresión, en relación con una célula NK de tipo salvaje o una línea celular NK, de uno o más receptores inhibidores de puntos de control.
- 20 4. Una célula NK humana o una línea celular NK según la reivindicación 3, en la que los receptores inhibidores del punto de control se seleccionan entre CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y TIM-3.
- 25 5. Una célula NK humana o una línea celular NK según cualquier reivindicación anterior, en la que la línea celular NK es KHYG-1 o un derivado del mismo.
- 30 6. Una célula asesina natural humana (NK) o una línea celular NK para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que la célula NK o la línea celular NK ha sido modificada para expresar una variante de TRAIL con al menos un aumento del 25% en la afinidad por DR4, en relación con TRAIL de tipo salvaje.
- 35 7. La célula NK humana o la línea celular NK para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la variante TRAIL tiene una afinidad reducida, en relación con TRAIL de tipo salvaje, para los receptores TRAIL señuelo.
- 40 8. La célula NK humana o línea celular NK para su uso según la reivindicación 6 o 7, en la que el cáncer es un cáncer de la sangre.
- 45 9. La célula NK humana o línea celular NK para su uso según la reivindicación 8, en la que el cáncer de sangre es leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, incluidos los linfomas de células T y linfomas de células B, mieloma asintomático, mieloma múltiple latente (MML), mieloma activo o mieloma de cadenas ligeras.
- 50 10. La célula NK humana o línea celular NK para su uso según la reivindicación 8, en la que el cáncer de sangre es leucemia.
- 55 11. La célula NK humana o línea celular NK para su uso según la reivindicación 10, en la que la leucemia es LMA.
- 60 12. Una célula asesina natural humana (NK) o una línea celular NK para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA), en la que la célula NK o la línea celular NK se ha modificado para expresar una variante de TRAIL con al menos un 25% de aumento en la afinidad por DR4, en relación a TRAIL de tipo salvaje.
- 65 13. La célula NK humana o línea celular NK para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en la que la línea celular NK es KHYG-1 o un derivado del mismo.
- 55 14. La célula NK humana o la línea celular NK de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la célula NK humana o la línea celular NK para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en la que la célula NK o la línea celular NK se ha modificado para expresar una variante de TRAIL con al menos un 25% de aumento en la afinidad por DR5, en relación con TRAIL de tipo salvaje.

