

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 879**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2018** **PCT/GB2018/050542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018** **WO18158587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2018** **E 18710125 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022** **EP 3589728**

54 Título: **Linfocitos citolíticos naturales**

30 Prioridad:

03.03.2017 GB 201703476

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

23.11.2022

73 Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED
(100.0%)
Level 1 Faculty Building c/o Imperial College
Exhibition Road
London SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**BRADY, HUGH J.M. y
FUCHTER, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 928 879 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

Linfocitos citolíticos naturales

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a poblaciones de linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés) expandidas y a procedimientos para producir las mismas. También se describen aplicaciones terapéuticas. Más específicamente, la invención se refiere a la expansión de linfocitos NK mediante el aumento de la expresión de factores de transcripción específicos asociados con la producción de linfocitos NK.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Ha habido un aumento en el interés en los linfocitos citolíticos naturales (NK), ya que son citotóxicos contra células cancerosas, infectadas por patógenos y dañadas de otro modo. Los linfocitos NK son células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés), específicamente linfocitos citotóxicos granulares grandes que unen los brazos innato y adaptativo de la respuesta inmunitaria. Constituyen el 10-15 % de los linfocitos circulantes en la sangre periférica. Los linfocitos NK también presentan el nivel más alto de actividad citotóxica dentro del sistema inmunitario. Por lo tanto, la alteración de la funcionalidad o el número de linfocitos NK repercute en el funcionamiento del sistema inmunitario frente a la infección y el cáncer. Por ejemplo, un estudio a gran escala en Japón ha demostrado que la reducción de los niveles de linfocitos NK en una cohorte de personas mayores de 40 años está asociada con una incidencia significativamente mayor de cáncer.

[0003] De manera similar a las células B y células T, estos linfocitos NK se derivan de células progenitoras linfoides comunes (CLP, por sus siglas en inglés) que, a su vez, proceden de células madre hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés). Sin embargo, los linfocitos NK son diferentes de las células B y T, ya que carecen de receptores de antígeno de superficie celular específicos. Debido a esto, los linfocitos NK pueden destruir las células cancerosas e infectadas por patógenos sin sensibilización previa, lo que las convierte en parte de la respuesta inmunitaria innata. También tienen un papel crítico en la inmunovigilancia tumoral al influir directamente en la respuesta inmunitaria adaptativa.

[0004] La activación de los linfocitos NK hacen que éstos liberen perforina y gránulos citoplasmáticos que contienen granzimas. La perforina se polimeriza para formar poros en las células diana en presencia de Ca^{2+} . Las granzimas pueden introducirse por estos poros en las células diana, causando la fragmentación del ADN y la apoptosis. Los linfocitos NK también pueden secretar citocinas, que activan la acción de otras células inmunitarias en el brazo adaptativo de la inmunidad.

[0005] Debido a la importancia de los linfocitos NK en la respuesta inmunitaria contra la infección por patógenos y las células cancerosas, múltiples ensayos clínicos han analizado la eficacia de los linfocitos NK en protocolos de transferencia adoptiva. En la transferencia adoptiva, los linfocitos NK aislados de la sangre de los donantes se expanden *ex vivo* y maduran en linfocitos NK sanos y funcionales antes de la transfusión en los receptores. Sin embargo, para que sea eficaz, es crucial que los donantes de linfocitos NK sean sometidos a un cribado para determinar su genotipo KIR, donde el donante debe tener el polimorfismo alélico KIR apropiado para el receptor para permitir el reconocimiento de células diana para su destrucción. En cualquier caso, los estudios han revelado que los productos expandidos tienen una tasa de éxito clínico inferior a lo esperado, con menos capacidad para destruir células cancerosas o infectadas. Por lo tanto, los actuales protocolos de transferencia adoptiva presentan importantes obstáculos.

[0006] Una estrategia terapéutica alternativa es aumentar la cantidad de linfocitos NK endógenos. Un procedimiento es la administración de citocinas que son esenciales para el desarrollo de linfocitos NK. Se predijo que la administración de IL-2 e IL-15 mejora el desarrollo de linfocitos NK. La IL-2 promueve la proliferación y la citotoxicidad de los linfocitos NK, mientras que la IL-15 promueve el desarrollo y la expansión de los linfocitos NK. Sin embargo, en estudios *in vivo*, se descubrió que las citocinas solo estimulan una expansión mínima de los linfocitos NK con una semivida reducida, incluso a una dosis muy alta. Además, la administración de citocinas a menudo conduce a toxicidad sistémica debido a la activación inapropiada de las respuestas inmunitarias y a la inducción de la apoptosis de los linfocitos NK.

[0007] Por lo tanto, utilizando procedimientos y técnicas convencionales, es difícil producir un gran número de linfocitos NK, y producir linfocitos NK totalmente funcionales con alta citotoxicidad es aún más difícil. Actualmente no hay ningún fármaco disponible que aumente selectivamente el número de linfocitos NK. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos de producción de células NK; tanto *ex vivo* para producir grandes cantidades de linfocitos NK funcionales para uso terapéutico y de investigación como *in vivo*.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] Los linfocitos citolíticos naturales (NK) tienen un papel crítico en el sistema inmunitario, donde destruyen

las células cancerosas, infectadas por patógenos o dañadas. Se predice que potenciar el número o la funcionalidad de linfocitos NK aumenta la destrucción de estas células. Las terapias existentes, como la transferencia adoptiva de linfocitos NK y la mejora de citocinas de linfocitos NK endógenos, no tienen mucho éxito en términos de su eficacia.

5 **[0009]** Los linfocitos NK se diferencian de las HSC en la médula ósea y se distribuyen a través de tejidos linfoides y no linfoides que incluyen ganglios linfáticos, bazo, sangre periférica, pulmones e hígado. Se necesitan citocinas y factores de transcripción específicos para alentar a las HSC a convertirse en linfocitos NK. Cada citocina y factor de transcripción deben estar presentes en un tiempo y concentración precisos con el fin de impulsar la diferenciación de las HSC en linfocitos NK. Sin embargo, la jerarquía precisa de las citocinas y los factores de transcripción que rigen la maduración de los linfocitos NK aún no se conoce del todo.

[0010] Los presentes inventores han trabajado para identificar fármacos que puedan aumentar el número de linfocitos NK. En particular, los presentes inventores se han centrado en la proteína de unión E4 4 (E4bp4), que también se conoce como Nfil3. La regulación al alza de E4bp4 es una estrategia prometedora para aumentar la producción de linfocitos NK ya que la sobreexpresión de E4bp4 en HSC mejora en gran medida la producción de linfocitos NK *in vitro*. Sin embargo, los factores de transcripción pueden ser difíciles de convertir en fármacos debido a su estructura y función. Por ejemplo, por lo general, carecen de actividad enzimática o sitios de unión a cofactores. Los presentes inventores han demostrado por vez primera que la inhibición de la acción de REV-ERB aumenta la producción de linfocitos NK. Con más detalle, los inventores han descubierto que la inhibición de la acción de REV-ERB aumenta la expresión de E4bp4, lo que a su vez aumenta la producción de linfocitos NK. En particular, los presentes inventores han demostrado que un antagonista de REV-ERB, SR8278, aumenta la expresión de E4bp4 y, con ello, la producción de linfocitos NK.

[0011] Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para expandir una población de linfocitos NK, que comprende las etapas de: a) cultivar una célula progenitora hematopoyética (HPC, por sus siglas en inglés) que comprende una muestra obtenida de un paciente; b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB; y c) expandir dichas células *in vitro* para producir una población de linfocitos NK.

30 **[0012]** Dicho compuesto puede aumentar la expresión de E4bp4 al disminuir la actividad de REV-ERB. Típicamente, dicho compuesto disminuye la actividad de REV-ERB- α y/o REV-ERB- β . Preferentemente, dicho compuesto disminuye la actividad de REVERB- α y REV-ERB- β . En algunas realizaciones, dicho compuesto es un antagonista de REV-ERB, preferentemente un antagonista de REV-ERB- α y REV-ERB- β . Dicho compuesto se puede seleccionar de entre una molécula pequeña, un reactivo PROTAC, un ARN bicatenario (ARNbc), un ARN de interferencia pequeña (ARNip), un ARN de horquilla pequeña (ARNhp), un microARN, un ARN antisentido, un aptámero, un anticuerpo, una ribozima, un péptido o un peptidomimético. En algunas realizaciones preferidas, dicho compuesto es una molécula pequeña, por ejemplo, SR8278, ARN5187, 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroiso-quinolina-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida, 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina o 1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina, es particularmente preferido SR8278.

[0013] La muestra de HPCs puede obtenerse a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical y/o sangre periférica. En algunas realizaciones, el compuesto se añade dentro de los 2 días de aislar las HPC en la muestra.

45 **[0014]** También se describe una población de linfocitos NK expandida obtenida mediante el procedimiento de la invención, donde al menos el 90 % de los linfocitos NK son CD56⁺ y CD45⁺, así como una composición que comprende una población de linfocitos NK expandida de la invención y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 **[0015]** También se describe un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB para su uso en un procedimiento de terapia al aumentar la producción de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un paciente. Típicamente, dicho compuesto es un compuesto de la invención como se define en esta solicitud. El procedimiento de terapia puede ser un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno seleccionado de entre cáncer, una enfermedad infecciosa (aguda o crónica), una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad o trastorno relacionado con la infertilidad femenina o embarazo. La infección a tratar puede ser una infección viral, una infección bacteriana, una infección por protistas, una infección por hongos y/o una infección por helmintos. En algunas realizaciones, el compuesto para su uso de la invención se usa en combinación con la inmunoterapia mediada por anticuerpos. Dicho compuesto puede estar destinado a administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de la inmunoterapia mediada por anticuerpos. En algunas realizaciones preferidas, dicho compuesto es SR8278, ARN5187, 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida, 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metil-piperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina o 1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina, siendo particularmente preferido SR8278.

65 **[0016]** En esta solicitud, también se describe un procedimiento de tratamiento mediante el aumento de la

cantidad de linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB. Dicho compuesto puede usarse en combinación con inmunoterapia mediada por anticuerpos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017]

Figura 1: Ruta de desarrollo de linfocitos NK. Los linfocitos NK se diferencian de las células madre hematopoyéticas (HSCs). Los linfocitos NK se desarrollan a partir de HSC en células progenitoras linfoides comunes (CLP), células progenitoras de NK (NKP, por sus siglas en inglés), linfocitos NK inmaduros (iNK, por sus siglas en inglés), linfocitos NK maduros (mNK, por sus siglas en inglés) y finalmente en linfocitos NK convencionales (cNK, por sus siglas en inglés), que circulan en el torrente sanguíneo. Bajo el diagrama de la ruta se encuentran las citocinas y los factores de transcripción que se requieren para el desarrollo de linfocitos NK. La IL-15 es una de las principales citocinas necesarias para el desarrollo de los linfocitos NK. Otros son factores de transcripción necesarios para las transiciones que se muestran en el diagrama.

Figura 2: Cronología del ensayo de desarrollo de linfocitos NK. Las HPC se aislaron y se cultivaron más citocinas Flt3L, IL-7 y SCF. En el Día 2, a continuación, se transfirieron a células estromales OP9 más o menos susceptibles en convertirse en fármacos en medio de cultivo más la citocina IL-15. Los medios de los cultivos se cambiaron en el Día 5 y las células se cosecharon y analizaron en el Día 9.

Figura 3: Las HPC se cultivaron en condiciones de producción de linfocitos NK con la adición de diferentes compuestos farmacológicos en el Día 2. En el Día 9, el porcentaje de linfocitos NK se cuantificó usando citometría de flujo. (A) Gráfico que muestra la producción relativa de linfocitos NK de ratón maduro (NK1.1⁺ CD3⁻) para la adición de D4476 5, 10 y 20 μ M (control positivo), Remodelina y SR8278 en comparación con el control "Sin fármaco". (B) Estrategia de marcación-análisis para citometría de flujo para la identificación de linfocitos NK de ratón. (C) Resultados representativos de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados. Los resultados se promediaron de un experimento con seis repeticiones y las barras de error representan la media + DT. Los asteriscos indican diferencias significativas de los dos resultados anotados (* es $P \leq 0,01$) basándose en la prueba de Mann-Whitney.

Figura 4: Las HPC se cultivaron en condiciones de producción de linfocitos NK con la adición de diferentes concentraciones de SR8278. En el Día 9, el porcentaje de linfocitos NK se cuantificó usando citometría de flujo. (A) Gráfico que muestra la producción relativa de linfocitos NK de ratón maduro (NK1.1⁺ CD3⁻) para la adición de SR8278 2, 5, 10 y 20 μ M en comparación con el control "Sin fármaco". Los resultados se promediaron a partir de tres experimentos independientes con duplicados biológicos y triplicados técnicos y las barras de error representan la media + DT. Los asteriscos indican diferencias significativas de los dos resultados anotados (* es $P \leq 0,05$; es $P \leq 0,001$) basándose en la prueba de Mann-Whitney. (B) Resultados representativos de citometría de flujo (a modo de ejemplo) con porcentaje de linfocitos NK mostrados.

Figura 5: Las células negativas de linaje (HPCs) se cultivaron en condiciones de producción de linfocitos NK con la adición de SR8278 5 o 10 μ M el Día 0, 1, 2, 3 o 4. En el Día 9, el porcentaje de linfocitos NK se cuantificó usando citometría de flujo. (A) Gráfico que muestra la producción relativa de linfocitos NK de ratón maduro (NK1.1⁺ CD3⁻) cuando se añadió SR8278 5 y 10 μ M en diferentes días en comparación con el control "Sin fármaco". (B) Resultados representativos de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados. La adición de SR8278 5 μ M se muestra en la parte superior, mientras que la adición de SR8278 10 μ M se muestra en la parte inferior. (C) El gráfico muestra el número de células vivas cuando se añadió SR8278 5 y 10 μ M en días diferentes. Los resultados se promediaron a partir de dos experimentos con cuatro repeticiones cada uno y las barras de error representan la media + DT. Los asteriscos indican diferencias significativas de los dos resultados anotados (* es $P \leq 0,01$, *** es $P \leq 0,0001$ y es $P \leq 0,00001$) basándose en la prueba de Mann-Whitney.

Figura 6: Las HPC se cultivaron en condiciones de producción de linfocitos NK con la adición de diferentes concentraciones de GSK4112. En el Día 9, el porcentaje de linfocitos NK se cuantificó usando citometría de flujo. (A) Gráfico que muestra la producción relativa de linfocitos NK de ratón maduro (NK1.1⁺ CD3⁻) para la adición de GSK4112 2, 5, 10 y 20 μ M en comparación con el control "Sin fármaco". (B) Resultados representativos de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados. Los resultados se promediaron a partir de dos experimentos con cuatro repeticiones cada uno y las barras de error representan la media + DT. Los asteriscos indican diferencias significativas de los dos resultados anotados (* es $P \leq 0,01$ y *** es $P \leq 0,0001$) basándose en la prueba de Mann-Whitney.

Figura 7: Las HPCs aisladas de ratones de tipo salvaje (WT), con genes inactivados E4bp4 (KO) o heterocigotos (Het) fueron cultivadas con la adición de SR8278 5 o 10 μ M. En el Día 9, el porcentaje de linfocitos NK se cuantificó usando citometría de flujo. Gráfico que muestra la producción relativa de linfocitos NK de ratón maduro (NK1.1⁺ CD3⁻) en comparación con el control "sin fármaco" en experimentos con ratones (A) WT, (B) Het y (C) E4bp4 KO. (D) Resultados representativos de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados para la adición de SR8278 10 μ M. Los resultados se promediaron a partir de dos experimentos con cuatro repeticiones cada uno y las barras de error representan la media + DT. Los asteriscos indican diferencias significativas de los dos resultados anotados (* es $P \leq 0,01$ y " es $P \leq 0,001$) basándose en la prueba de Mann-Whitney.