60

65

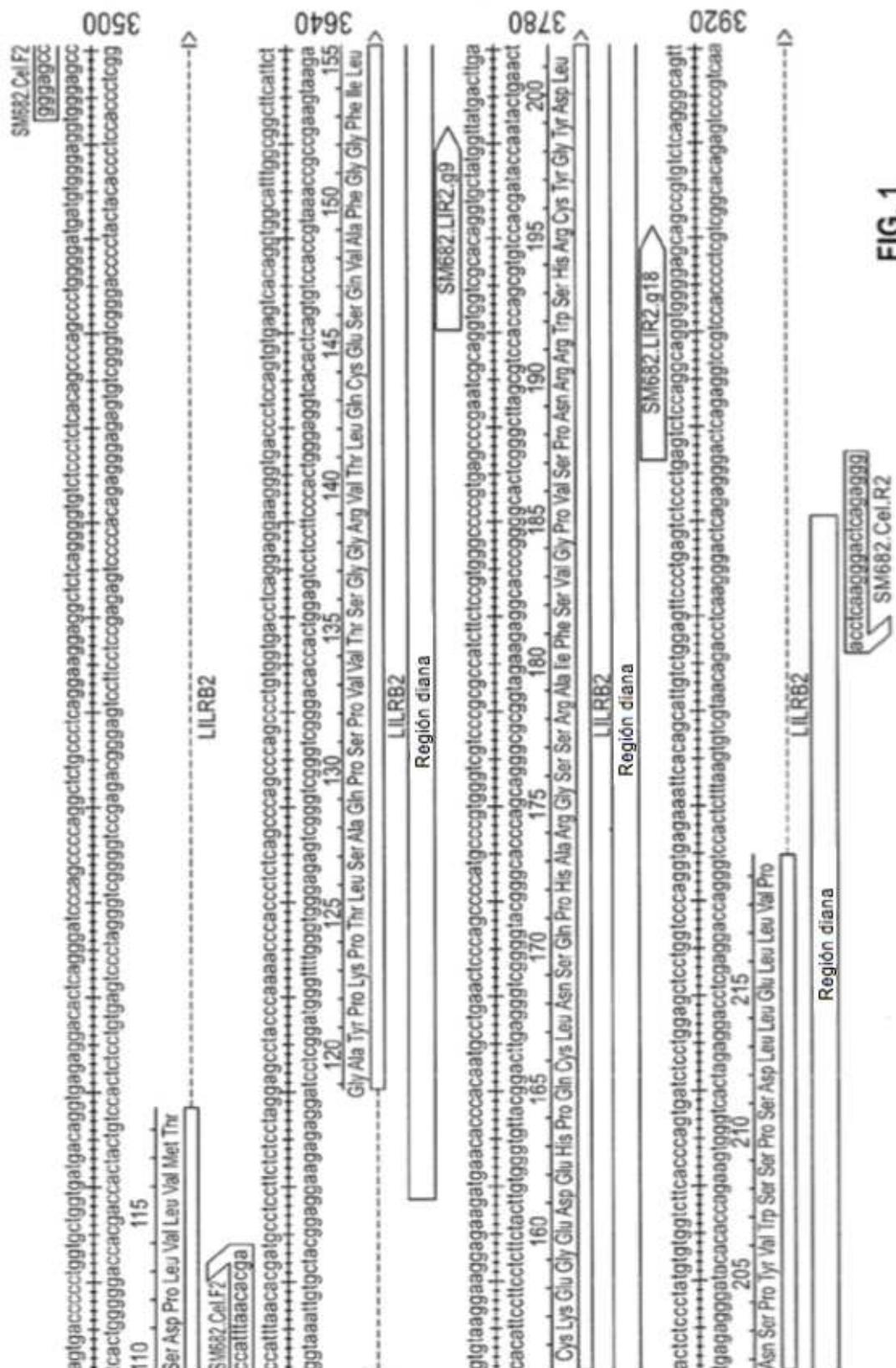


FIG. 1

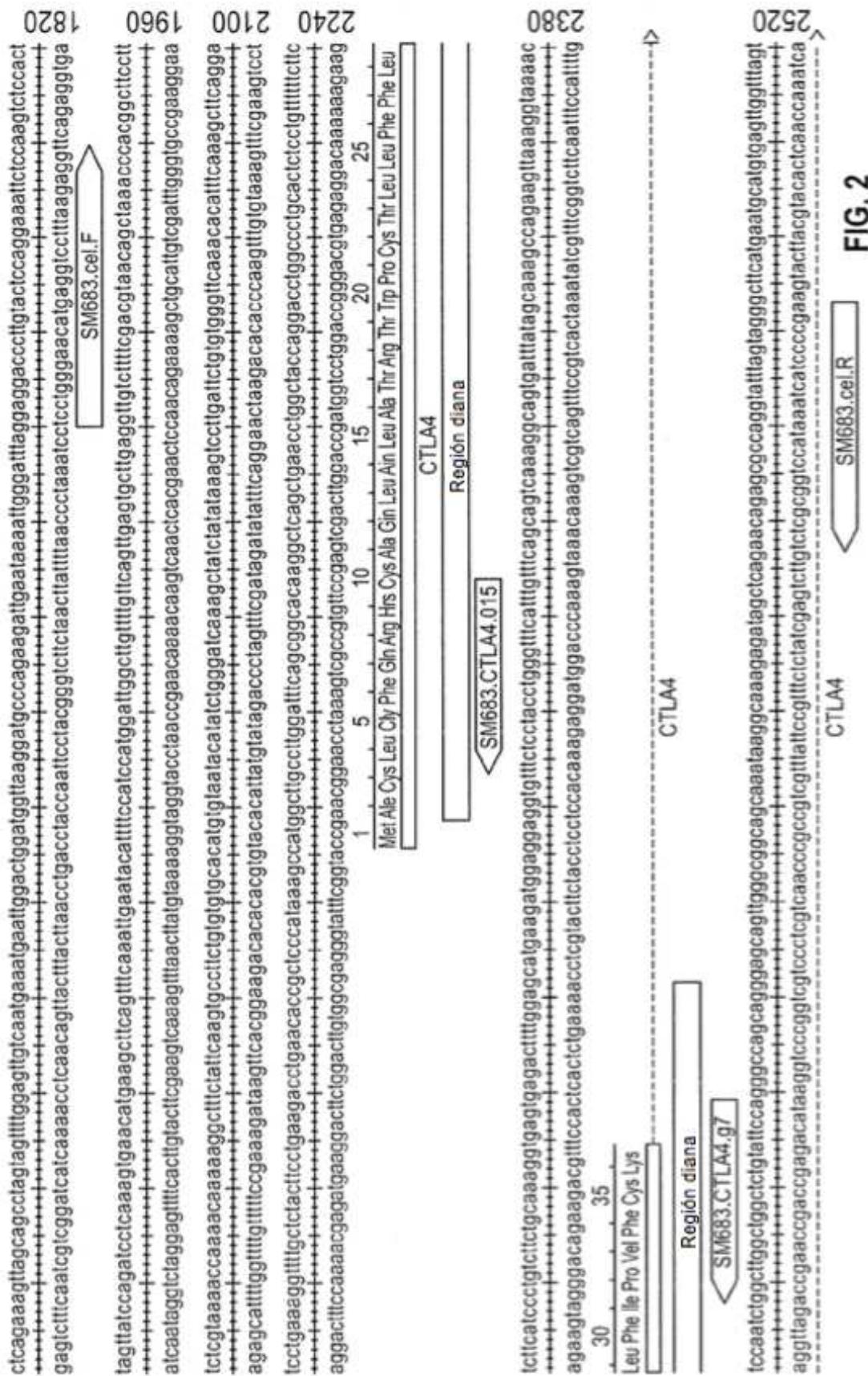


FIG. 2

ARNg quimérico + vector de coexpresión hSpCas9

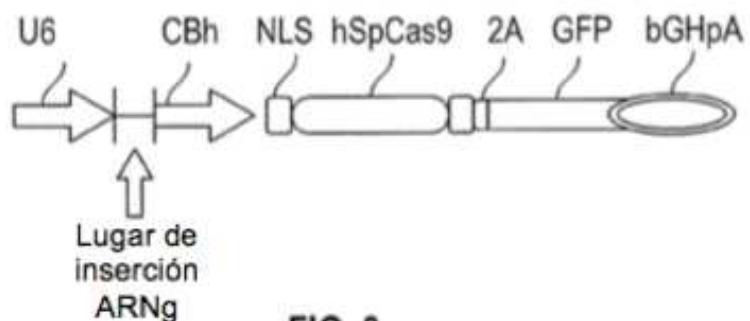