Figura 8: Las HPC se cultivaron con o sin SR8278 5 μ M añadido el Día 2. En los Días 3, 4 y 5, se recolectaron células con el fin de cuantificar sus expresiones de citocinas relativas mediante RT-qPCR. Las gráficas muestran

la expresión relativa de (A) E4bp4, (B) Id2 y (C) Eomes normalizados respecto al gen constitutivo, Hprt.

Figura 9: Las células CD34⁺ humanas se cultivaron con la adición de SR8278 5 μ M en el Día 4. En los Días 14 y 16, el porcentaje de células hCD56⁺ hCD45⁺ (marcadores para linfocitos NK humanos) se cuantificó usando citometría de flujo. (A) Gráfico que muestra el porcentaje de células hCD56⁺ hCD45⁺ en comparación con el control "Sin fármaco" en diferentes condiciones. (B) Estrategia de marcación-análisis para citometría de flujo para la identificación de linfocitos NK humanos. (C) Resultados representativos de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados. Los resultados se promediaron a partir de un experimento con seis repeticiones cada uno y las barras de error representan la media + DT.

Figura 10: (A) Estrategia de marcación-análisis para citometría de flujo para la identificación de preNKPs y rNKPs en la médula ósea de ratones WT (Parte superior) y REV-ERB- α KO (Parte inferior). El porcentaje de población seleccionada se muestra en cada gráfico de citometría de flujo (B) Resultados de citometría de flujo con porcentaje de linfocitos NK mostrados para la identificación de linfocitos NK de ratón en médula ósea (BM, por sus siglas en inglés) y bazo de ratones WT y REV-ERB- α KO. Los resultados se obtuvieron mediante el uso de la estrategia de marcación-análisis en la Figura 3B.

Figura 11: (A) Estrategia de marcación-análisis para citometría de flujo para la identificación de preNKPs y rNKPs en la médula ósea de ratones WT (Parte superior) y REV-ERB- α y REV-ERB- β doble KO (Parte inferior). El porcentaje de población seleccionada se muestra en cada gráfico de citometría de flujo. (B) Análisis de médula ósea de ratones REV-ERB- α/β doble KO. DKO = ratones con genes REV-ERB- α y - β eliminados, α Het/ β Het = ratones con solo un alelo de cada gen REV-ERB eliminado y β KO = ratones con el gen REV-ERB- β eliminado. N=2 para cada punto de datos. LMPP = células progenitoras pluripotentes linfoides-mieloides, CLP = células progenitoras linfoides comunes y NKP = células progenitoras de linfocitos NK. El eje y indica que estas cantidades celulares se representan como porcentaje de la población celular total de médula ósea de linaje negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Linfocitos citolíticos naturales

[0018] Los linfocitos citolíticos naturales (NK) presentan el nivel más alto de actividad citotóxica dentro del sistema inmunitario. Los linfocitos NK son similares a las células B y células T, pero carecen de receptores de antígeno de superficie celular específicos. En cambio, los linfocitos NK tienen receptores activadores e inhibidores que reconocen motivos.

[0019] Los linfocitos NK circulan en la sangre y en los órganos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos y el bazo. Pueden activarse por citocinas o al encontrar células diana. El reconocimiento y la eliminación de las células diana se basa en el equilibrio entre las señales inhibitoras y activadoras. Las señales activadoras son generadas por receptores activadores (NKG2D, NKP46, NKP30) que se unen a ligandos, que pueden estar presentes no solo en células cancerosas, infectadas por patógenos y dañadas, sino también en células sanas. Por otro lado, las señales inhibitoras se generan cuando los receptores inhibidores (KIR, CD94/NKG2A) en linfocitos NK se unen a moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés) clase I que normalmente están presentes en todas las células sanas. Las moléculas del MHC clase I en las células diana están ausentes o muy reguladas por disminución, lo que las convierte en dianas de linfocitos NK ideales. Esto permitió que los linfocitos NK distinguieran entre células diana y células sanas. Para que los linfocitos NK reconozcan y destruyan las células diana, las señales activadoras generales deben ser mayores que las señales inhibitoras.

[0020] Los linfocitos NK reconocen y destruyen células cancerosas, infectadas por patógenos y dañadas sin sensibilización previa, lo que los convierte en parte de la respuesta inmunitaria innata. Por ejemplo, los linfocitos NK proporcionan una respuesta temprana a la infección por virus, que se produce antes de que las células T destruyan las células infectadas. Los linfocitos NK pueden destruir las células diana en cuestión de minutos. Los linfocitos NK también secretan citocinas y "arman" otras partes del sistema inmunitario. Por ejemplo, los linfocitos NK promueven la función efectora de linfocitos T y mejoran la citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

[0021] Los linfocitos NK se diferencian de las células madre hematopoyéticas (HSCs) a través de la ruta establecida en la Figura 1. Más detalladamente, los linfocitos NK se desarrollan a partir de HSCs en células progenitoras linfoides comunes (CLP), células progenitoras de pre-NK (pre-NKP), células progenitoras de NK (NKP), linfocitos NK inmaduros (iNK), linfocitos NK maduros (mNK) y finalmente en linfocitos NK convencionales (cNK), que circulan en el torrente sanguíneo. Aunque esta terminología se deriva del desarrollo de los linfocitos NK en los ratones, en el desarrollo de los linfocitos NK humanos se produce una ruta correspondiente. Por ejemplo, las HSC se desarrollan a través de múltiples fases de precursores (fases 1, 2 y 3), antes de convertirse en linfocitos NK maduros (fases 4 y 5). Para mayor coherencia, en esta solicitud se usan células HSC, CLP, preNKP, NKP, iNK, mNK, cNK y NK de referencia. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, estos términos son intercambiables con las fases 1 a 5 de la nomenclatura humana. Bajo el diagrama de la ruta de la Figura 1 se encuentran las citocinas y los factores de transcripción que son esenciales para el desarrollo de linfocitos NK. La IL-15 es una de las principales citocinas necesarias para el desarrollo de los linfocitos NK. Otros factores extrínsecos, como las células estromales específicas, también son necesarios para el desarrollo y la maduración de los linfocitos NK. Según la presente invención, las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs) son una población heterogénea que contiene progenitores

multipotenciales tales como HSCs, CLPs y también NKPs. Las HPC se denominan células negativas de linaje, ya que aún no se han comprometido con una ruta de desarrollo. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, las HSC, las células CLP y las células NKP son todas HPCs y una referencia a HPCs es una referencia a cualquiera de las HSCs, células CLP y/o células NKP, o cualquier combinación de estas, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

[0022] Debido a la importancia de los linfocitos NK en la respuesta inmunitaria, múltiples ensayos clínicos han analizado la eficacia de los linfocitos NK en protocolos de transferencia adoptiva. Típicamente se trata de una transferencia alogénica, con los linfocitos NK aislados de un donante sano y expandidos. Sin embargo, la regulación por disminución de las moléculas de MHC clase I en las células diana es parcial y el genotipo KIR de donantes y receptores puede ser similar. Debido a esto, los linfocitos NK transfundidos a los receptores, incluso de diferentes individuos, pueden no unirse a las células diana si sus KIR reconocen moléculas MHC clase I. Por lo tanto, es crucial que los donantes de linfocitos NK se sometan a un cribado para determinar su genotipo KIR, donde el donante debe tener el polimorfismo alélico KIR apropiado para el receptor para permitir el reconocimiento de células diana para su destrucción. Por otra parte, se descubrió que los productos expandidos tenían una tasa de éxito clínico más baja de lo esperado, con menos capacidad para destruir células cancerosas o infectadas.

[0023] Un linfocito NK se puede definir en términos de su expresión marcadora, su función/actividad o una combinación de las mismas. Dichas definiciones son estándares en la técnica y se conocen procedimientos mediante los cuales se puede evaluar la expresión del marcador y/o la actividad de los linfocitos NK. Por lo tanto, un experto en la materia sería capaz de clasificar fácilmente una célula como un linfocito NK usando metodología y definiciones convencionales.

[0024] Por ejemplo, las células mNK y cNK pueden reconocerse por su expresión de los marcadores de superficie CD16 (FcγRIII) y/o CD56, típicamente CD16 y CD56 en humanos, y NK1.1 o NK1.2 en algunas cepas de ratones. Nkp46 es otro marcador para células mNK y cNK, y se expresa en humanos y varias cepas de ratones. Por lo tanto, Nkp46 se puede usar como marcador para linfocitos NK con o sin CD16 y/o CD56 (en humanos) o con o sin NK1.1 o NK1.2 (en ratones). Otros ejemplos de marcadores que se pueden usar para identificar/definir linfocitos NK según la presente invención incluyen Ly49, receptores de citotoxicidad natural (NCRs, por sus siglas en inglés), CD94, NKG2, receptores similares a inmunoglobulinas de linfocitos citolíticos (KIR, por sus siglas en inglés) y/o receptores inhibidores de leucocitos (ILT o LIR, por sus siglas en inglés), o cualquier combinación de estos, incluso en combinación con CD16 y/o CD56 (en humanos) o NK1.1/NK1.2 (en ratones). En algunas realizaciones preferidas, los linfocitos NK maduros según la invención (es decir, células mNK y cNK) son CD56⁺ y CD45⁺, y también pueden ser CD16⁺. Como se usa en esta solicitud, el término linfocito NK humano maduro comprende linfocitos NK que son CD56^{brillante} (fase 4) y CD56^{tenue} (fase 5), los cuales son CD56⁺. Los linfocitos NK maduros también se pueden definir por la ausencia de marcadores, tales como CD34, y marcadores de linfocitos CD3 y/o CD19. Por lo tanto, los linfocitos NK maduros de la invención pueden ser CD56⁺, CD45⁺, CD16⁺, CD3⁻ y/o CD19⁻, o cualquier combinación de los mismos, tal como CD56⁺, CD45⁺, CD16⁺, CD3⁻ y CD19⁻.

[0025] Además o alternativamente, un NK puede ser identificado por/definido en términos de su actividad. Por ejemplo, un linfocito NK puede identificarse/definirse mediante la presencia de gránulos citolíticos dentro de su citoplasma, mediante su capacidad para secretar moléculas antimicrobianas tales como α-defensinas, y/o su capacidad para secretar citocinas tales como TNF-α, IL-10, IFN-γ y TFG-β.

[0026] A menos que se indique lo contrario en esta solicitud, una referencia a linfocitos NK incluye una referencia a células iNK, mNK y cNK. Las HSC, células CLP y NKPs se denominarán típicamente como tales.

Poblaciones de linfocitos NK expandidas

[0027] Tal como se describe en esta solicitud, la invención proporciona procedimientos para generar una población expandida de linfocitos NK (a los que se hace referencia indistintamente en esta solicitud como una población de linfocitos NK expandida o una población de linfocitos NK). Cualquiera de la descripción en esta solicitud en relación con los linfocitos NK de la presente invención también se puede aplicar a una población de linfocitos NK expandida de la invención.

[0028] Típicamente, una población de linfocitos NK expandida producida por un procedimiento de la invención comprende células iNK, células mNK y/o células cNK, o una combinación de las mismas. Dicha población puede comprender HPCs, tales como HSCs, células CLP y/o NKPs, o una combinación de las mismas, aunque la cantidad de dichas células es típicamente baja con respecto a la cantidad de linfocitos NK, ya que la mayoría de estas HPC se han diferenciado en linfocitos NK en la población. Dicha población puede comprender otras células inmunitarias y/o no inmunitarias. De nuevo, el número de cualquiera de dichas células es típicamente bajo con respecto al número de linfocitos NK presentes en la población.

[0029] Como ejemplo no limitativo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más, hasta el 100 % de las células de una

población de linfocitos NK expandida pueden ser linfocitos NK. Típicamente, al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % de las células de una población de linfocitos NK expandida son linfocitos NK.

5 **[0030]** Al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más, hasta el 100 % de las células de una población de linfocitos NK expandida producidas mediante un procedimiento de la invención son linfocitos NK maduros (es decir, células mNK y/o células cNK). Preferentemente, al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % e incluso más
10 preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 % o más de las células de una población de linfocitos NK expandida son linfocitos NK maduros.

[0031] La cantidad de HPCs (que incluyen HSCs, células CLP y/o NKPs) puede ser inferior a 40 %, inferior a 30 %, inferior a 25 %, inferior a 20 %, inferior a 15 %, inferior a 14 %, inferior a 13 %, inferior a 12 %, inferior a 11 %, inferior a 10 %, inferior a 9 %, inferior a 8 %, inferior a 7 %, inferior a 6 %, inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, inferior a 1 % de las células de la población de linfocitos NK expandida. Típicamente, el número de HPCs (que incluye HSCs, células CLP y/o NKPs) es inferior al 20 %, preferentemente inferior al 10 %, más preferentemente inferior al 5 %, incluso más preferentemente inferior al 2 % o inferior de las células de la población de linfocitos NK expandida.
20

[0032] El número de otras células inmunitarias y/o no inmunitarias puede ser inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 25 %, inferior al 20 %, inferior al 15 %, inferior al 14 %, inferior al 13 %, inferior al 12 %, inferior al 11 %, inferior al 10 %, inferior al 9 %, inferior al 8 %, inferior al 7 %, inferior al 6 %, inferior al 5 %, inferior al 4 %, inferior al 3 %, inferior al 2 %, inferior al 1 % de las células de la población de linfocitos NK expandida. Típicamente, el número de otras células inmunitarias y/o no inmunitarias es inferior al 20 %, preferentemente inferior al 10 %, más preferentemente inferior al 5 % de las células, incluso más preferentemente inferior al 2 %, o inferior a la población de linfocitos NK expandida.
25

[0033] Tal como se describe en esta solicitud, las poblaciones de linfocitos NK expandida preparadas mediante los procedimientos de la presente invención ofrecen varias ventajas sobre las poblaciones de linfocitos NK preparadas mediante procedimientos de transferencia adoptiva convencionales. En particular, los procedimientos de la presente invención permiten la producción de poblaciones expandidas con mayor número de linfocitos NK en comparación con los procedimientos convencionales. Además, una mayor proporción de los linfocitos NK en una población de la invención son funcionales, preferentemente, completamente funcionales, en comparación con las poblaciones obtenidas mediante procedimientos convencionales, en las cuales un gran número de los linfocitos NK son "agotados".
30 35

[0034] Como se usa en esta solicitud, el término "agotado" en el contexto de los linfocitos NK significa que una población de linfocitos NK o linfocitos NK expandida ha perdido al menos algunas de sus funciones efectoras, tales como función citotóxica, producción de citocinas y/o ADCC. Por lo tanto, una población de linfocitos NK agotados o de linfocitos NK expandida puede presentar una supervivencia alterada, una función citotóxica alterada, una producción de citocinas alterada o modificada y/o una ADCC alterada. Por ejemplo, una población de linfocitos NK agotados o de linfocitos NK agotados puede presentar al menos una reducción del 50 % en una de sus funciones efectoras. Por ejemplo, al menos una reducción del 50 % en la secreción de citocinas, al menos una reducción del 50 % en ADCC y/o al menos una reducción del 50 % en la actividad citotóxica. Estos valores se pueden cuantificar con respecto a cualquier control apropiado como se define en esta solicitud. Se puede usar cualquier técnica apropiada para determinar la función efectora y, por lo tanto, para cuantificar y reducir la misma. Dichas técnicas son conocidas en la técnica. De manera alternativa y/o adicional, los linfocitos NK agotados pueden presentar una expresión marcadora modificada, tal como un aumento en la expresión de uno o más receptores inhibidores (como se describe en esta solicitud) y/o una disminución en la expresión de uno o más receptores activadores (como se describe en esta solicitud). En algunas realizaciones, el aumento de la expresión de NKG2A y/o Tim3 se puede usar como un marcador para el agotamiento de linfocitos NK. De nuevo, la expresión de estos marcadores se puede cuantificar con respecto a cualquier control apropiado como se define en esta solicitud.
40 45 50

[0035] Por el contrario, los términos "funcional" y "completamente funcional" en el contexto de los linfocitos NK significan que una población de linfocitos NK o linfocitos NK expandida tiene todas las funciones efectoras esperadas cuando responde a una exposición inmunitaria dada. Por lo tanto, un linfocito NK (completamente) funcional o una población de linfocitos NK expandida presentará típicamente una función citotóxica, producción de citocinas y/o ADCC como se observaría *in vivo* cuando los linfocitos NK se activan en respuesta a una exposición inmunitaria, y presentará típicamente una supervivencia mejorada en comparación con los linfocitos NK producidos usando procedimientos convencionales. De manera alternativa y/o adicional, los linfocitos NK (completamente) funcionales pueden presentar una expresión marcadora modificada, tal como un aumento en la expresión de uno o más receptores activadores (como se describe en esta solicitud) y/o una disminución en la expresión de uno o más receptores inhibidores (como se describe en esta solicitud). Como ejemplo no limitativo, un linfocito NK humano funcional (maduro) puede ser CD56⁺ y/o CD45⁺, preferentemente tanto CD56⁺ como CD45⁺.
55 60

[0036] Como ejemplo no limitativo, la citotoxicidad de los linfocitos NK se puede determinar mediante el uso de
65

un ensayo de degranulación en linfocitos NK coincubados con "células diana". Un ensayo de degranulación implica analizar la expresión de CD107a dentro de la población de linfocitos NK. La cantidad de CD107a se correlaciona con la secreción de citocinas y la lisis mediada por linfocitos NK de células diana. Los linfocitos NK también se pueden analizar para la expresión de interferón- γ (IFN- γ), que es la principal citocina secretada cuando se activan los linfocitos NK funcionales. Los linfocitos NK que son funcionales deben expresar CD107a similar o superior, así como IFN- γ en comparación con un control.

[0037] Cualquier aumento en el número/funcionalidad de linfocitos NK en una población de linfocitos NK expandida preparada mediante un procedimiento de la presente invención se puede comparar con el número/función de linfocitos NK de una población de linfocitos NK obtenida a partir de un procedimiento de control como se describe en esta solicitud. Un procedimiento de control puede ser cualquier procedimiento estándar conocido en la técnica para producir poblaciones de linfocitos NK. Por ejemplo, un procedimiento de control puede usar técnicas de transferencia adoptiva convencionales, en lugar de un procedimiento que usa un inhibidor de REV-ERB según la presente invención. Los linfocitos NK y las poblaciones de linfocitos NK producidas por dichos procedimientos de control/convencionales se pueden usar como células y poblaciones de control como se describe en esta solicitud.

[0038] Ya que una población de linfocitos NK expandida preparada mediante un procedimiento de la presente invención comprende significativamente menos linfocitos NK agotados en comparación con las poblaciones de linfocitos NK preparadas convencionalmente, pero en cambio contiene una mayor proporción de linfocitos NK completamente funcionales, esto permite ventajosamente el uso de cantidades más pequeñas de células para tratar pacientes.

[0039] Tal como se describe en esta solicitud, los procedimientos de la invención producen poblaciones de linfocitos NK expandida con una mayor proporción de linfocitos NK (completamente) funcionales en comparación con los procedimientos convencionales, que producen poblaciones con grandes cantidades de linfocitos NK "agotados". Típicamente, en una población de linfocitos NK expandida de la invención al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más, hasta el 100 % de los linfocitos NK de una población de linfocitos NK expandida de la invención son (completamente) funcionales. Típicamente, al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 98 % o más de los linfocitos NK de una población de linfocitos NK expandida de la invención son completamente funcionales, según cualquier definición (por ejemplo, definición de función marcadora y/o efectora) en esta solicitud.

[0040] Se puede producir una población de linfocitos NK expandida mediante cualquiera de los procedimientos descritos en esta solicitud. Típicamente, se produce una población de linfocitos NK expandida mediante un procedimiento *ex vivo* como se describe en esta invención.

E4bp4

[0041] E4bp4 (también conocido como Nfil3) es un factor de transcripción de proteína de cremallera de leucina básica que participa en la regulación de la expresión de IL-3, y participa en la coordinación del reloj circadiano. La secuencia de ADN genómico del gen E4bp4 humano se proporciona en la SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso a Genbank X64318, versión X64318.1). Como se muestra en la Figura 1, E4bp4 se expresa en CLPs y es fundamental en la producción de linfocitos NK a partir de progenitores de células madre sanguíneas. Los ratones con el gen E4bp4 eliminado no tienen linfocitos NK funcionales, pero tienen números normales de células T y B. Por el contrario, la sobreexpresión de E4bp4 en HSCs *in vitro* aumenta la producción de linfocitos NK. Por lo tanto, E4bp4 es un factor de compromiso de linaje, que controla el desarrollo de NKPs a partir de HSCs (Figura 1). La función crítica de E4bp4 en linfocitos NK es específica para las primeras fases de la ruta de desarrollo, ya que la ablación específica de E4bp4 en células mNK periféricas no afecta al número de linfocitos NK ni a la respuesta a la infección por citomegalovirus. Asimismo, E4bp4 regula otros factores de transcripción que son esenciales en el desarrollo de linfocitos NK, tales como Id2 y Eomes.

[0042] Aunque se ha demostrado que IL-7 e IL-15 regulan la expresión de E4bp4, generalmente se sabe muy poco sobre cómo los estímulos extrínsecos o intrínsecos influyen en E4bp4. Los factores de transcripción como E4bp4 pueden ser difíciles de dirigir debido a su estructura y función. Por ejemplo, por lo general, carecen de actividad enzimática o sitios de unión a cofactores. Sin embargo, como se demuestra en los Ejemplos en esta solicitud, los presentes inventores han descubierto que la expresión de E4bp4 se puede aumentar usando un compuesto que inhibe la actividad de REV-ERB. Además, los presentes inventores han demostrado que el uso de un inhibidor de REV-ERB para aumentar la expresión de E4bp4 da como resultado un aumento en el número de linfocitos NK. Sin desear quedar limitado a la teoría, el REV-ERB se une a la porfirina hemo, y es esta característica la que se cree que hace que el REV-ERB sea una diana susceptible de convertirse en fármacos (véase más adelante). En resumen, los inventores han demostrado que al dirigirse a REV-ERB e inhibir su actividad, es posible aumentar la expresión de E4bp4 y, por ello, aumentar el número de linfocitos NK. Por consiguiente, la presente invención hace referencia a compuestos que inhiben la acción de REV-ERB y su uso para aumentar la expresión de E4bp4 y, por ello, el número de linfocitos NK.

Aumento de la expresión de E4bp4

[0043] Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos *ex vivo* para producir poblaciones de linfocitos NK expandidas, y procedimientos terapéuticos y aplicaciones para aumentar el número de linfocitos NK en un paciente que lo necesite. Tal como se describe en esta solicitud, dichos procedimientos y aplicaciones implican el uso de un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB. Típicamente, dichos compuestos actúan aumentando la expresión de E4bp4.

[0044] Un aumento de la expresión de E4bp4 se puede medir con respecto a un control. Por lo tanto, la expresión de E4bp4 en una muestra de HPCs, una población de linfocitos NK expandida o en una muestra obtenida de un paciente a tratar según la invención se puede comparar con la expresión de E4bp4 en un control. La expresión puede cuantificarse en términos de expresión génica y/o proteica, y puede compararse con la expresión de un control (por ejemplo, gen constitutivo o proteína). La cantidad real del gen E4bp4, transcrito y/o proteína de ARNm, tal como la masa, cantidad molar, concentración o molaridad del gen E4bp4, transcrito y/o proteína de ARNm, o la cantidad de moléculas de ARNm por célula en una muestra de HPCs, una población de linfocitos NK expandida o en una muestra obtenida de un paciente a tratar según la invención y el control se puede evaluar y comparar con el valor correspondiente del control. De manera alternativa, la expresión del gen y/o proteína E4bp4 en una muestra de HPCs, una población de linfocitos NK expandida o en una muestra obtenida de un paciente a tratar según la invención se puede comparar con la del control sin cuantificar la masa, cantidad molar, concentración o molaridad del uno o más genes y/o proteínas.

[0045] Típicamente, el control es una población o muestra equivalente en la que no se ha realizado ningún aumento de la expresión de E4bp4. Como ejemplo no limitativo, en el caso de que un paciente sea tratado con un compuesto que inhibe la actividad de REV-ERB con el fin de aumentar la expresión de E4bp4, un control adecuado sería un individuo diferente al que no se le ha administrado el compuesto o el mismo individuo antes de la administración del compuesto. Los procedimientos convencionales para la expansión *ex vivo* de linfocitos NK, incluidos los procedimientos conocidos, pueden considerarse procedimientos de control según la presente invención.

[0046] En el contexto de la presente invención, se puede entender que una referencia al aumento de la expresión de E4bp4 significa que la expresión de E4bp4 aumenta en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 150 %, al menos el 200 % en comparación con el control. Típicamente, la expresión de E4bp4 aumenta en al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 % o más en comparación con el control.

[0047] Se puede entender que una referencia al aumento de la expresión de E4bp4 significa que la expresión de E4bp4 se incrementa al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,6 veces, al menos 2,7 veces, al menos 2,8 veces, al menos 2,9 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces o más con respecto a un control. Típicamente, la expresión génica de E4bp4 aumenta al menos 2 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,6 veces, al menos 2,7 veces, al menos 2,8 veces, al menos 2,9 veces, al menos 3 veces o más en comparación con el control. Típicamente, la expresión de la proteína E4bp4 aumenta al menos 2 veces, al menos 3 veces, preferentemente al menos 5 veces, más preferentemente al menos 6 veces o más en comparación con el control.

[0048] La expresión del gen y/o proteína E4bp4 según la invención se puede determinar mediante análisis cuantitativo y/o cualitativo. Típicamente, la expresión génica se puede expresar en términos de niveles de ARNm.

[0049] El nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 según la invención abarca la masa del transcrito y/o proteína de ARNm de E4bp4, la cantidad molar del gen, transcrito y/o proteína E4bp4, la concentración del gen y/o proteína E4bp4 y la molaridad del gen y/o proteína E4bp4. Este nivel de expresión podrá indicarse en cualquier unidad apropiada. Por ejemplo, la concentración del gen y/o proteína E4bp4 se puede dar en pg/ml, ng/ml o µg/ml.

[0050] El nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 según la invención se puede medir directa o indirectamente.

[0051] La expresión relativa del gen y/o proteína E4bp4 según la invención con respecto a un control se puede determinar usando cualquier técnica apropiada. En la técnica se conocen técnicas convencionales adecuadas, por ejemplo, inmunoelectrotransferencia, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) y RT-qPCR.

[0052] El nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 puede aumentarse en comparación con un control durante al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana. Preferentemente, el nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 aumenta

durante al menos 12 a 72 horas. Típicamente, esto se evalúa con respecto a la última administración del compuesto que inhibe la actividad de REV-ERB.

[0053] El nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 puede aumentarse en comparación con un control para al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o más pases de los precursores de linfocitos NK en cultivo. El nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 puede modificarse indefinidamente.

REV-ERB

[0054] Las proteínas REV-ERB son miembros de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción intracelular. La secuencia de ARNm del gen REV-ERB- α humano (Nr1d1) se proporciona en la SEQ ID NO: 3 (N.º de acceso a Genbank NM_021724, versión NM_021724.4). La secuencia de ARNm del gen REV-ERB- β humano (Nr1d2) se proporciona en la SEQ ID NO: 5 (N.º de acceso a Genbank AB307693, versión AB307693.1). REV-ERB regula el reloj circadiano, y también participa en la regulación de la descomposición del cartílago. Anteriormente se ha demostrado que los ratones con genes inactivados REV-ERB- α han disminuido el número de células TH17 en comparación con la cepa de ratón de tipo salvaje correspondiente. Sin embargo, el papel de REV-ERB en el desarrollo de linfocitos NK no ha sido investigado previamente.

[0055] El control de la expresión de E4bp4 es un complejo mecanismo de múltiples componentes, que involucra muchos factores de transcripción que se unen a las regiones reguladoras de E4bp4, de las cuales REV-ERB es solo uno. Los presentes inventores han demostrado por vez primera que la inhibición de la actividad de REV-ERB es suficiente para provocar un aumento significativo de la expresión de E4bp4, y que esto, a su vez, produce una expansión de linfocitos NK, lo que resulta en un aumento del número de linfocitos NK. Como se demuestra en los Ejemplos de esta solicitud, los presentes inventores han demostrado por vez primera que la inhibición de la actividad de REV-ERB puede provocar un aumento del número de linfocitos NK, y que típicamente los linfocitos NK resultantes son (completamente) funcionales como se define en esta solicitud. Los inventores han demostrado además que el efecto de la inhibición de REV-ERB está mediado de una manera dependiente de E4bp4. Sin desear quedar limitado a la teoría, se cree que la inhibición de la actividad de REV-ERB da lugar a un aumento de la expresión de E4bp4 (la expresión de E4bp4 normalmente es reprimida por REV-ERB), y que E4bp4 actúa para estimular la producción de linfocitos NK (como se muestra en la Figura 1). En particular, los presentes inventores han demostrado que la molécula pequeña SR8278 es capaz de unirse al resto porfirina hemo de REV-ERB, lo que da lugar a la inhibición de la actividad de REV-ERB y a un aumento del número de linfocitos NK.

[0056] Por consiguiente, la presente invención hace referencia a compuestos que inhiben la acción de REV-ERB y su uso para aumentar la expresión de E4bp4 y, por ello, el número de linfocitos NK.

Inhibición de la actividad de REV-ERB

[0057] La presente invención se refiere al uso de compuestos para inhibir la acción de REV-ERB, es decir, compuestos que inhiben la actividad de REV-ERB. La actividad de REV-ERB puede inhibirse por cualquier medio apropiado. En la técnica se conocen técnicas convencionales adecuadas. La inhibición puede tener lugar a través de cualquier mecanismo adecuado, dependiendo, por ejemplo, de la naturaleza (véase más adelante) del compuesto usado, por ejemplo, interferencia estérica en cualquier interacción o inhibición directa o indirecta de REV-ERB. En el contexto de la presente invención, un inhibidor de REV-ERB (denominado indistintamente en esta solicitud antagonista de REV-ERB) es cualquier compuesto que inhibe, disminuye, suprime o extirpa la acción de REV-ERB, ya sea en parte o completamente.