FIG. 3

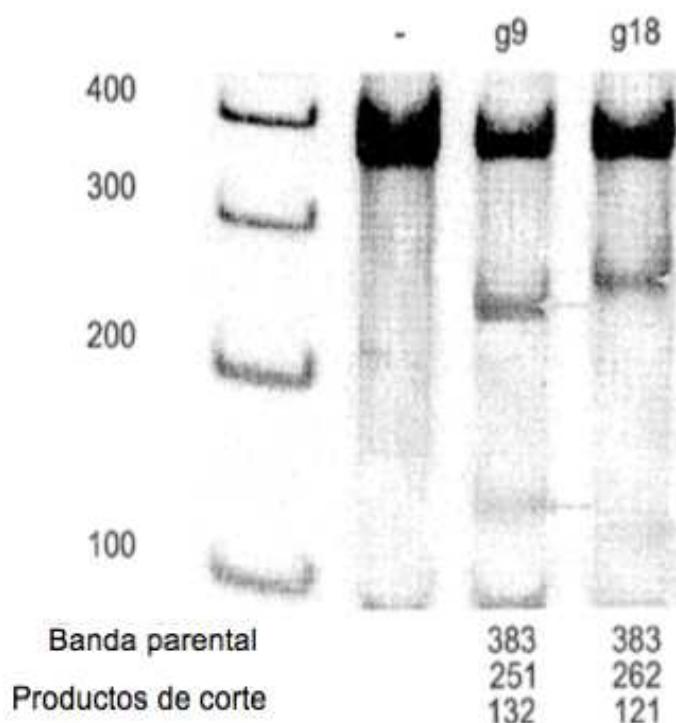


FIG. 4

ES 2 876 938 T3

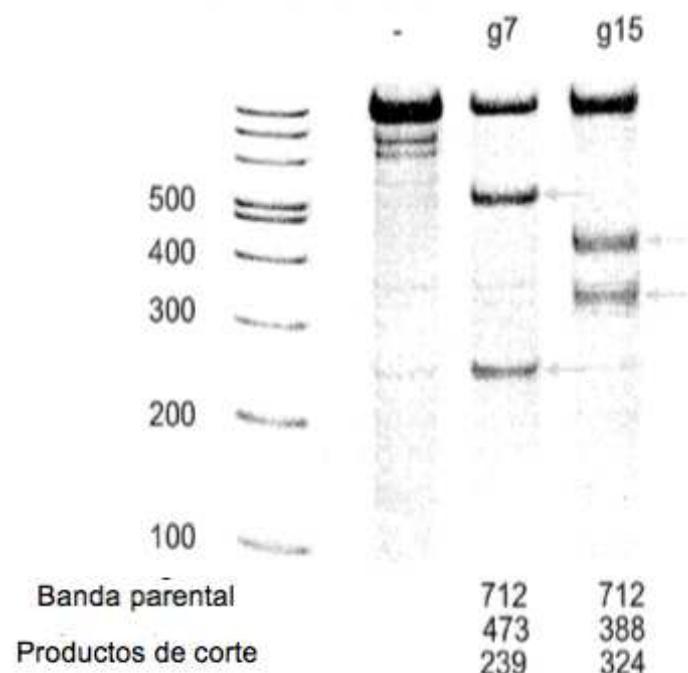


FIG. 5

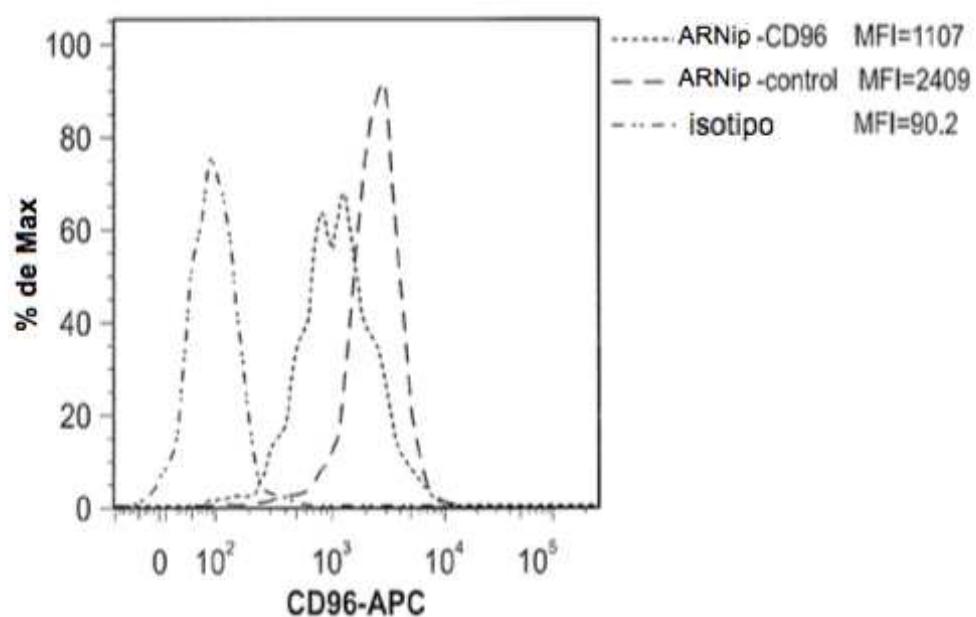


FIG. 6A

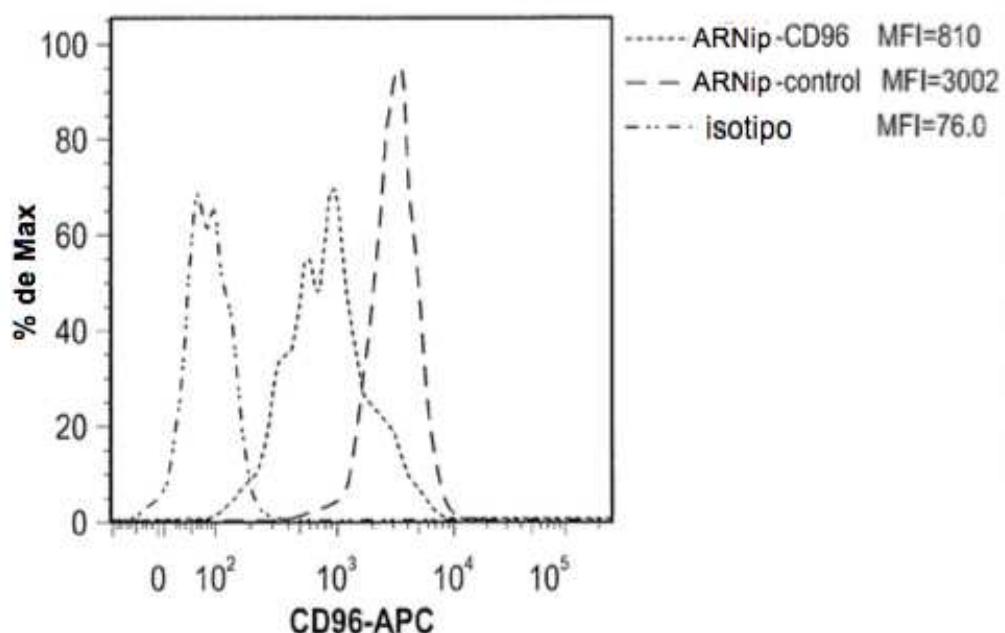