[0058] Una disminución de la actividad de REV-ERB se puede medir con respecto a un control. Por lo tanto, la actividad de REV-ERB en una muestra de células precursoras o progenitoras de NK, una población de linfocitos NK expandida o en una muestra obtenida de un paciente a tratar según la invención se puede comparar con la actividad de REV-ERB en un control. La actividad se puede cuantificar en cualquier término apropiado, por ejemplo, la unión de REV-ERB al gen E4bp4, o en términos de expresión de E4bp4 como se define en esta invención. Se puede usar cualquier técnica o procedimiento apropiado para cuantificar la actividad de REV-ERB. En la técnica se conocen técnicas adecuadas, por ejemplo, ensayos de luciferasa para cuantificar la expresión de un gen indicador.

[0059] Típicamente, el control es una población o muestra equivalente en la que no se ha añadido ningún compuesto inhibidor de REV-ERB, por ejemplo, una muestra obtenida de un individuo diferente al que no se le ha administrado el compuesto, o el mismo individuo antes de la administración del compuesto. Los procedimientos convencionales para la expansión *ex vivo* de linfocitos NK, incluidos los procedimientos conocidos, pueden considerarse procedimientos de control según la presente invención.

[0060] En el contexto de la presente invención, se puede entender que una referencia a la inhibición de la actividad de REV-ERB significa que la actividad de REV-ERB disminuye en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el

95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, hasta la inhibición total (100 %) de la actividad de REV-ERB, en comparación con el control. Típicamente, la actividad de REV-ERB disminuye en al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95 % o más en comparación con el control.

5

[0061] La actividad de REV-ERB puede determinarse mediante análisis cuantitativo y/o cualitativo, y puede medirse directa o indirectamente.

[0062] La actividad de REV-ERB en relación con un control puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada. En la técnica se conocen técnicas convencionales adecuadas, tales como mediante la cuantificación de la expresión de E4bp4 y/o ensayos de luciferasa.

[0063] La actividad de REV-ERB puede inhibirse en comparación con un control durante al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana. Preferentemente, la actividad de REV-ERB disminuye durante al menos 12 a 72 horas. Típicamente, esto se evalúa con respecto a la última administración del compuesto que inhibe la actividad de REV-ERB.

[0064] La actividad de REV-ERB puede inhibirse en comparación con un control para al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o más pases de las células (ya sea *in vivo*, o cultivadas *ex vivo* o *in vitro*). La actividad de REV-ERB puede inhibirse y/o el nivel de expresión del gen y/o proteína E4bp4 puede modificarse indefinidamente.

[0065] En el contexto de la presente invención, se puede entender que cualquier referencia a la inhibición de la actividad de REV-ERB significa la inhibición de la actividad de REV-ERB- α y/o REV-ERB- β . En realizaciones preferidas, se inhibe la actividad tanto de REV-ERB- α como de REV-ERB- β . Por lo tanto, la invención se refiere a compuestos que inhiben la actividad de REV-ERB, incluyendo compuestos que inhiben la actividad de REV-ERB- α (es decir, inhibidores de REV-ERB- α , también denominados antagonistas de REV-ERB- α) y/o a compuestos que inhiben la actividad de REV-ERB- β (es decir, inhibidores de REV-ERB- β , también denominados antagonistas de REV-ERB- β). En realizaciones preferidas, la invención se refiere a compuestos que inhiben la actividad tanto de REV-ERB- α como de REV-ERB- β (es decir, inhibidores de REV-ERB- α y de REV-ERB- β , también denominados antagonistas de REV-ERB- α y REV-ERB- β).

Antagonistas/inhibidores de REV-ERB

35

[0066] Los compuestos de la invención pueden ser específicos para REV-ERB. Por específico, se entenderá que el compuesto se une a REV-ERB- α y/o a REV-ERB- β , sin que haya una reactividad cruzada significativa con ninguna otra molécula, en particular con ninguna otra proteína. Por ejemplo, el modulador que es específico para REV-ERB- α y/o REV-ERB- β no mostrará reactividad cruzada significativa con la elastasa de neutrófilos humana. La reactividad cruzada se puede evaluar mediante cualquier procedimiento adecuado. La reactividad cruzada del inhibidor de REV-ERB- α y/o REV-ERB- β con una molécula que no sea REV-ERB- α y/o REV-ERB- β puede considerarse significativa si el inhibidor se une a la otra molécula al menos en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 100 % con la misma fuerza con la que se une a REV-ERB- α y/o REV-ERB- β . Un inhibidor que es específico para REV-ERB- α y/o REV-ERB- β puede unirse a otra molécula tal como elastasa de neutrófilos humana con menos de 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 % de la fuerza con que se une a REV-ERB- α y/o REV-ERB- β . Preferentemente, el inhibidor se une a la otra molécula con menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 % o menos del 5 %, menos del 2 % o menos del 1 % de la fuerza con que se une a REV-ERB- α y/o REV-ERB- β .

[0067] Los compuestos de la invención pueden tener efectos inespecíficos. Un efecto inespecífico es la actividad contra una diana distinta de REV-ERB. Típicamente, los compuestos con efectos inespecíficos están abarcados por la presente invención si la actividad contra la diana que no es REV-ERB no es significativa en comparación con la actividad contra REV-ERB. El hecho de que un efecto inespecífico sea significativo puede depender del uso previsto del compuesto. Como ejemplo no limitativo, un compuesto que puede ejercer un efecto inespecífico en el sistema nervioso central no sería significativo para un compuesto usado en un procedimiento *ex vivo* como se describe en esta solicitud, pero puede ser significativo (dependiendo de la magnitud del efecto inespecífico) para una indicación terapéutica *in vivo* como se describe en esta solicitud. La presencia y magnitud de cualquier efecto potencial inespecífico se puede evaluar fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

60

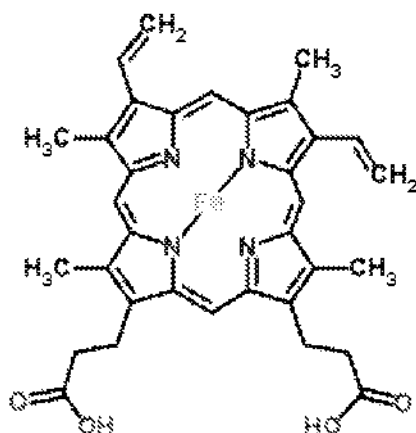
[0068] Se puede usar cualquier inhibidor adecuado según la invención, por ejemplo, moléculas pequeñas, reactivos PROTAC, ARN bicatenario (ARNbc), ARN de interferencia pequeña (ARNip), ARN de horquilla pequeña (ARNhp), microARN, ARN antisentido (monocatenario), péptidos y peptidomiméticos, anticuerpos, aptámeros y ribozimas. Los inhibidores preferidos incluyen moléculas pequeñas y reactivos PROTAC.

65

Moléculas pequeñas

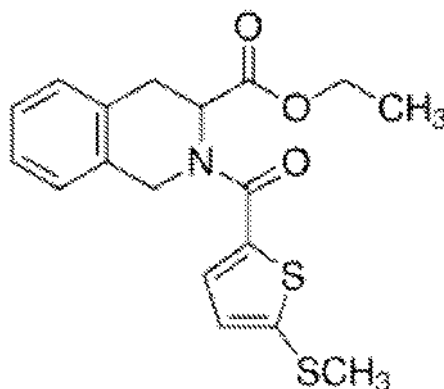
[0069] Se pueden usar moléculas pequeñas para inhibir la actividad de REV-ERB como se describe en esta invención. Tal como se define en esta invención, las moléculas pequeñas son compuestos de bajo peso molecular, típicamente compuestos orgánicos. Típicamente, una molécula pequeña tiene un peso de molécula máximo de 900 Da, lo que permite una difusión rápida a través de las membranas celulares. En algunas realizaciones, el peso molecular máximo de una molécula pequeña es de 500 Da. Típicamente, una molécula pequeña tiene un tamaño del orden de 1 nm.

[0070] Según la presente invención, las moléculas pequeñas pueden ejercer un efecto inhibitor sobre la actividad de REV-ERB mediante la unión al resto porfirina hemo de REV-ERB. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB según la presente invención es un compuesto que se une al resto porfirina hemo de REV-ERB y, por ello, inhibe la actividad de REV-ERB. De manera alternativa, la molécula pequeña puede actuar mediante un mecanismo diferente, por ejemplo, mediante la unión a una parte no hemo de REV-ERB. En la técnica se conocen técnicas convencionales para la producción de moléculas pequeñas, que luego se pueden evaluar fácilmente para determinar la actividad inhibitora de REV-ERB como se describe en esta solicitud.



Estructura de porfirina hemo

[0071] En una realización preferida, la invención se refiere a la molécula pequeña éster etílico del ácido 1,2,3,4-tetrahidro-2-[[5-(metiltio)-2-tienil]carbonil]-3-isoquinolincarboxílico, denominado en esta solicitud SR8278 como inhibidor de REV-ERB.



Estructura de SR8278

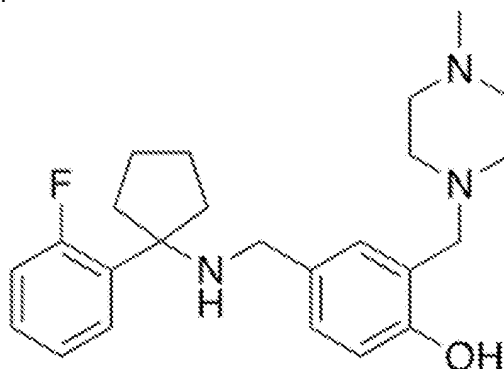
[0072] La invención también comprende el uso de variantes de SR8278 que conservan la función inhibitora de REV-ERB de SR8278.

[0073] Cualquier molécula pequeña que ejerza un efecto inhibitor sobre la actividad de REV-ERB puede usarse como un inhibidor de REV-ERB según la presente invención. Dichos inhibidores de moléculas pequeñas también se pueden unir a REV-ERB. Los ejemplos de otras moléculas pequeñas que se pueden usar como inhibidores de REV-ERB según la presente invención incluyen 4-[[[1-(2-fluorofenil)ciclopentil]amino]metil]-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]fenol (también denominado en esta solicitud como ARN5187), 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil) ((5-nitrotiofen-2-il) metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida, 4-((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-(1-

metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina
il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina.

y

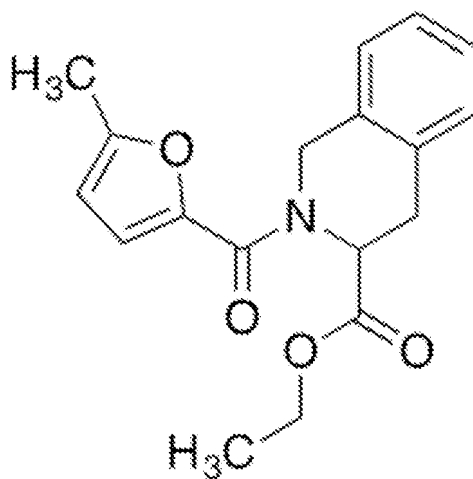
1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-



Estructura de ARN5187

5

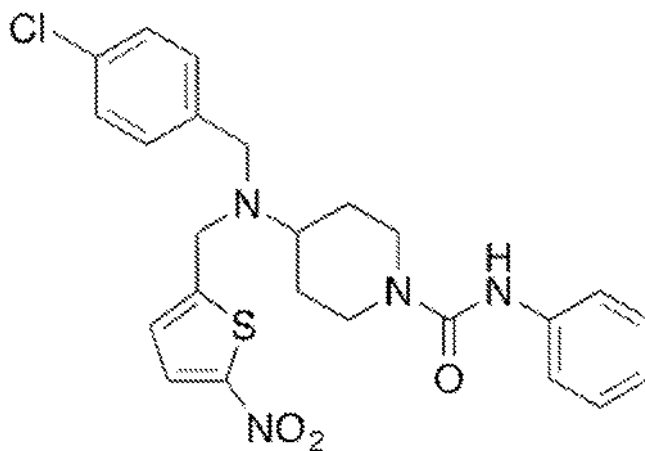
[0074]



Estructura de 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo

10

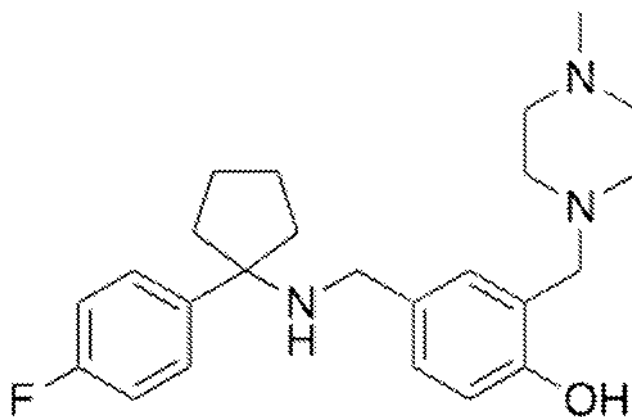
[0075]



Estructura de 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida

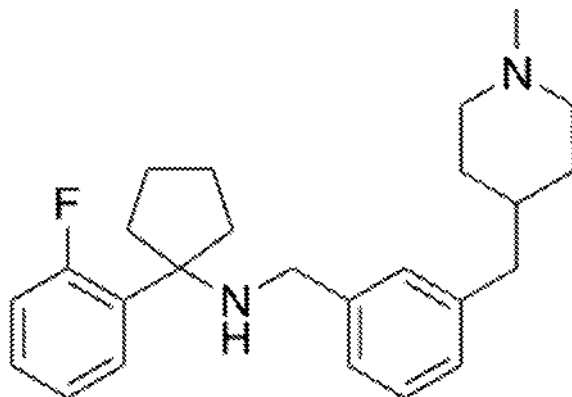
15

[0076]



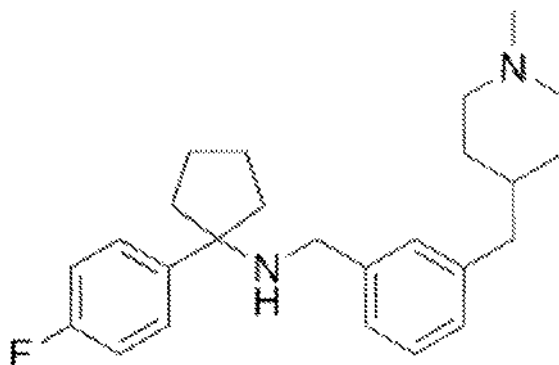
Estructura de 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol

5 [0077]



Estructura de 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina

10 [0078]



Estructura de 1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina

- 15 [0079] La invención también comprende el uso de variantes de ARN5187, 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida, 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina o 1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina que conservan la función inhibidora de REV-ERB de ARN5187, 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-hidrohidrotetraquinil-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidina-1-carboxamida, 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina o 1-(4-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina, respectivamente.

25 *Reactivos de PROTAC*

[0080] Las quimeras dirigidas a proteólisis (también denominadas PROTAC o reactivos PROTAC) se pueden usar para inhibir la actividad de REV-ERB como se describe en esta invención. Los PROTAC son moléculas pequeñas heterobifuncionales que se unen simultáneamente a una proteína diana y a la ubiquitina ligasa, lo que permite la ubiquitinación y degradación de la diana. Con más detalle, un reactivo PROTAC típicamente comprende un ligando para la proteína diana (en el caso de la presente invención, REV-ERB) y un ligando para un dominio de reconocimiento de ligasa E3. Mediante el uso de dicho PROTAC, se recluta una ligasa E3 al REV-ERB unido a PROTAC, induciendo la transferencia de ubiquitina del complejo de ligasa E3 a la proteína diana (en el caso de la presente invención, REV-ERB). Una vez que PROTAC ha inducido un grado suficiente de ubiquitinación de la diana, éste es reconocido y degradado por el proteasoma.

[0081] Como ejemplo no limitativo, un reactivo PROTAC se puede producir mediante la conjugación de un ligando con una ligasa E3 a un inhibidor de molécula pequeña como se describe en esta solicitud (preferentemente SR8278) a través de un enlazador. En una realización preferida, un reactivo PROTAC comprende un ligando para la ligasa Cullin RING E3 de la proteína von-Hippel Lindau (VHL) o cereblon - una parte de un complejo ligasa CRL4 Cullin RING E3, conectado a un inhibidor de molécula pequeña de la invención mediante un enlazador. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el reactivo PROTAC comprende un ligando para la ligasa Cullin RING E3 de la proteína von-Hippel Lindau (VHL) conectada a SR8278, conectada a través de un enlazador. En otras realizaciones particularmente preferidas, el reactivo PROTAC comprende cereblon (una parte de un complejo ligasa CRL4 Cullin RING E3) y SR8278, conectado a través de un enlazador.

[0082] Debido a su mecanismo de acción, los reactivos PROTAC simplemente necesitan cualquier ligando para la proteína diana. La farmacología funcional del ligando, en ausencia del enlazador y el ligando ligasa E3, no es importante. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un reactivo PROTAC inhibidor de REV-ERB de la presente invención puede comprender un agonista de REV-ERB de molécula pequeña como el ligando, tal como GSK4112 (1,1-dimetiletil N-[(4-clorofenil)metil]-N-[(5-nitro-2-tienil)metil])glicinato, SR6452).

ARN bicatenario

[0083] Las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) pueden usarse para inhibir la actividad de REV-ERB como se describe en esta solicitud. Las moléculas de ARNbc pueden usarse en ARNi para inhibir la actividad de REV-ERB.

[0084] Usando técnicas conocidas y basándose en un conocimiento de la secuencia de REV-ERB, las moléculas de ARNbc se pueden diseñar para antagonizar REV-ERB mediante el direccionamiento de la secuencia de ARN correspondiente basándose en la homología de secuencia. Dichos ARNbc serán típicamente ARN de interferencia pequeña (ARNip), ARN de horquilla pequeña (ARNhp) o microARN (miARN). La secuencia de dichos ARNbc comprenderá una parte que corresponde a la de una parte de ARNm que codifica REV-ERB. Esta parte generalmente será 100 % complementaria a la parte diana dentro del ARNm transcrito del gen REV-ERB, pero también se pueden usar niveles más bajos de complementariedad (por ejemplo, 90 % o más o 95 % o más). Típicamente, el % de complementariedad se determina sobre una longitud de residuos de ácido nucleico contiguos. Una molécula de ARNbc de la invención puede, por ejemplo, tener al menos un 80 % de complementariedad con la parte diana dentro del ARNm transcrito del gen REV-ERB medido en al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o más residuos de ácido nucleico, hasta que la molécula de ARNbc tenga al menos el 80 % de complementariedad con el ARNm transcrito del gen REV-ERB de la invención en toda la longitud de la molécula de ARNbc.

[0085] En una realización preferida, el ARNbc es un ARNhp. El ARNhp se puede administrar a precursores de linfocitos NK por cualquier medio apropiado. En la técnica se conocen técnicas adecuadas e incluyen el uso de vectores plásmidos, virales y bacterianos para administrar el ARNhp. Típicamente, el ARNhp se administra usando un sistema de administración de vector viral. En una realización preferida, el vector viral es un vector lentiviral.

[0086] Generalmente, una vez que el ARNhp se ha administrado a una célula precursora de NK, a continuación se transcribe en el núcleo y se procesa. El pre-ARNhp resultante se exporta desde el núcleo y luego se procesa por dicer y se carga en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). La hebra codificante (pasajera) se degrada. La cadena no codificante (guía) dirige el RISC a ARNm que tiene una secuencia complementaria. En el caso de una complementariedad perfecta, RISC escinde el ARNm. En el caso de complementariedad imperfecta, RISC reprime la traducción del ARNm. En ambos casos, el ARNhp conduce al silenciamiento del gen diana.

[0087] Una secuencia variante puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de ARNhp de la invención, medida en cualquier longitud de secuencia adecuada. Típicamente, el % de identidad de secuencia se determina a lo largo de una longitud de residuos de aminoácidos o ácido nucleico contiguos. Una secuencia variante de la invención puede, por ejemplo, tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de la invención medida en al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o más residuos de aminoácidos o ácido nucleico.

[0088] Por ejemplo, una molécula de ARNhp variante de la invención puede tener al menos un 80 % de

identidad de secuencia con una molécula de ARNhp variante de la invención medida en al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60 o más residuos de ácido nucleico, hasta que la molécula de ARNhp variante tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con la molécula de ARNhp de la invención en toda la longitud de la molécula de ARNhp variante.

5

ARN antisentido

[0089] Las moléculas de ADN monocatenario (ADNmc), también conocidas como ARN antisentido, se pueden usar para inhibir la actividad de REV-ERB como se describe en esta solicitud.

10

[0090] Usando técnicas conocidas y basándose en un conocimiento de la secuencia del gen REV-ERB, las moléculas de ARN antisentido se pueden diseñar para antagonizar el gen REV-ERB mediante el direccionamiento del ARN correspondiente basándose en la homología de secuencia. La secuencia de dicho antisentido comprenderá una parte que corresponde a la de una parte del ARNm transcrito del gen REV-ERB. Esta parte generalmente será 100 % complementaria a la parte diana dentro del ARNm transcrito, pero también se pueden usar niveles más bajos de complementariedad (por ejemplo, 90 % o más o 95% o más).

15

Aptámeros

[0091] Los aptámeros son generalmente moléculas de ácido nucleico que se unen a una molécula diana específica. Los aptámeros se pueden modificar por ingeniería genética completamente *in vitro*, se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en las aplicaciones terapéuticas. Estas características los hacen particularmente útiles en utilidades farmacéuticas y terapéuticas.

20

[0092] Como se usa en esta solicitud, "aptámero" se refiere en general a un oligonucleótido monocatenario o bicatenario o una mezcla de dichos oligonucleótidos, donde el oligonucleótido o mezcla es capaz de unirse específicamente a una diana. Los aptámeros de oligonucleótidos se tratarán en este caso, pero el lector experto apreciará que también se pueden usar otros aptámeros que tienen características de unión equivalentes, tales como aptámeros peptídicos.

25

[0093] En general, los aptámeros pueden comprender oligonucleótidos que tienen al menos 5, al menos 10 o al menos 15 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden comprender secuencias que tienen hasta 40, hasta 60 o hasta 100 o más nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los aptámeros pueden tener de 5 a 100 nucleótidos, de 10 a 40 nucleótidos o de 15 a 40 nucleótidos de longitud. Siempre que sea posible, se prefieren aptámeros de menor longitud, ya que a menudo provocarán menos interferencia con otras moléculas o materiales.

30

[0094] Los aptámeros se pueden generar usando procedimientos rutinarios tales como el procedimiento de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). SELEX es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana. Se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.654.151, US 5.503.978, US 5.567.588 y WO 96/38579.

40

[0095] El procedimiento SELEX implica la selección de aptámeros de ácido nucleico y, en particular, ácidos nucleicos monocatenarios capaces de unirse a una diana deseada, a partir de una colección de oligonucleótidos. Una colección de ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ADN, ARN o variantes de estos) se pone en contacto con una diana, en condiciones favorables para la unión, los ácidos nucleicos que se unen a dianas en la mezcla se separan de los que no se unen, los complejos ácido nucleico-diana se disocian, los ácidos nucleicos que se habían unido a la diana se amplifican para proporcionar una colección o biblioteca que está enriquecida con ácidos nucleicos que tienen la actividad de unión deseada, y luego se repite esta serie de etapas según sea necesario para producir una biblioteca de ácidos nucleicos (aptámeros) que tienen afinidad de unión específica para la diana relevante.

50

Peptidomiméticos

[0096] Los peptidomiméticos son compuestos que imitan un péptido o proteína natural con la capacidad de interactuar con la diana biológica y producir el mismo efecto biológico. Los peptidomiméticos pueden tener ventajas sobre los péptidos en términos de estabilidad y biodisponibilidad asociada con un péptido natural. Los peptidomiméticos pueden tener modificaciones de cadena principal o lateral del péptido original diseñado para la función biológica. Los ejemplos de clases de peptidomiméticos incluyen, aunque sin limitación, péptidos y β -péptidos, así como péptidos que incorporan D-aminoácidos.

60

Anticuerpos

[0097] Los anticuerpos pueden usarse para inhibir la actividad de REV-ERB como se describe en esta solicitud.

65

[0098] Como se usa en esta solicitud, el término anticuerpo abarca el uso de un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal, así como los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un

péptido que se une a REV-ERB con especificidad. El anticuerpo puede ser un Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd o dAb.

Secuencias variantes

5 **[0099]** Una identidad de secuencia de al menos un 80 % incluye al menos un 82 %, al menos un 84 %, al menos un 86 %, al menos un 88 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % y un 100 % de identidad de secuencia (con todas y cada una de las secuencias presentadas en esta solicitud y/o con todas y cada una de las SEQ ID NO presentadas en esta invención).

10

[0100] Se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos de alineación de secuencia para determinar el porcentaje de identidad, que incluye, sin limitación, procedimientos generales, procedimientos locales y procedimientos híbridos, tales como, por ejemplo, procedimientos de estrategia de segmento. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos rutinarios dentro del alcance de un experto en la técnica. Los procedimientos generales alinean las secuencias desde el principio hasta el final de la molécula y determinan la mejor alineación sumando las puntuaciones de los pares de residuos individuales e imponiendo penalizaciones por hueco. Los procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, véase, por ejemplo, Julie D. Thompson y col., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22 (22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y refinamiento iterativo, véase, por ejemplo, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los procedimientos locales alinean las secuencias mediante la identificación de uno o más motivos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Los procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, Match-box, véase, por ejemplo, Eric Depiereux y Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); muestreo de Gibbs, véase, por ejemplo, C. E. Lawrence y col., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262 (5131) Science 208-214 (1993); Align-M, véase, por ejemplo, Ivo Van Walle y col., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20 (9) Bioinformatics:1428-1435 (2004). Por lo tanto, el porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992.

[0101] Las variantes de las secuencias específicas proporcionadas anteriormente pueden definirse alternativamente mediante la mención de la cantidad de nucleótidos o aminoácidos que difieren entre las secuencias variantes y las secuencias de referencia específicas proporcionadas anteriormente. Por lo tanto, en una realización, la secuencia puede comprender (o consistir en) una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias específicas proporcionadas anteriormente en no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 posiciones de nucleótidos, por ejemplo, en no más de 1 posición de nucleótidos. Se prefieren las sustituciones conservadoras.

40 **[0102]** Las moléculas y péptidos de ácido nucleico variantes de la invención típicamente aún conservan la actividad de las moléculas correspondientes de la invención. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas de ARNhp variantes de la invención conservan la capacidad de las moléculas de ARNhp correspondientes para inhibir la expresión de REV-ERB. Las moléculas de ARNhp variantes pueden conservar al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, hasta e incluyendo el 100 % de la actividad moduladora de las moléculas de ARNhp de la invención. Esto se aplica igualmente a cualquier otra variante de los inhibidores de la invención.

[0103] Los compuestos de la invención pueden estar etiquetados (o marcados). Se puede usar cualquier etiqueta apropiada. Dichas etiquetas son conocidas en la técnica.

50

Procedimientos de expansión de linfocitos NK

[0104] La presente invención se refiere a un procedimiento *ex vivo* o *in vitro* para expandir una población de linfocitos NK. También se describen procedimientos *in vivo*. Dicho procedimientos comprende contener HPCs con un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB (como se describe en esta solicitud) y expandir dichas células para producir una población de linfocitos NK. Los procedimientos de la invención permiten la rápida expansión de los linfocitos NK, reduciendo el tiempo necesario para su cultivo y, por ende, el riesgo de agotamiento, mejorando la citotoxicidad de los linfocitos NK cuando se transfunden a un paciente.

60 **[0105]** Cuando el procedimiento descrito se lleva a cabo *in vivo*, dicho procedimiento es un procedimiento terapéutico como se describe en esta solicitud. Toda la descripción de esta solicitud en relación con las indicaciones y aplicaciones terapéuticas de la invención es aplicable a dichos procedimientos.

[0106] Típicamente, el procedimiento de la invención es *ex vivo*. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para expandir una población de linfocitos NK que comprende las etapas de: (a) cultivar una muestra que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) obtenida de un paciente; (b) poner en contacto

dicha muestra con un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB; y (c) expandir dichas células *in vitro* para producir una población de linfocitos NK. El compuesto puede ser cualquier compuesto inhibidor de REV-ERB de la invención como se describe en esta solicitud. Típicamente, dicho compuesto aumenta la expresión de E4bp4 al disminuir la actividad de REV-ERB como se describe en esta invención.

5

[0107] La muestra que comprende HPC obtenidas de un paciente puede ser una muestra obtenida de médula ósea, sangre de cordón umbilical y/o sangre periférica. Por lo tanto, la muestra puede ser una muestra de sangre de cordón umbilical o periférica, o una muestra de médula ósea o biopsia.

10 **[0108]** Según la presente invención, una muestra que comprende HPCs es cualquier muestra de un paciente que comprende una cantidad suficiente de HPCs (como se describe en esta solicitud), de modo que se puede obtener una población de linfocitos NK expandida poniendo en contacto dicha muestra con un compuesto según la presente invención. Típicamente, la muestra comprende HSCs. Preferentemente, dicha muestra está enriquecida para HSCs, tal como una muestra de sangre periférica o de cordón umbilical o una muestra de médula ósea o biopsia como se describe en esta solicitud.

15 **[0109]** Las HPC se pueden cultivar en o con células de soporte/estromales o capa celular adecuadas. Se puede usar cualquier célula estromal apropiada, que incluye, aunque sin limitación, células estromales OP9 y/o células estromales EL08-1D2. De manera alternativa y/o adicional, las HPC pueden cultivarse en presencia de citocinas y factores de crecimiento asociados con el desarrollo de células en la ruta de diferenciación de linfocitos NK, incluyendo factores requeridos para el crecimiento de HPC y/o factores requeridos para el crecimiento y/o diferenciación de linfocitos NK. Los ejemplos no limitantes de dichos factores incluyen IL-3, IL-7, Flt3L, factor de células madre (SCF) y/o IL-15, o cualquier combinación de estos.

25 **[0110]** En algunas realizaciones, el procedimiento *ex vivo* comprende una única fase en la que las HPC en una muestra obtenida de un paciente se cultivan, se ponen en contacto con un compuesto de la invención y se expanden para formar una población de linfocitos NK, típicamente en condiciones de cultivo sustancialmente constantes. Típicamente, esto implica incubar las HPC con factores tales como IL-3, IL-7, SCF, Flt3L y/o IL-15, preferentemente todos estos factores. Las HPC también se cultivan preferentemente en o con células estromales/capa celular, tales como células estromales EL08-1D2.