FIG. 6B

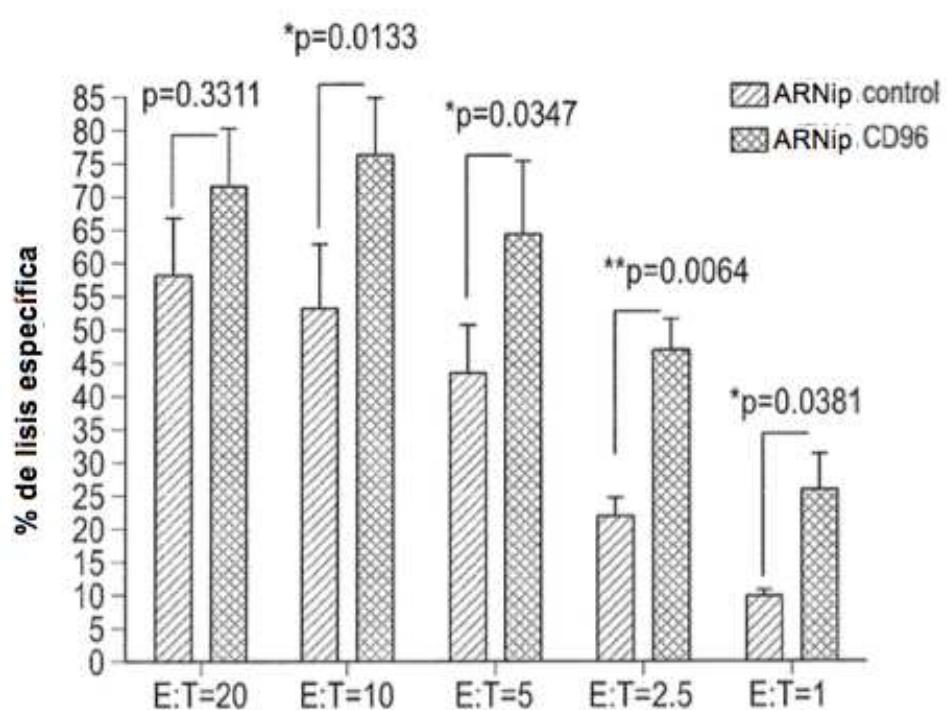


FIG. 7

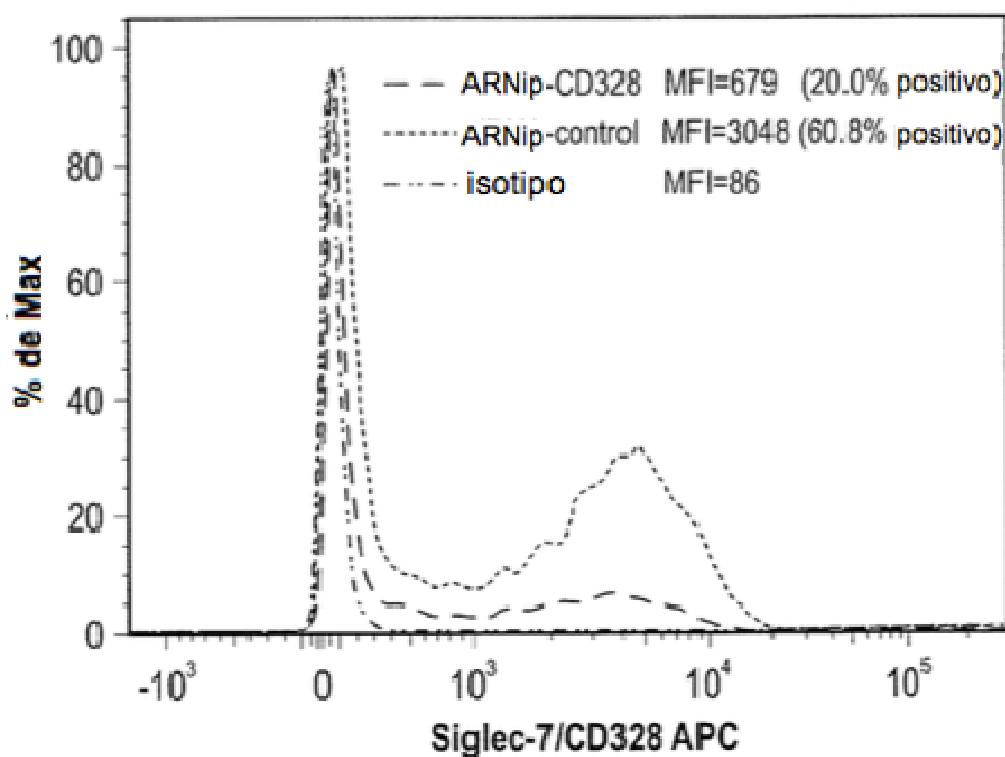


FIG. 8

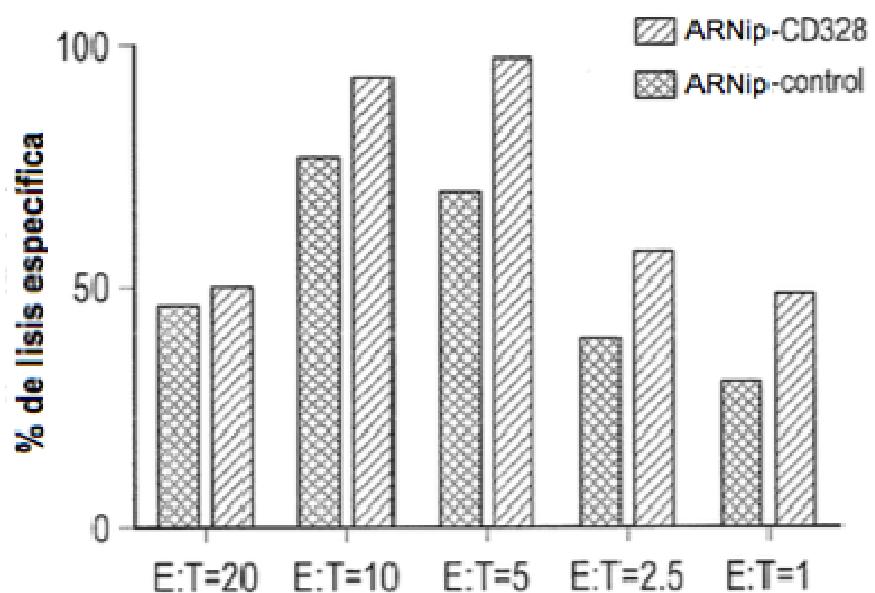


FIG. 9

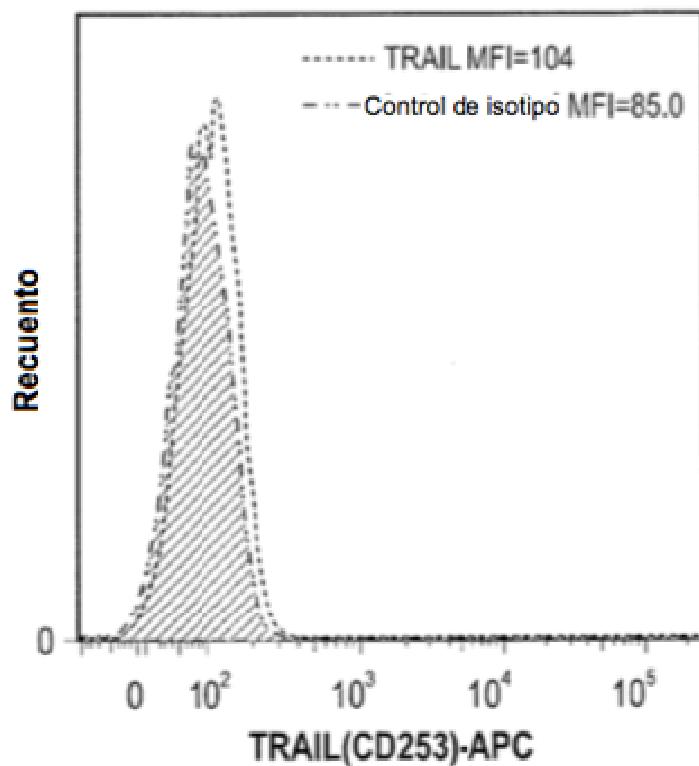