[0111] En algunas realizaciones, el procedimiento *ex vivo* comprende dos fases. La primera es una fase de producción linfoide, en la que se cultivan las HPC en una muestra obtenida de un paciente. Típicamente esto implica incubar las HPC con citocinas y factores de crecimiento asociados con la producción linfoide, tales como Flt3L, IL-7 y/o SCF. Esta fase puede durar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más días. En algunas realizaciones preferidas, esta fase dura dos días.

[0112] La segunda fase del procedimiento *ex vivo* es una fase de expansión de linfocitos NK. Típicamente, esto implica la transferencia de las HSC cultivadas a una capa celular estromal (de soporte) adecuada, tal como células estromales OP9 y el cultivo en citocinas y factores de crecimiento asociados con el desarrollo de linfocitos NK, como IL-15. Un compuesto de la invención se añade típicamente durante esta segunda fase, y preferentemente al comienzo de esta segunda fase. La segunda fase dura el resto del período de cultivo *ex vivo* (como se definió anteriormente). El medio de cultivo se puede cambiar con la frecuencia que se requiera durante esta segunda fase con el fin de facilitar la expansión de linfocitos NK.

45

[0113] La muestra que comprende HPCs puede cultivarse *ex vivo* durante al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días o más. Típicamente, dicha muestra se cultiva durante al menos 9 días con el fin de producir una población de linfocitos NK expandida. Estos períodos de cultivo son para el período de cultivo total del procedimiento *ex vivo*, es decir, si hay dos fases, estos períodos son para el total (fase 1 más fase 2).

[0114] El compuesto de la invención se puede añadir a la muestra que comprende HPCs al cabo de una semana, al cabo de seis días, al cabo de cinco días, al cabo de cuatro días, al cabo de tres días, al cabo de dos días, al cabo de un día posteriores al aislamiento de las HPC en la muestra, o en el mismo día del aislamiento de los precursores de linfocitos NK. Típicamente, es el mismo día en que se obtiene la muestra del paciente. Preferentemente, el compuesto de la invención se añade a la muestra al cabo de los dos días posteriores al aislamiento de las HPC en la muestra, incluso más preferentemente el segundo día después del aislamiento de las HPC.

60 **[0115]** El procedimiento de la invención puede comprender además modular (aumentar o disminuir la expresión y/o actividad de uno o más genes y/o proteínas adicionales en las HPC con el fin de mejorar la expansión de linfocitos NK. Esta modulación puede ser provocada por un compuesto de la invención, que incluye el mismo compuesto de la invención que se usa para inhibir la actividad de REV-ERB. De manera alternativa, se pueden usar uno o más compuestos adicionales para modular la expresión y/o actividad del uno o más genes y/o proteínas adicionales. Dicha modulación puede ocurrir directa o indirectamente. La modulación indirecta abarca los efectos corriente abajo causados por un compuesto de la invención que inhibe la actividad de REV-ERB.

65

[0116] Un procedimiento de la invención puede dar como resultado un aumento de la cantidad de linfocitos NK de al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,6 veces, al menos 2,7 veces, al menos 2,8 veces, al menos 2,9 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces o más con respecto a un control. Típicamente, la cantidad de linfocitos NK aumenta al menos 2 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,5 veces, al menos 2,6 veces, al menos 2,7 veces, al menos 2,8 veces, al menos 2,9 veces, al menos 3 veces o más en comparación con el control.

[0117] Típicamente, un procedimiento *ex vivo* de la presente invención implica una etapa final para purificar la población de linfocitos NK expandida. Esto asegura una población pura para administración terapéutica como se describe en esta invención. La purificación de la población de linfocitos NK expandida puede realizarse por cualquier medio adecuado. En la técnica se conocen procedimientos de purificación celular convencionales, tales como clasificación celular, incluyendo clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y clasificación celular activada magnéticamente (MACS).

Indicaciones terapéuticas

[0118] También se describe un antagonista de REV-ERB para su uso en un procedimiento de terapia al aumentar la producción de linfocitos NK en un paciente.

[0119] El antagonista de REV-ERB para su uso en dicho procedimiento de terapia puede ser cualquier antagonista de REV-ERB como se describe en esta solicitud. Típicamente, el antagonista de REV-ERB para su uso en dicho procedimiento aumenta la expresión de E4bp4 al disminuir la actividad de REV-ERB.

[0120] Típicamente, el procedimiento de terapia comprende administrar un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB (como se describe en esta solicitud) a un paciente o sujeto.

[0121] Como se usa en esta solicitud, se puede entender que la expresión "aumentar la cantidad de linfocitos NK" y "aumentar la producción de linfocitos NK" significa que el compuesto descrito provoca un aumento significativo en la cantidad de linfocitos NK en un paciente. Este aumento en el número de linfocitos NK se puede medir con respecto a un control (como se describe en esta solicitud en el contexto de aumentar la expresión de E4bp4 e inhibir la actividad de REV-ERB).

[0122] Una referencia a un aumento en la cantidad de linfocitos NK y/o aumento de la producción de linfocitos NK se puede cuantificar en términos de un aumento de x veces con respecto a un control. Típicamente, un compuesto descrito puede aumentar la cantidad de linfocitos NK, o dar lugar a un aumento en la producción de linfocitos NK de al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, al menos 2 veces, al menos 2,1 veces, al menos 2,2 veces, al menos 2,3 veces, al menos 2,4 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces o más con respecto a un control.

[0123] De manera alternativa, se puede entender que una referencia al aumento de la cantidad de linfocitos NK y/o al aumento de la producción de linfocitos NK significa que la cantidad de linfocitos NK aumenta en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 150 %, al menos el 200 %, al menos el 300 % o más en comparación con el control. Típicamente, la cantidad de linfocitos NK aumenta en al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 % o más en comparación con un control.

[0124] Se puede definir un aumento en la cantidad de linfocitos NK y/o un aumento en la producción de linfocitos NK en términos de la cantidad absoluta de linfocitos NK en una muestra o paciente, tal como el porcentaje de linfocitos NK, por ejemplo, el porcentaje de linfocitos NK en la población de linfocitos circulantes. Por ejemplo, un compuesto tal como se describe puede provocar un aumento en el número de NK, lo que resulta en un porcentaje de linfocitos NK de al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 % o más.

[0125] La cantidad de linfocitos NK puede determinarse mediante análisis cuantitativo y/o cualitativo, y puede medirse directa o indirectamente. La cantidad de linfocitos NK con respecto a un control se puede determinar mediante el uso de cualquier técnica adecuada. En la técnica se conocen técnicas convencionales adecuadas, tales como citometría de flujo, FACS y MACS.

[0126] La cantidad de linfocitos NK puede aumentarse en comparación con un control durante al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días,

al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes o más. Típicamente, esto se evalúa con respecto a la última administración del compuesto que inhibe la actividad de REV-ERB.

[0127] La cantidad de linfocitos NK se puede cuantificar en términos de la cantidad total de linfocitos NK en una muestra de un paciente o muestra de cultivo (de un procedimiento *ex vivo* de la invención).

[0128] En el contexto de los usos y procedimientos terapéuticos tal como se describe, un "sujeto" o "paciente" (estos términos se usan indistintamente en esta invención) es cualquier paciente animal que se beneficiaría de un aumento en la cantidad de linfocitos NK. Los pacientes animales típicos son mamíferos, tales como primates. Preferentemente, el paciente es un ser humano.

[0129] Por lo tanto, se describe en esta solicitud un procedimiento de tratamiento mediante el aumento de la cantidad de linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB (como se describe en esta solicitud).

[0130] De manera adicional, en esta solicitud se describe el uso de un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB en la fabricación de un medicamento. Dicho medicamento aumenta la cantidad de linfocitos NK en un paciente.

[0131] Dicho uso o procedimiento terapéutico puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se describe, ya sea solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, a un sujeto.

[0132] Como se usa en esta solicitud, el término "tratamiento" o "tratar" abarca medidas terapéuticas o preventivas/profilácticas.

[0133] Los compuestos tal como se describen también se pueden usar como una terapia preventiva. Como se usa en esta solicitud, el término "prevenir" incluye prevenir la aparición de síntomas asociados con una enfermedad o trastorno que se puede tratar mediante el aumento de la cantidad de linfocitos NK y/o la reducción de la gravedad o intensidad de dichos síntomas. El término "prevenir" incluye inducir o proporcionar inmunidad protectora frente a dichas enfermedades o trastornos, particularmente enfermedades infecciosas como se describe en esta solicitud. La inmunidad se puede cuantificar usando cualquier técnica apropiada, cuyos ejemplos se conocen en la técnica.

[0134] Un compuesto como se describe puede administrarse a un paciente que ya tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse mediante el aumento del número de linfocitos NK. Por ejemplo, se puede sospechar que el paciente tiene una enfermedad infecciosa o cáncer como se describe en esta solicitud, y puede o no mostrar síntomas de dicha enfermedad o trastorno. Cuando se administra a tal paciente, un compuesto de la invención puede curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas, y/o prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

[0135] De manera alternativa, un compuesto como se describe se puede administrar a un paciente que en última instancia puede estar infectado por una enfermedad infecciosa particular, o desarrollar una enfermedad o trastorno como se describe en esta solicitud, con el fin de curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas, y/o prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento, o, en el caso de enfermedades infecciosas, ayudar a evitar que ese paciente transmita dicha enfermedad.

[0136] Los tratamientos y terapias preventivas como se describen son aplicables a una variedad de sujetos diferentes de diferentes edades. En el contexto de los seres humanos, las terapias son aplicables a niños (por ejemplo, bebés, niños menores de 5 años, niños de mayor edad o adolescentes) y adultos. En el contexto de otros sujetos animales (por ejemplo, mamíferos como primates), las terapias son aplicables a sujetos inmaduros y sujetos maduros/adultos.

[0137] La presente descripción se refiere al tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que se puede tratar de forma beneficiosa mediante el aumento de la cantidad de linfocitos NK en un paciente. Dichas enfermedades y trastornos incluyen cáncer, enfermedades infecciosas (agudas y crónicas), enfermedades autoinmunitarias y enfermedades o trastornos relacionados con la infertilidad femenina o el embarazo. Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar según la presente invención incluyen infección viral e infección por otros patógenos, que incluyen bacterias, protistas, patógenos fúngicos o helmintos. Típicamente dichos patógenos son patógenos intracelulares que tienen al menos una fase intracelular en su ciclo de vida. Las infecciones de particular interés incluyen infecciones virales e infecciones zoonóticas que son de particular importancia desde una perspectiva de salud pública. Los cánceres que se pueden tratar según la presente descripción incluyen cáncer de vejiga, cáncer de sangre, leucemia, cáncer de huesos, cáncer de intestino, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular y cáncer uterino. Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar según la presente invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y resistencia a la insulina inducida por obesidad. Como se usa en esta solicitud, el término enfermedades o trastornos relacionados con la infertilidad femenina o embarazo incluye, aunque sin limitación, restricción del crecimiento fetal, parto prematuro, defectos en el remodelado vascular uterino y preeclampsia.

[0138] Los compuestos tal como se describen pueden usarse en combinación con uno o más agentes o tratamientos terapéuticos adicionales, que típicamente pueden seleccionarse de un tratamiento convencional para la enfermedad o trastorno a tratar. A modo de ejemplo no limitativo, si un compuesto de la invención está destinado para su uso en el tratamiento de un cáncer, tal como cáncer de pulmón, dicho compuesto puede usarse en combinación con tratamientos convencionales para el cáncer de pulmón, tal como radioterapia, quimioterapia o cirugía. Cuando se usa en combinación con uno o más agentes o tratamientos terapéuticos adicionales, un compuesto como se describe se puede administrar antes, simultáneamente o después de la administración del uno o más agentes o tratamientos terapéuticos adicionales.

[0139] Un compuesto como se describe puede estar preferentemente destinado para su uso en combinación con inmunoterapia mediada por anticuerpos. La inmunoterapia mediada por anticuerpos implica la administración de anticuerpos a un paciente para dirigirse a antígenos específicos de la enfermedad. Dichos anticuerpos podrían usarse para aumentar la especificidad y la actividad de destrucción de los linfocitos NK, que expresan receptores para las regiones F_C de los anticuerpos IgG. La activación de estos receptores F_C conduce a la activación de linfocitos NK, lo que resulta en la secreción de citocinas y la liberación de gránulos citotóxicos por parte de los linfocitos NK activados, lo cual provoca la lisis de la célula que expresa el antígeno de la enfermedad. Dicha terapia de combinación es particularmente preferida para el tratamiento del cáncer (usando anticuerpos para antígenos específicos del tumor). Cualquier anticuerpo usado en inmunoterapia puede usarse en combinación con un compuesto de la invención. Los ejemplos no limitantes de dichos anticuerpos incluyen mAbs anti-CD20 (linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico crónico), mAbs antigangliósido D2 (anti-GD2) (neuroblastoma, melanoma), mAbs antifactor de crecimiento epidérmico humano (anti-HER2) (cánceres de mama y gástrico), mAbs del receptor del factor de crecimiento antiepidérmico (anti-EGFR) (cáncer colorrectal y de cabeza y cuello).

[0140] También se describe el uso de una población de linfocitos NK expandida (como se describe en esta solicitud) en un uso o procedimiento terapéutico como se describe en esta solicitud. Cualquiera y todas las descripciones de esta solicitud en relación con las indicaciones terapéuticas de un compuesto de la invención pueden aplicarse de manera igual e independiente a las aplicaciones terapéuticas de las poblaciones de linfocitos NK expandidas de la invención. A modo de ejemplo no limitativo, la descripción incluye una población de linfocitos NK expandida (como se describe en esta solicitud) para su uso en un procedimiento de terapia, por ejemplo, en el tratamiento contra el cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad o trastorno relacionado con la infertilidad femenino o el embarazo. Como otro ejemplo no limitativo, la descripción incluye un procedimiento de tratamiento mediante el aumento de la cantidad de linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de linfocitos NK expandida.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

[0141] El término "compuesto" se usa en esta solicitud indistintamente con los términos "composición terapéutica/profiláctica", "formulación" o "medicamento".

[0142] El compuesto o la población de linfocitos NK expandida como se definió anteriormente puede combinarse o administrarse además de un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera alternativa o adicional, el compuesto o la población de linfocitos NK expandida se puede combinar además con uno o más de una sal, excipiente, diluyente, adyuvante, agente inmunorregulador y/o compuesto antimicrobiano.

[0143] Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o con ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, maleico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

[0144] La administración de composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos y formulaciones profilácticas se realiza generalmente por vías convencionales, por ejemplo, vías intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o mucosa. La administración puede realizarse mediante inyección parenteral, por ejemplo, una inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Por ejemplo, las formulaciones que comprenden anticuerpos o poblaciones de linfocitos NK expandidas como se describe pueden ser particularmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. La administración de inhibidores de REV-ERB de moléculas pequeñas puede realizarse por inyección, como por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea, o por administración oral (moléculas pequeñas con un peso molecular de menos de 500 Da que presentan típicamente biodisponibilidad oral).

[0145] Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos y formulaciones profilácticas tal como se describen se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. Pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar, o el péptido encapsular en liposomas o microcápsulas.

[0146] Los ingredientes inmunogénicos activos (tal como los compuestos o poblaciones de linfocitos NK expandidas como se describe) a menudo se mezclan con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de estos. Adicionalmente, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH y/o adyuvantes que mejoran la eficacia de la vacuna.

[0147] Generalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, una solución salina y una solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, sin embargo, cuando la composición comprende un compuesto como se describe, este puede estar en forma liofilizada, en cuyo caso puede incluir un estabilizador, tal como BSA. En algunas realizaciones, puede ser deseable formular la composición con un conservante, tal como tiomersal o azida de sodio, para facilitar el almacenamiento a largo plazo.