FIG. 10

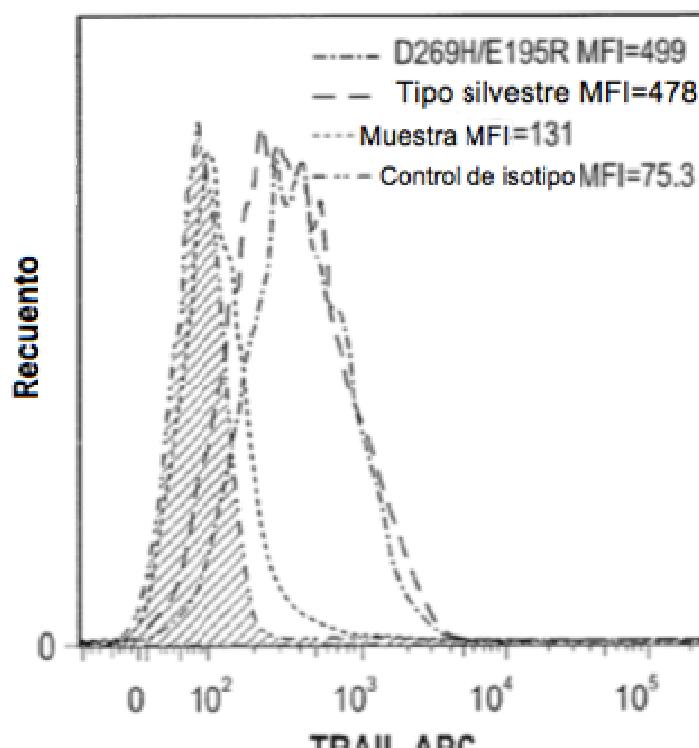


FIG. 11

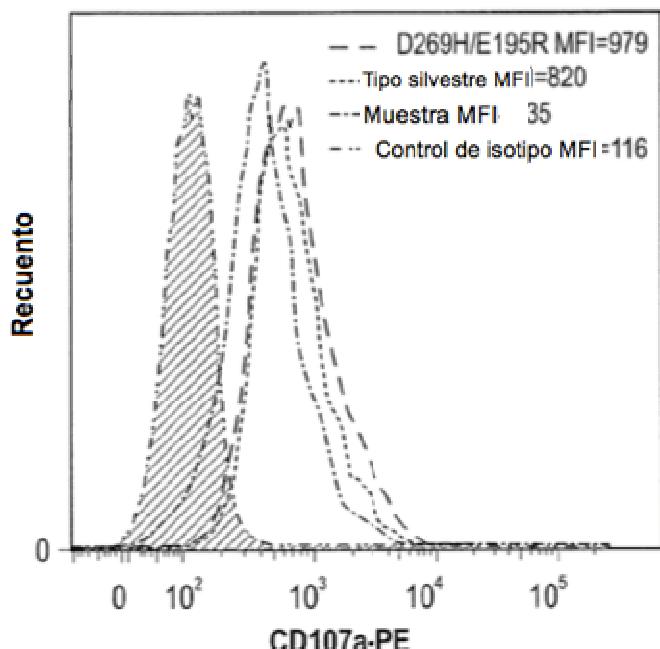


FIG. 12

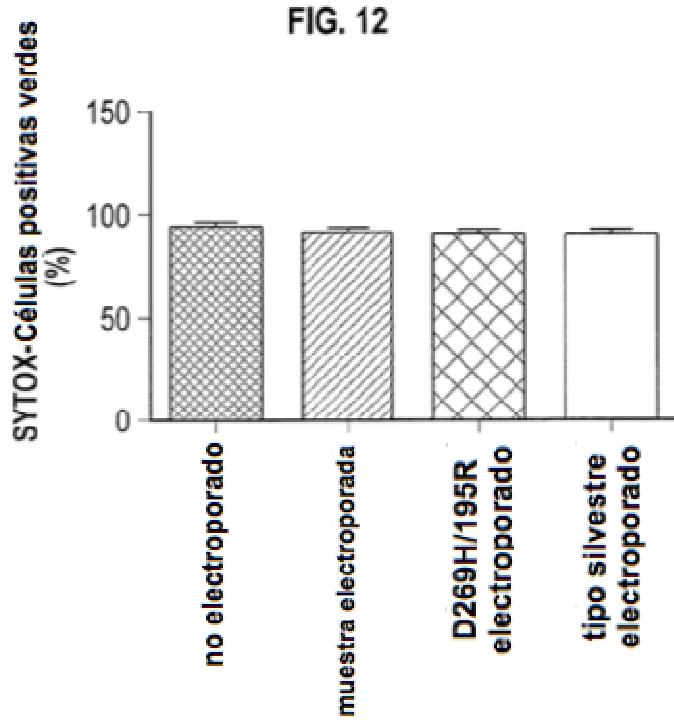


FIG. 13

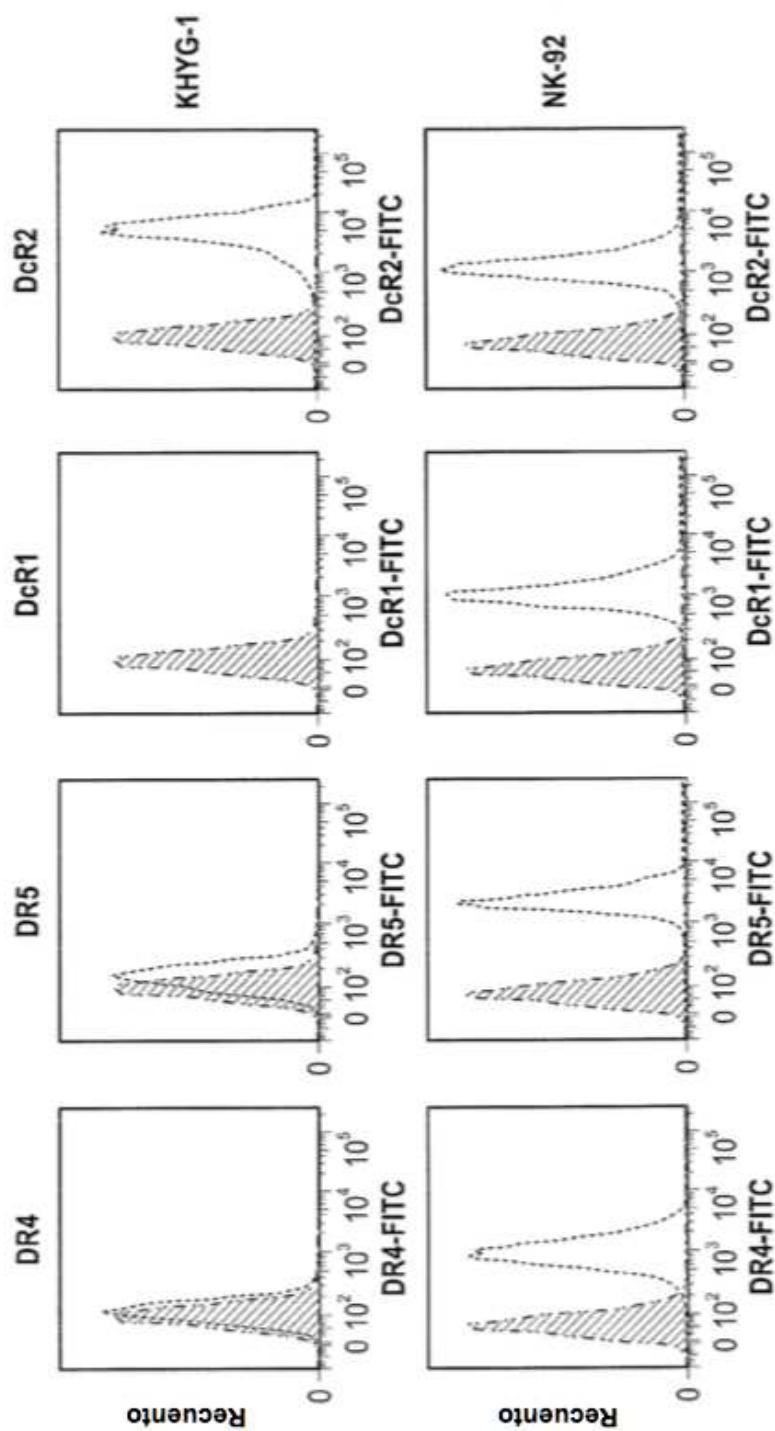


FIG. 14

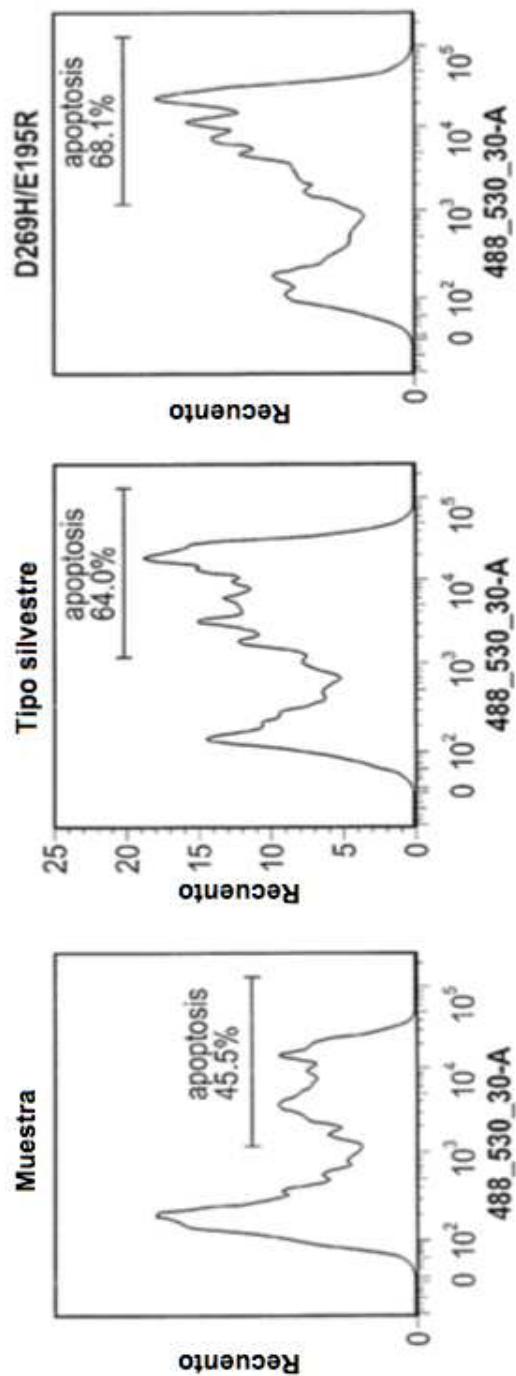


FIG. 15

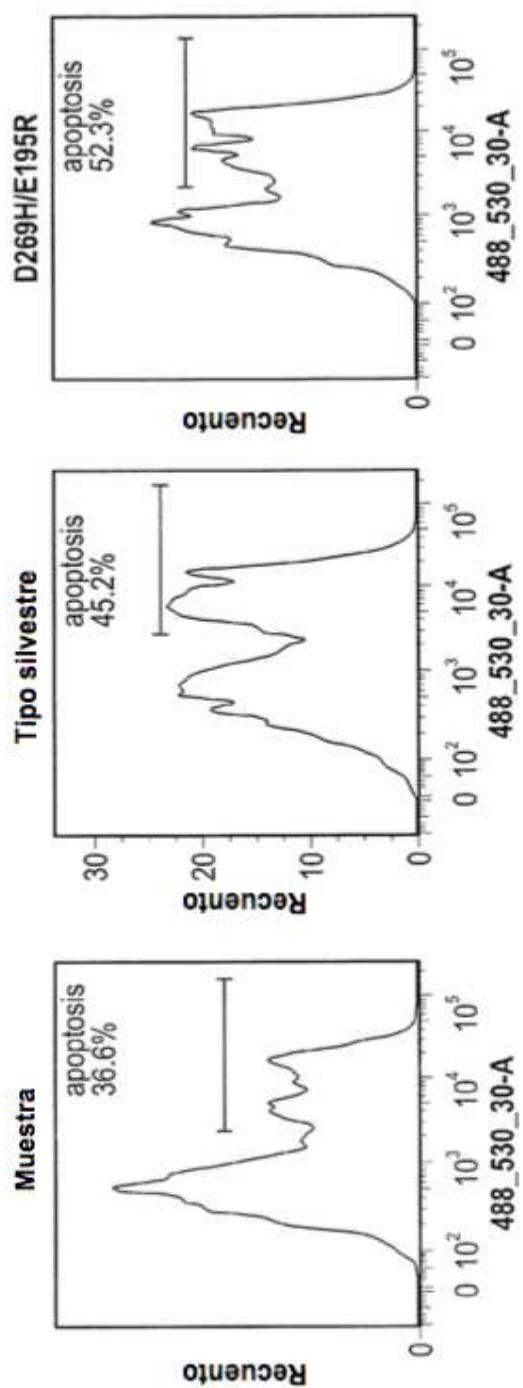


FIG. 16

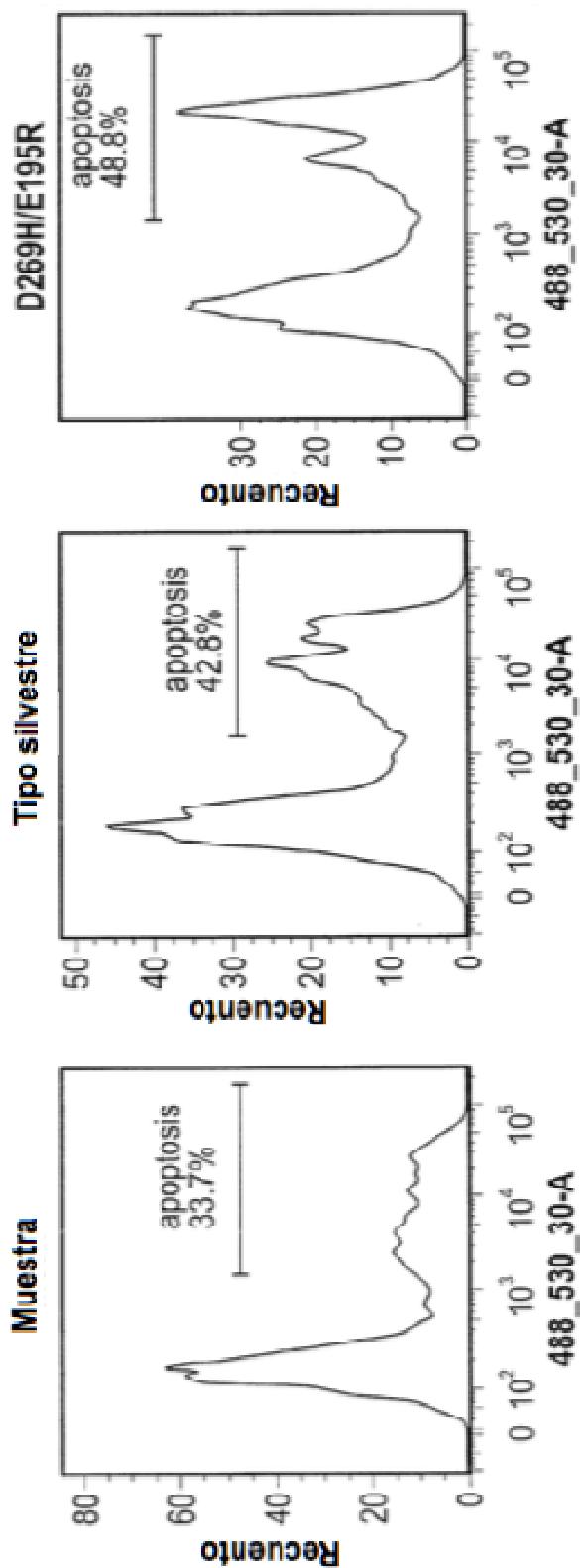


FIG. 17

ES 2 876 938 T3