[0148] Los ejemplos de adyuvantes adicionales que pueden ser eficaces incluyen, aunque sin limitación: adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés), adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés), saponina, una fracción de extracto purificado de saponina tal como Quil A, un derivado de saponina tal como QS-21, partículas lipídicas a base de saponina tales como ISCOM/ISCOMATRIX, mutantes de toxina lábil (LT, por sus siglas en inglés) al calor de *E. coli* tales como LTK63 y/ o LTK72, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramilo-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, el lípido monofosforilico A, el dimicolato de trehalosa y el esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80, la formulación MF59 desarrollada por Novartis, y las formulaciones adyuvantes AS02, AS01, AS03 y AS04 desarrolladas por GSK Bio-logicals (Rixensart, Bélgica).

[0149] Los ejemplos de agentes amortiguadores incluyen, aunque sin limitación, succinato de sodio (pH 6,5) y solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 6,5 y 7,5).

[0150] Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales o formulaciones adecuadas para su distribución como aerosoles. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente 1 %-2 %.

[0151] Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

[0152] Los intervalos de dosificación para la administración de los compuestos descritos son aquellos que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que el intervalo de dosificación requerido depende de la naturaleza precisa del compuesto, de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la edad del paciente, de la naturaleza, extensión o gravedad de la afección del paciente, de las contraindicaciones, si las hubiera, y del juicio del médico tratante. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas convencionales para la optimización. De manera similar, la dosis de un compuesto como se describe para su uso en un procedimiento descrito, particularmente un procedimiento *ex vivo* de la invención reivindicada, puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia, y es cualquier dosis que produce el aumento deseado en el número de linfocitos NK y/o provoca la expansión deseada en linfocitos NK, para producir una población de linfocitos NK expandida. Como ejemplo no limitativo, las dosis de SR8278 según la presente invención pueden dar lugar a una concentración final de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 μM , de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 μM , de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 μM , de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 μM , de aproximadamente 4 a aproximadamente 13 μM , de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 μM , de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 μM , o preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 μM .

[0153] También se describe el uso de una población de linfocitos NK expandida (como se describe en esta solicitud) en una formulación farmacéutica. Cualquiera y todas las descripciones de esta solicitud en relación con las formulaciones de un compuesto como se describe pueden aplicarse de manera igual e independiente a las aplicaciones terapéuticas de las poblaciones de linfocitos NK expandidas.

Clave para las SEQ ID NOs

[0154]

ES 2 928 879 T3

SEQ ID NO: 1 - secuencia del gen E4bp4 (X64318.1)

```

1  gccccctttct ttctcctcgt cggcccgcaga gcaggaacac gataacgaag gagggcccaac
61  ttcatattcaat aaggagcctg acggatttat cccagacggg agaacaaaag gaagaatatt
121 gatggattttt aaaccagagt ttttaaagag cttgagaata cggggaaaatt aatttgttct
181 cctacacaca tagatagggg aaggttggtt ctgatgcagc tgagaaaaat gcagaccgtc
241 aaaaaggagc aggcgtctct tgatgccagt agcaatgtgg acaagatgat ggtccttaat
301 tctgcttttaa cggaagtgtc agaagactcc acaacagggt aggacgtgct tctcagtga
361 ggaagtgtgg ggaagaacaa atcttctgca tgtcggagga aacgggaatt cattcctgat
421 gaaaagaaaag atgctatgta ttgggaaaaa aggcggaaaa ataatgaagc tgccaaaaga
481 tctcgtgaga agcgtcgact gaatgacctg gttttagaga acaaaactaat tgcaactggga
541 gaagaaaacg ccacttttaa agctgagctg ctttactaa aattaaagtt tggtttaatt
601 agctccacag catatgctca agagattcag aaactcagta attctacagc tgtgtacttt

661 caagattacc agacttccaa atccaatgtg agttcatttg tggacgagca cgaaccctcg
721 atggtgtcaa gtagttgtat ttctgtcatt aaacactctc caciaaagctc gctgtccgat
781 gtttcagaag tgcctcagat agaacacacg caggagagct ctgtgcaggg aagctgcaga
841 agtccctgaaa acaagttcca gattatcaag caagagccga tggaaattaga gagctacaca
901 agggagccaa gagatgaccg aggcctttac acagcgtcca tctatcaaaa ctatatgggg
961 aattctttct ctgggtactc aactctccc cactactgc aagtcaaccg atcctccagc
1021 aactccccga gaacgtcgga aactgatgat ggtgtggtag gaaagtcata tgatggagaa
1081 gacgagcaac aggtcccca gggccccatc cattctccag ttgaactcaa gcatgtgcat
1141 gcaactgtgg ttaaagttcc agaagtgaat tcctctgcct tgccacacaa gctccggatc
1201 aaagccaaag ccatgcagat caaagtagaa gcctttgata atgaatttga ggccacgcaa
1261 aaactttcct cactattga catgacatct aaaagacatt tcgaactcga aaagcatagt
1321 gccccaaagta tggtagattc ttctcttact cttttctcag tgcaagtga taacattcaa
1381 gattggtctc tcaaatcgga gcaactggat caaaaagaac tgagtggcaa aactcagaat
1441 agtttcaaaa ctggagttgt tgaaatgaaa gacagtggct acaaagtttc tgaccagag
1501 aacttgattt tgaagcaggg gatagcaaac ttatctgcag aggttgctct actcaagaga
1561 cttatagcca cacaaccaat ctctgcttca gactctgggt aaattactac tgagtaagag
1621 ctgggcattt agaaagatgt catttgcaat agagcagtc attttgatt atgctgaatt
1681 ttcactggac ctgtgatgtc atttcaactgt gatgtgcaca tgttgctgt ttggtgtctt
1741 tttgtgcaca gattatgatg aagattagat tgtgttatca ctctgcctgt gtatagtcag
1801 atagtcatat gcgtaaggct gtatatatta agnttttatt tttgtgttcc tattataaag
1861 tgtgtaagtt accagtttca ataaaggatt ggtgacaaac acagaaaaaa aaaaaaaaaa
1921 aaa

```

SEQ ID NO: 2 - secuencia de aminoácidos de E4bp4 (X64318.1)

MQLRKMQTVKKEQASLDASSNVDKMMVLNSALTEVSEDSTTGEDVLLSEGSVGKNKSSACRRKREFIPDEKKDAM
 YWEKRRKNNEAAKRSREKRRRLNDLVLENKLIALGEENATLKAELLSLKLKFLGLISSYAYAEIQKLSNSTAVYFQ
 DYQTSKSNVSSFVDEHEPSMVSSSCISVIKHSPQSSSLDVSEVSSVEHTQESSVQGSCRSPENKFQIIKQEPMEL
 ESYTREPRDDRGSYTASIYQNYMGNSFSGYSHSPPLLQVNRSSNSPRTSETDDGVVGKSSDGEDEQQVPGPIH
 SPVELKHVHATVVKVPEVNSSALPHKLRIKAKAMQIKVEAFDNEFEATQKLSSPIDMTSKRHFELKHSAPSMVH
 SSLTPFSVQVTNIQDWSLKSEHWHQKELSGKTQNSFKTGVMKDSGYKVSDPENLYLKQGIANLSAEVVSLKRL
 IATQPISASDSG

SEQ ID NO: 3 - secuencia del gen REV-ERB-α (NM_021724.4)

ES 2 928 879 T3

```

1  gggcacgagg  cgctccctgg  gatcacatgg  tacctgctcc  agtgccgcgt  gcgggccggg
61  aaccctgggc  tgctggcgcc  tgcgcagagc  cctctgtccc  agggaaaggc  tcgggcaaaa
121  ggcggtgag  attggcagag  tgaaatatta  ctgccgaggg  aacgtagcag  ggcacacgtc
181  tcgcctcttt  gcgactcggg  gccccgtttc  tccccatcac  ctacttactt  cctgggttgc
241  acctctcttc  ctctgggact  tttgcaccgg  gagctccaga  ttcgccaccc  cgcagcgtg
301  cggagccggc  aggagagggc  acccgtaca  ctgcagagac  ccgaccctcc  ttgctacctt
361  ctagccagaa  ctactgcagg  ctgattcccc  ctacacactc  tctctgctct  tcccatgcaa
421  agcagaactc  cggtgcctca  acgtccaacc  cttctgcagg  gctgcagtcc  ggccacccca
481  agaccttgct  gcaggggtgct  tcggatcctg  atcgtgagtc  gcgggggtcca  ctccccggcc
541  ttagccagtg  cccagggggc  aacagcggcg  atcgcaacct  ctagtgttag  tcaaggtcca
601  gtttgaatga  ccgctctcag  ctggtgaaga  catgacgacc  ctggactcca  acaacaacac
661  aggtggcgtc  atcacctaca  ttggctccag  tggctcctcc  ccaagccgca  ccagccctga
721  atccctctat  agtgacaact  ccaatggcag  cttccagtcc  ctgaccacaag  gctgtcccac
781  ctacttccca  ccatccccc  ctggctccct  caccacaagc  ccggtctcgt  cttttgggag
841  cattccaccc  agcctgagtg  atgacggctc  cccttcttcc  tcatcttctc  cgtcgtcatc
901  ctctcctcc  ttctataatg  ggagccccc  tgggagtcta  caagtggcca  tggaggacag
961  cagccgagtg  tccccagca  agagcaccag  caacatcacc  aagctgaatg  gcatgggtgt
1021  actgtgtaaa  gtgtgtgggg  acgttgcttc  gggcttccac  tacggtgtgc  acgctgcga
1081  gggctgcaag  ggctttttcc  gtcggagcat  ccagcagaac  atccagtaca  aaaggtgtct
1141  gaagaatgag  aattgctcca  tcgtccgcat  caatcgcaac  cgctgccagc  aatgtcgtct
1201  caagaagtgt  ctctctgtgg  gcatgtctcg  agacgctgtg  cgttttgggc  gcatcccca
1261  acgagagaag  cagcggatgc  ttgctgagat  gcagagtgcc  atgaacctgg  ccaacaacca

1321  gttgagcagc  cagtgcccg  tggagacttc  acccaccag  caccacccc  caggccccat
1381  gggcccctcg  ccaccccctg  ctccggctcc  ctaccccctg  gtgggcttct  cccagtttcc
1441  acaacagctg  acgcctccca  gatccccaag  ccctgagccc  acagtggagg  atgtgatata
1501  ccaggtggcc  cgggcccac  gagagatctt  cacctacgcc  catgacaagc  tgggcagctc
1561  acctggcaac  ttcaatgcca  accatgcata  aggtagccct  ccagccacca  cccacatcgt
1621  ctgggaaaat  cagggctgcc  cacctgcccc  caatgacaac  aacaccttgg  ctgcccagcg
1681  tcataacgag  gccctaaatg  gtctgcgcca  ggctccctcc  tctaccctc  ccacctggcc
1741  tcctggccct  gcacaccaca  gctgccacca  gtccaacagc  aacgggcacc  gtctatgccc
1801  caccacgtg  tatgcagccc  cagaaggcaa  ggcacctgcc  aacagtcccc  ggcagggcaa
1861  ctcaaagaat  gttctgctgg  catgtcctat  gaacatgtac  ccgcatggac  gcagtgggag
1921  aacggtgcag  gagatctggg  aggatttctc  catgagcttc  acgcccgtg  tgcgggaggt
1981  ggtagagttt  gccaaacaca  tcccgggctt  ccgtgacctt  tctcagcatg  accaagtcac
2041  cctgcttaag  gctggcacct  ttgaggtgct  gatggtgctg  tttgcttcgt  tgttcaacgt
2101  gaaggaccag  acagtgatgt  tcctaagccg  caccacctac  agcctgcagg  agcttgggtg
2161  catgggcatg  ggagacctgc  tcagtgccat  gttcgacttc  agcgagaagc  tcaactccct
2221  ggcgcttacc  gaggaggagc  tgggcctctt  caccgcggtg  gtgcttgtct  ctgcagaccg
2281  ctcgggcatg  gagaattccg  cttcggtgga  gcagctccag  gagacgctgc  tgcgggctct
2341  tcgggctctg  gtgctgaaga  accggccctt  ggagacttcc  cgcttcacca  agctgctgct
2401  caagctgccg  gacctgcgga  ccctgaacaa  catgcattcc  gagaagctgc  tgtccttccg
2461  ggtggacgcc  cagtgacctg  cccggccggc  cttctgccgc  tgcccccttg  tacagaatcg
2521  aactctgcac  ttctctctcc  ttacgagac  gaaaaggaaa  agcaaaccag  aatcttattt
2581  atattgttat  aaaatattcc  aagatgagcc  tctggccccc  tgagccttct  tgtaaatacc
2641  tgcctccctc  ccccatcac  gaacttcccc  tcctccccta  tttaaaccac  tctgtctccc
2701  ccacaaccct  cccctggccc  tctgatttgt  tctgttctct  tctcaaatac  aatagttcac
2761  agctgagctg  gcttcaaaaa  aaaaaaaaaa  aaa

```

MTTLDSSNNNTGGVITYIIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPPTGSLTQDPARSFGSIPPSL
SDDGSPSSSSSSSSSSSSSYFNGSPPGSLQVAMEDSSRVSPSKSTSNITKLNGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACE
GCKGFFRRSIQQNIQYKRCLKNENCIVRINRNRQCRCRKKCLSVGMSRDAVRFGRI PKREKQRMILAEMQSAMN
LANNQLSSQCPLETSPTQHPTPGPMGSPPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPPRSPPSPEPTVEDVISQVARAHREIF
TYAHDKLGSSPGNFNANHASGSPATTPHRWENQGCPPAPNDNNTLAAQRHNEALNGLRQAPSSYPPTWPPGPAH
HSCHQSNNGHRLCPTHVYAAPEGKAPANSRQGN SKNVLLACPMNMYPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVREV
VEFAKHIPGFRDLSQHDQVTLKAGTFEVLMVRFASLFNVKDQTMFLSRTTYSLQELGAMGMDLLSAMFDFSE
KLNSLALTEELGLFTAVVLVSADRS GMENSASVEQLQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLLLKLPDLRLTNN
MHSEKLLSFRVDAQ

SEQ ID NO: 5 - secuencia del gen REV-ERB-β (AB307693.1)

1 atggaggtga atgcaggagg tgtgattgcc tatatcagtt cttccagctc agcctcaagc
61 cctgcctctt gtcacagtga gggttctgag aatagtttcc agtcctcctc ctcttctgtt
121 ccatcttctc caaatagctc taattctgat accaatggta atcccaagaa tggatgatctc
181 gccaatattg aaggcatctt gaagaatgat cgaatagatt gttctatgaa aacaagcaaa
241 tcgagtgcac ctgggatgac aaaaaatcat agtgggtgtga caaaatttag tggcatgggt
301 ctactgtgta aagtctgtgg ggatgtggcg tcaggattcc actatggagt tcatgcttgc
361 gaaggctgta agggtttctt tcggagaagt attcaacaaa acatccagta caagaagtgc
421 ctgaagaatg aaaactgttc tataatgaga atgaatagga acagatgtca gcaatgtcgc
481 ttcaaaaagt gtctgtctgt tggaatgtca agagatgctg ttcgggtttgg tcgtattcct
541 aagcgtgaaa aacagaggat gctaattgaa atgcaaagtg caatgaagac catgatgaac
601 agccagttca gtggtcactt gcaaaatgac acattagtag aacatcatga acagacagcc
661 ttgccagccc aggaacagct gcgacccaag ccccaactgg agcaagaaaa catcaaaaagc
721 tcttctcctc catcttctga ttttgcaaag gaagaagtga ttggcatggg gaccagagct
781 cacaaggata cctttatgta taatcaagag cagcaagaaa actcagctga gagcatgcag