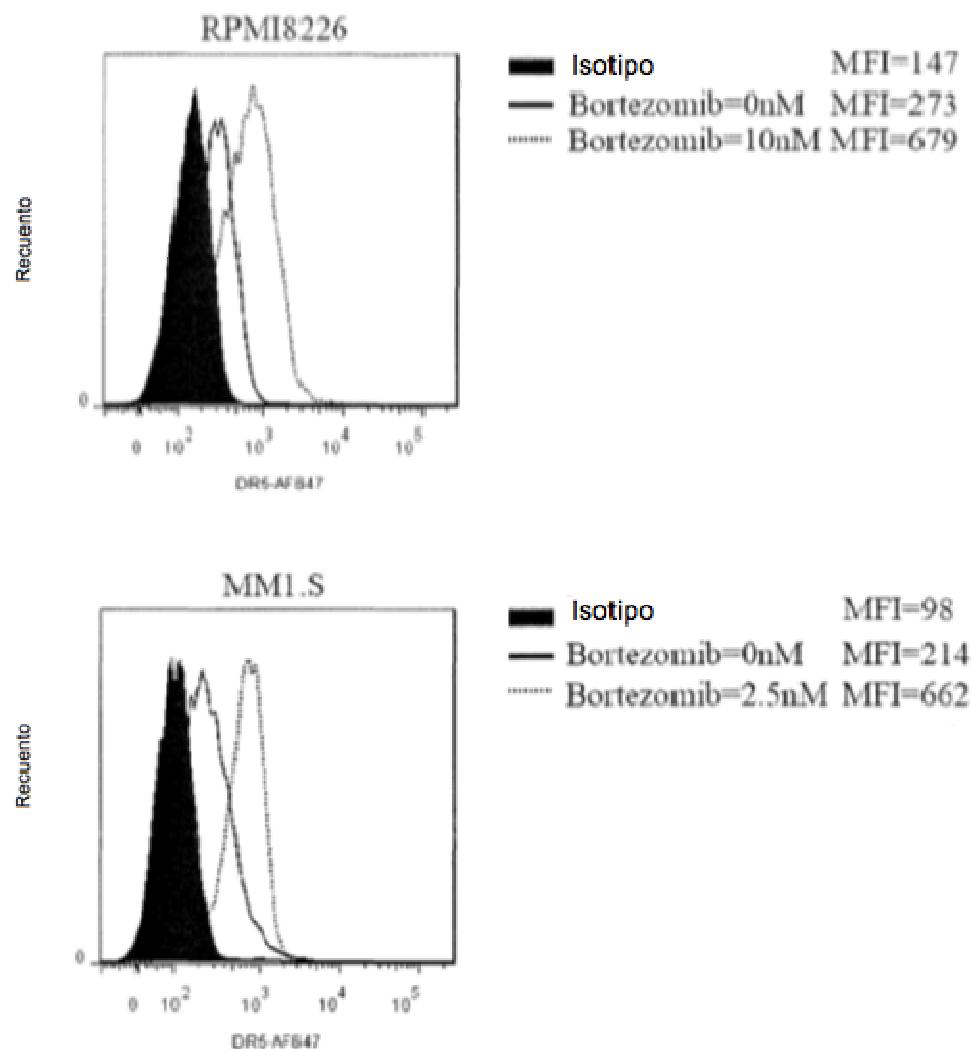


Fig. 18

ES 2 876 938 T3

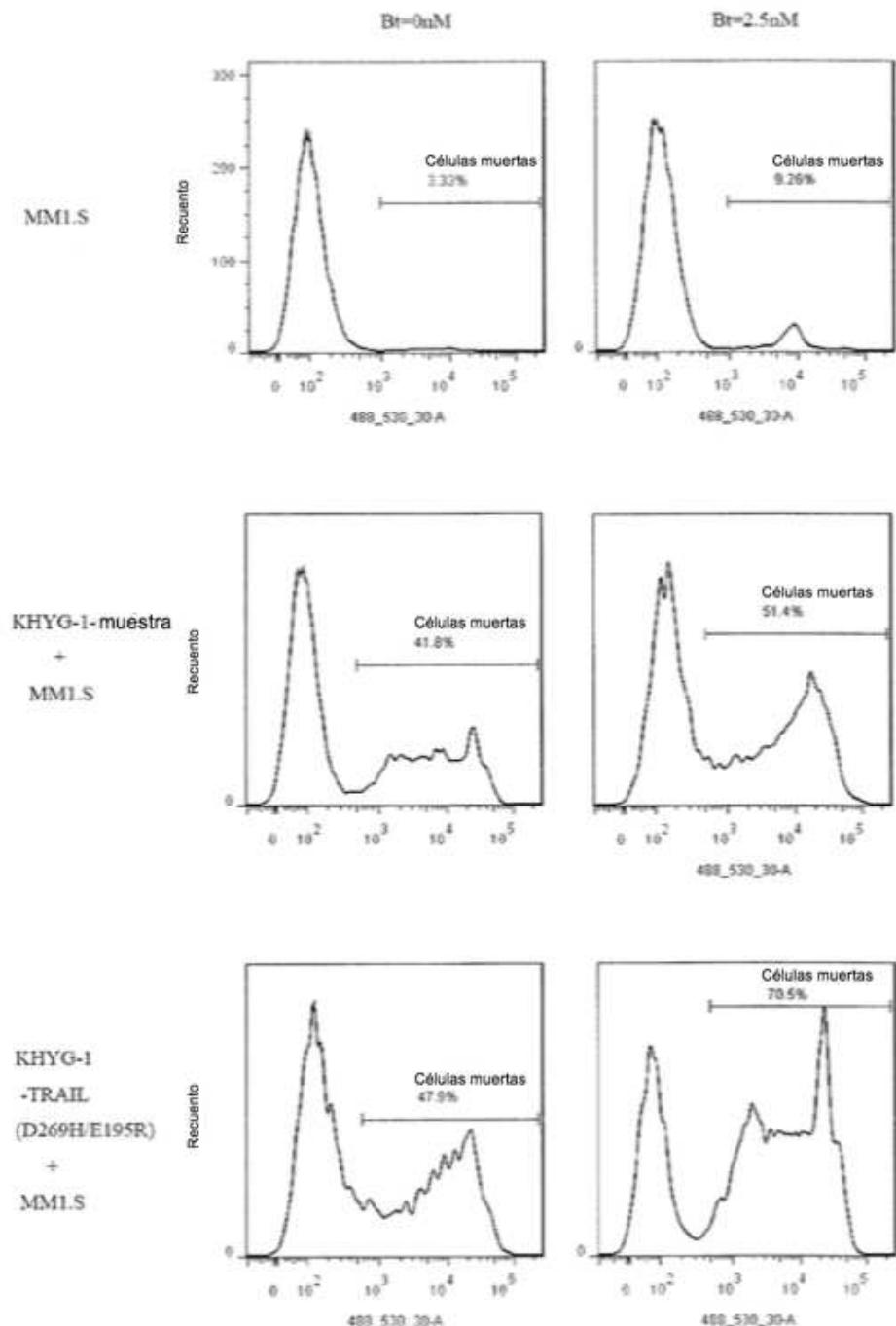


Fig. 19

ES 2 876 938 T3

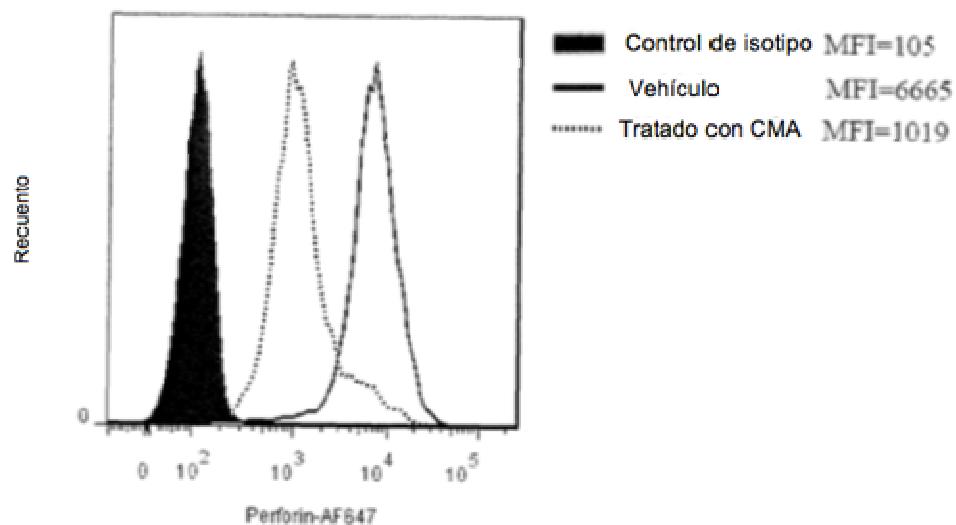


Fig. 20

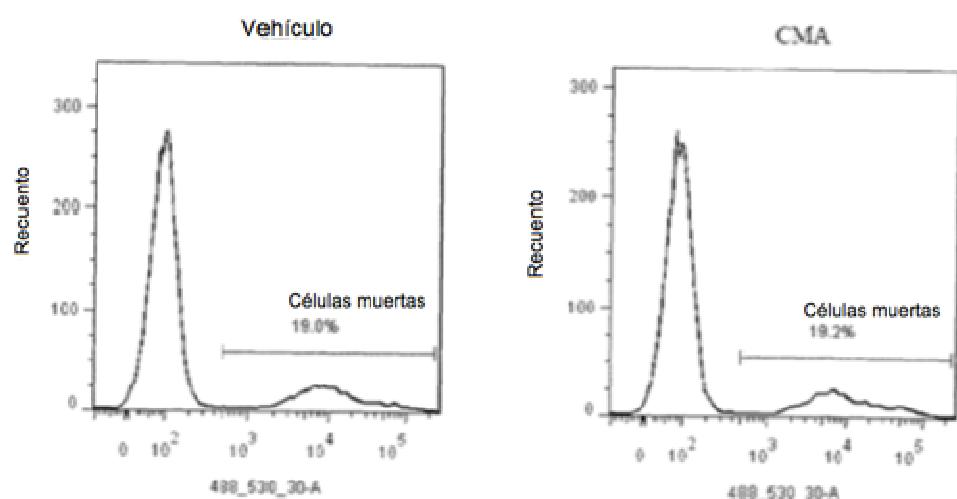


Fig. 21

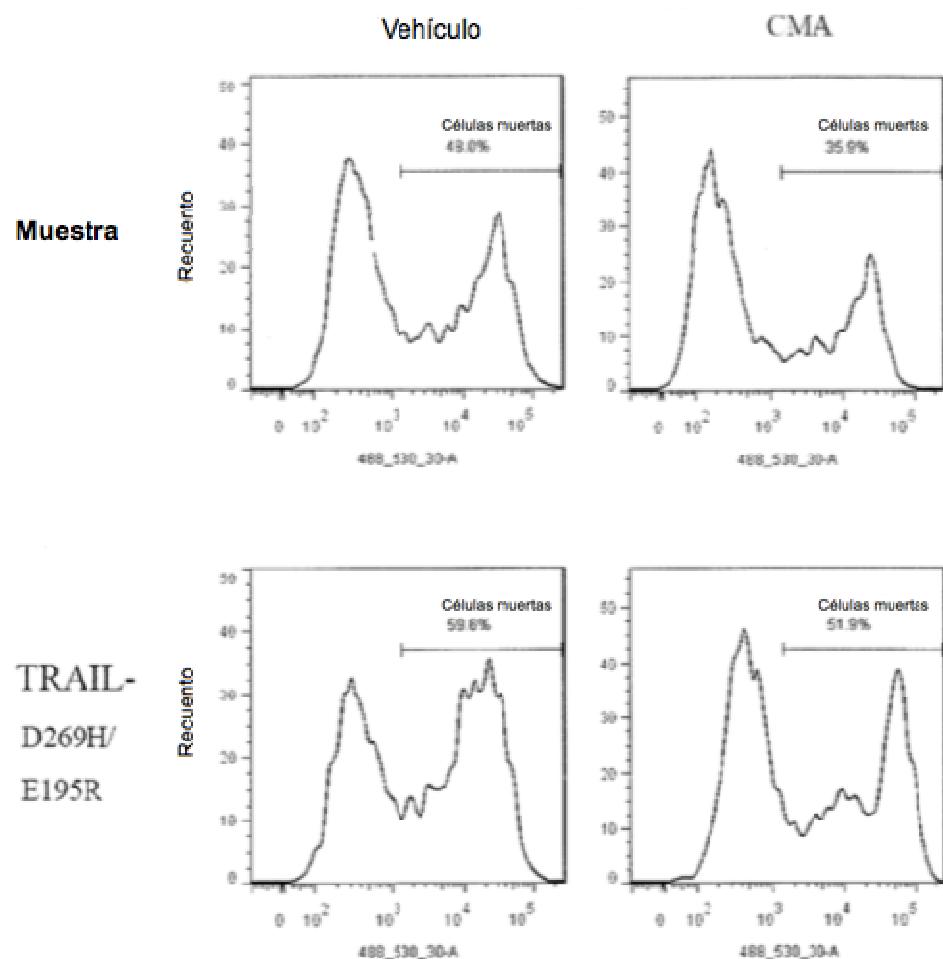


Fig. 22

ES 2 876 938 T3

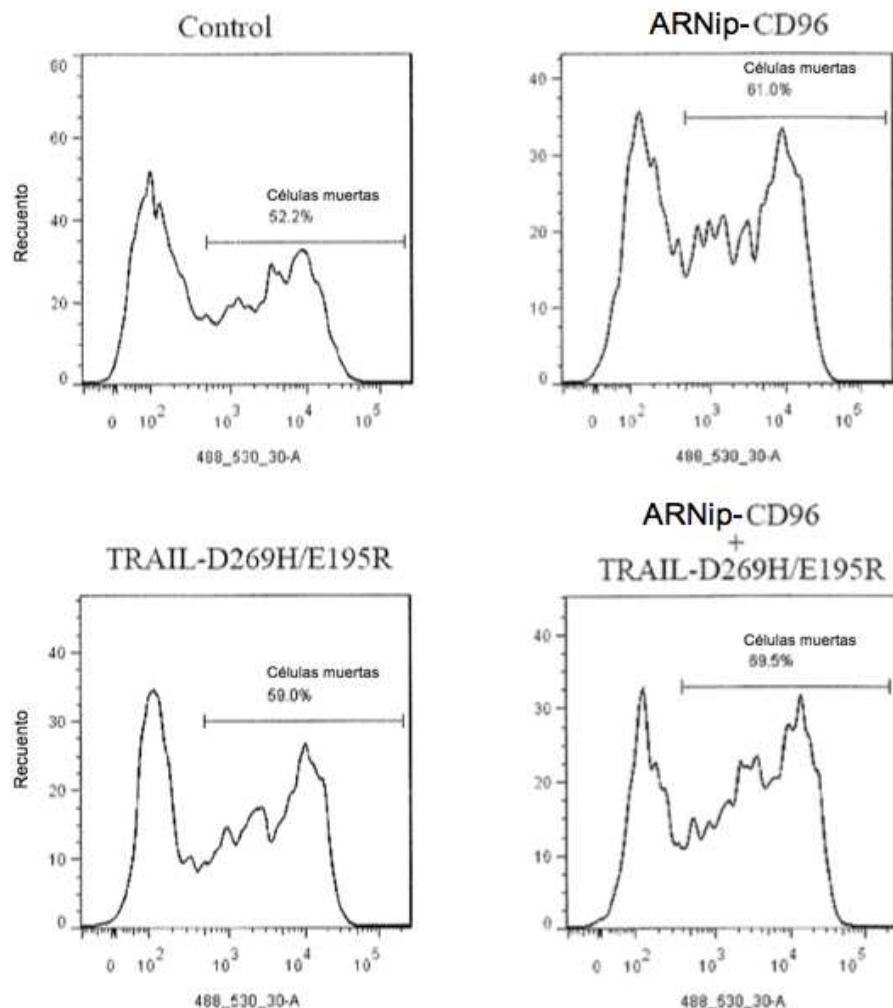


Fig. 23

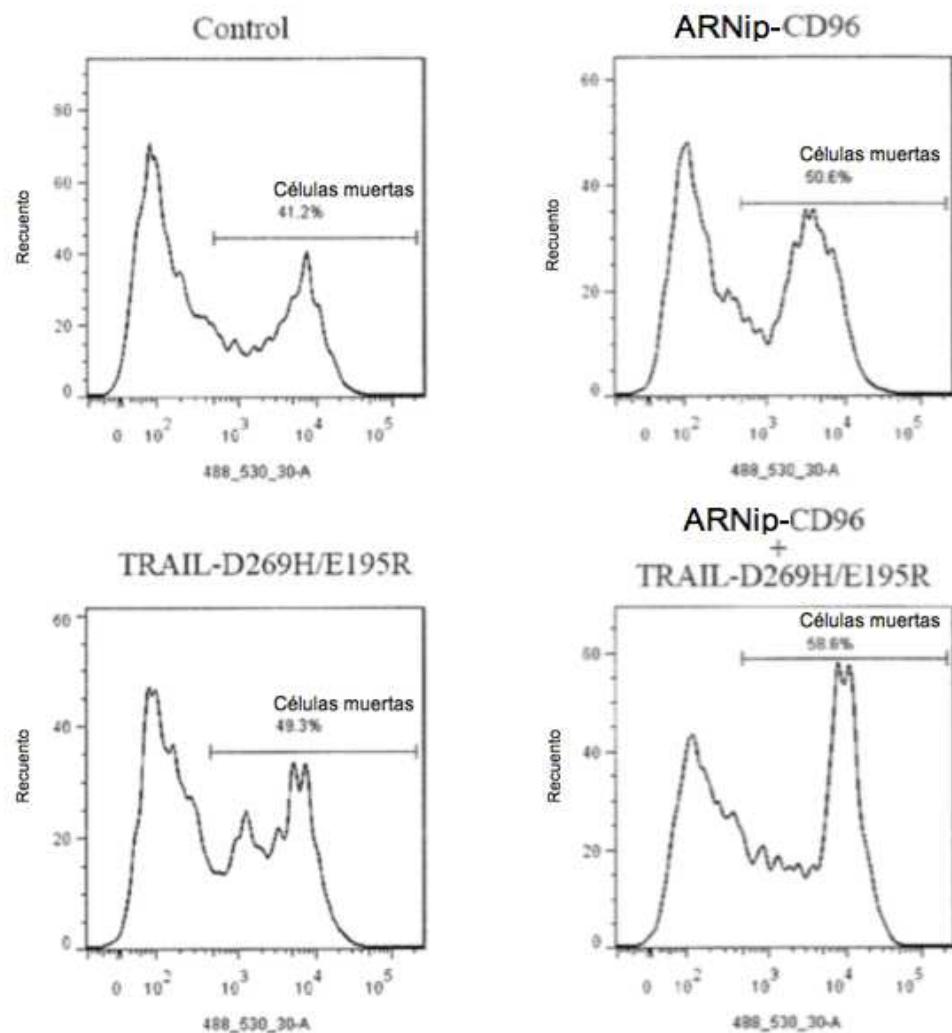


Fig. 24