841 cccagagag gagaacggat tccaagaac atggagcaat ataatttaaa tcatgatcat
901 tgcggcaatg ggcttagcag ccatttttccc tgtagtgaga gccagcagca tctcaatgga
961 cagttcaaa gagggaatat aatgcattac ccanatggcc atgccatttg tattgcaaat
1021 ggacattgta tgaacttctc caatgcttat actcaaagag tatgtgatag agttccgata
1081 gatggatttt ctcagaatga gaacaagaat agttacctgt gcaacactgg aggaagaatg
1141 catctgggtt gtccaatgag taagtctcca tatgtggatc ctcataaatc aggacatgaa
1201 atctgggaag aattttcgat gagcttcact ccagcagtga aagaagtggg ggaatttgca
1261 aagcgtattc ctgggttcag agatctctct cagcatgacc aggtcaacct tttaaaggct
1321 gggacttttg aggttttaat ggtacggttc gcatcattat ttgatgcaaa ggaacgtact
1381 gtcacctttt taagtggaaa gaaatatagt gtggatgatt tacactcaat gggagcaggg
1441 gatctgctaa actctatgtt tgaatttagt gagaagctaa atgccctcca acttagtgat
1501 gaagagatga gtttgtttac agctgttgct ctggtatctg cagatcgatc tggaatagaa
1561 aacgtcaact ctgtggaggc tttgcaggaa actctcattc gtgcactaag gaccttaata
1621 atgaaaaacc atccaaatga ggctctatt tttacaaaac tgcttctaaa gttgccagat
1681 cttcgatctt taaacaacat gactctgag gagctcttgg cttttaagt tcacccttaa

SEQ ID NO: 6 - secuencia de aminoácidos de REV-ERB-β (AB307693.1)

MEVNAGGVIAIYISSSSASPASCHSEGSSENSFQSSSSSVSPSPNSSNSDTNGNPKNGDLANIEGILKNDRIDCS
MKTSSKSSAPGMTKNHSGVTKFSGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKKCLKNENCIMR
MNRNRQCRCRKKCLSVGMSRDAVRFGRI PKREKQRM LIEMQSAMKTMNSQFSGHLQNDTLVEHHEQTALPAQE
QLRPKPQLEQENIKSSSPSSDFAKEEVI GMVTRAHKDTFMYNQEQQENSAESMQPQRGERI PKNMEQYNLNHDH
CGNGLSSHFPSCSESQQHLNGQFKGRNIMHYPXGHAICIANGHCMNFSNAYTQRVCDRVPIDGFSQENENKNSYLCN
TGGRMHLCVPMSPKSPYVDPHKS GHEIWEFEFSMSFTPAVKEVVEFAKRI PGFRDLSQHDQVNLKAGTFEVLMVRF
ASLFDKERTVTFLSGKKYSVDDLHSMGAGDLLNSMFEFSEKLNALQLSDEEMSLFTAVVLVSADRS GIENVNSV
EALQETLIRALRTLIMKNHPNEASIFTKLLLLKLPDLRLSLNNMHSEELLAFAKVH

SEQ ID NO: 7 - cebador directo A para la detección del alelo de tipo salvaje E4bp4

CTCTGAGCTTGGCTGATGTG

SEQ ID NO: 8 - cebador inverso para la detección de E4bp4

GCTTCAAGTCTCCACCAAGC

5 SEQ ID NO: 9 - cebador para la detección del alelo nulo E4bp4

CCATGCTCCTGTCTTGATGA

EJEMPLOS

- 10 **[0155]** La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención y de ningún modo limitantes.

Ejemplo 1 - La adición de antagonista de REV-ERB- α SR8278 aumenta el porcentaje de producción de linfocitos NK

- 15 **[0156]** Inicialmente, se identificaron sistemáticamente un total de siete compuestos (SR8278, Remodelina, GSK343, UNC0638, HKMT-1-005, SGC0946 y (R)-PFI-2) a 5, 10 y 20 μM junto con D4476 como control positivo. GSK343, UNC0638, HKMT-1-005, SGC0946 y (R)-PFI-2 son inhibidores de metiltransferasa. Los inhibidores de metiltransferasa se analizaron basándose en el efecto del inhibidor de EZH2.

- 20 **[0157]** Las células negativas de linaje se enriquecen para las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs). Las HPC se aislaron y cultivaron durante un total de 9 días y los fármacos se añadieron el Día 2 (Figura 2). Las células se recolectaron el día 9 y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la cantidad de células NK1.1⁺ CD3⁻ (Figura 2). NK1.1⁺ y CD3⁻ son dos marcadores de superficie celular que pueden definir linfocitos NK de ratón.
- 25 Las células estromales OP9 se excluyeron con facilidad del análisis, ya que las células estromales OP9 usadas fueron GFP positivas (Figura 3B). Los datos de citometría de flujo se analizaron a medida que aumentaba el número de veces, en relación con el control "Sin fármaco" o sin tratamiento en cada experimento. Esto se debe a que el porcentaje absoluto de producción de linfocitos NK varía entre experimentos.

- 30 **[0158]** De los siete nuevos compuestos analizados, solo 2 compuestos mostraron un aumento significativo en la producción de linfocitos NK (Figura 3A), donde otros no lo hicieron (datos no mostrados). La adición de D4476 20 μM , así como de Remodelina 5 μM , mostró un aumento significativo, pero no tan llamativo como SR8278 10 μM (Figura 3A y 3C). Cuando se añadió SR8278 10 μM , la producción de linfocitos NK aumentó más de 2,4 veces en comparación con el control "sin fármaco" (Figura 3A y 3C). Sin embargo, con SR8278 20 μM , el compuesto fue tóxico
- 35 y destruyó la mayoría de las células, por lo tanto, hubo una reducción en la cantidad de linfocitos NK detectados (Figura 4). Se realizaron experimentos adicionales usando SR8278 a 2, 5, 10 y 20 μM para confirmar su actividad. Los resultados fueron consistentes con la identificación sistemática anterior. SR8278 10 μM mostró el mayor aumento en la producción de linfocitos NK, seguido de 5 μM (Figura 4). [

Ejemplo 2 - Optimización del tiempo de adición de SR8278

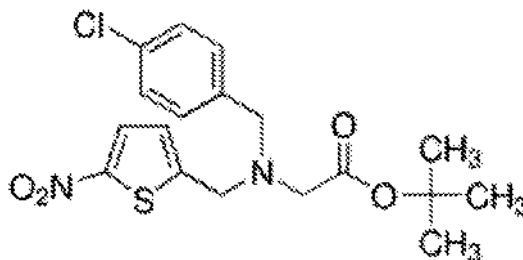
- [0159]** Los efectos de SR8278 se examinaron adicionalmente. En particular, se investigó el mejor momento para añadir SR8278 al cultivo celular. SR8278 se añadió el Día 0, 1, 2, 3 y 4 de cultivo de HPC en condiciones de producción de linfocitos NK. El experimento se realizó usando SR8278 5 y 10 μM . A 5 μM , la adición de SR8278
- 45 mostró el mayor efecto de la producción de linfocitos NK en el Día 0 con más de 1,4 veces (Figura 5A y 5B). Como era de esperar, la adición de SR8278 10 μM mostró un aumento mayor en la producción de linfocitos NK en comparación con 5 μM (Figura 5A y 5B). El aumento fue significativo en los Días 0, 1 y 2, en más de 1,6 veces (Figura 5A y 5B). Sin embargo, la adición de SR8278 después del Día 2 no mostró ninguna diferencia significativa con respecto al control "Sin fármaco".

- 50 **[0160]** A pesar de que la adición de SR8278 en los Días 0 y 1 mostró el mayor aumento en el porcentaje de linfocitos NK, la cantidad de células vivas fue notablemente baja en comparación con el control "Sin fármaco" (Figura 5C). Es posible que cuando se añadiese SR8278 para mejorar la expresión de E4bp4 en el Día 0 o el Día 1, las células no se cebaron para diferenciarse en CLPs o NKPs. Una dosis demasiado alta o una adición demasiado temprana de
- 55 SR8278 no es sostenible. A partir de estos resultados, el Día 2 es el momento óptimo para añadir SR8278 al cultivo de HPC, proporcionando producciones máximas de linfocitos NK, así como conservando recuentos altos de células vivas.

Ejemplo 3 - La administración del agonista de REV-ERB, GSK4112, tiene el efecto opuesto a SR8278

- 60 **[0161]** Se predice que el efecto de SR8278 en el aumento de linfocitos NK fue el resultado de la inhibición de REV-ERB, que normalmente inhibe la expresión de E4bp4. Por lo tanto, el agonista de REV-ERB, GSK4112, se analizó para ver si conduciría a una disminución en la producción de linfocitos NK. El cultivo de HPC más la adición de

GSK4112 se realizó exactamente como se ha mostrado anteriormente en la Figura 3.



5 Estructura de GSK4112 (1,1-dimetiletil N-[(4-clorofenil)metil]-N-[(5-nitro-2-tienil)metil]glicinato, SR6452)

[0162] Como se predijo, la producción de linfocitos NK se redujo en casi el 50 %, cuando se administró GSK4112 (Figura 6).

Esto respalda que la regulación de REV-ERB da lugar al control del desarrollo de linfocitos NK a través de la modulación de la expresión de E4bp4 y que GSK4112 y SR8278 actúan en esta ruta que implica REV-ERB- α y E4bp4.

Ejemplo 4 - SR8278 actúa sobre linfocitos NK a través de E4bp4

[0163] Después del experimento con GSK4112, se predijo que SR8278 actúa a través de la ruta que implica REV-ERB y E4bp4. Para confirmar si SR8278 requiere E4bp4 para aumentar la producción de linfocitos NK, se analizó SR8278 en HPC aisladas de ratones de tipo salvaje (WT) (E4bp4^{+/+}), con genes inactivados E4bp4 (KO) (E4bp4^{-/-}) y heterocigotos (Het) (E4bp4^{+/-}). Los cultivos celulares se realizaron como anteriormente (Figura 3), donde se añadió SR8278 en el Día 2 del cultivo y la producción de linfocitos NK se midió mediante citometría de flujo.

[0164] A diferencia de los Ejemplos anteriores en los que los datos se mostraron en diferencia de veces en relación con el control "Sin fármaco", estos datos se muestran como porcentajes reales de linfocitos NK producidos. Esto se debe a que cuando se usaron ratones E4bp4 KO, el porcentaje de linfocitos NK en el control "Sin fármaco" fue prácticamente cero ya que la ausencia de E4bp4 detiene el desarrollo de linfocitos NK (Figura 7C y 7D). El mayor aumento significativo se puede observar cuando se añadió SR8278 5 μ M y 10 μ M a HPCs en el cultivo aislado de ratones WT en comparación con el control "Sin fármaco" (Figura 7A y 7D). Los efectos del cultivo de HPCs de ratones Het fueron similares a los ratones WT (Figura 7A, 7B y 7D). Por otro lado, hubo una ausencia de linfocitos NK en cultivos de HPCs de ratones E4bp4 KO independientemente de la concentración de SR8278 (Figura 7C y 7D).

[0165] Estos datos respaldan la hipótesis de que SR8278 actúa en la ruta en la que E4bp4 es esencial. La presencia de E4bp4 es obligatoria para que SR8278 aumente satisfactoriamente la producción de linfocitos NK. SR8278 puede inhibir la actividad de REVERB, donde REV-ERB normalmente inhibe la expresión de E4bp4. Por lo tanto, la inhibición de REV-ERB por SR8278 reduce la expresión de E4bp4. La activación de E4bp4 tiene como resultado la promoción del desarrollo de linfocitos NK y más linfocitos NK producidos (Figura 1).

Ejemplo 5 - La adición de SR8278 aumenta la expresión de E4bp4, Id2 y Eomes

[0166] Como los datos presentados en los Ejemplos anteriores indican que SR8278 probablemente actúa en la ruta con REV-ERB y E4bp4, se predijo que los genes que están bajo control transcripcional de E4bp4 tales como Id2 y Eomes deberían ser regulados al alza cuando la expresión de E4bp4 es regulada al alza. Las HPC aisladas de un ratón WT se cultivaron como anteriormente (Figura 2) pero las células se cosecharon y analizaron usando RT-qPCR en los Días 3, 4 y 5. La expresión relativa de los genes E4bp4, Id2 y Eomes se comparó con el gen constitutivo, Hprt. En el Día 4, la expresión de E4bp4, Id2 y Eomes fue mayor en las muestras tratadas con SR8278 en comparación con el control "Sin fármaco" (Figura 8). El aumento en la expresión de E4bp4 desapareció en el Día 5, pero el aumento de la expresión de Id2 permaneció (Figura 8B). La regulación al alza de E4bp4 y sus dianas corriente abajo se produce en cuestión de horas y solo se mantiene elevada durante un período de tiempo definido.

[0167] Por lo tanto, estos datos respaldan la conclusión de que SR8278 activa la expresión del gen del factor de transcripción E4bp4, ya que las dianas corriente abajo conocidas de E4bp4 (21) también se regularon al alza conjuntamente.

Ejemplo 6 - SR8278 también mejora el desarrollo de linfocitos NK a partir de células CD34⁺ humanas

[0168] La hipótesis de que SR8278 aumenta la producción de linfocitos NK no tendría ningún valor terapéutico potencial si esto tampoco lo tendría para la producción de linfocitos NK humanos. Por lo tanto, se examinó el efecto de SR8278 en la producción de linfocitos NK humanos a partir de HPC humanas. Las HPC humanas se obtuvieron como la población de CD34⁺ purificada de sangre del cordón umbilical de colaboradores en el Anthony Nolan Research Institute, Londres. El desarrollo de linfocitos NK humanos pasa por una ruta de desarrollo similar al desarrollo de

linfocitos NK de ratón. A diferencia del cultivo de HPC de ratón, las células CD34⁺ humanas se cultivaron directamente sobre células estromales EL08-1D2 en presencia de citocinas IL-3, IL-7, Flt3L, SCF e IL-15 durante 14 y 16 días antes de la recolección y el análisis por citometría de flujo. Para tratar de optimizar la producción de linfocitos NK humanos, se añadió SR8278 5 o 10 μM ya sea en el día 2, 4 o 6 del cultivo.

[0169] Los datos mostraron que las células CD34⁺ humanas eran más sensibles a SR8278 que las HPC de ratón, ya que la adición de SR8278 10 μM era completamente tóxica para las células. Sin embargo, el efecto de SR8278 5 μM no fue tóxico y la adición de SR8278 5 μM en el Día 2 mostró un claro aumento en el número de linfocitos NK (Figura 9). Los datos se muestran como porcentaje de linfocitos NK puesto que desde el Día 14 hasta el Día 16, el número de linfocitos NK aumentó exponencialmente de 5 % a 20 % en el control "Sin fármaco" (Figura 9). La adición de SR8278 5 μM en el Día 4 casi triplicó el porcentaje de linfocitos NK cuando se cosecharon las células en el Día 14, aumentando de 5,53 % a 13,7 % (Figura 9). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos NK se duplicó cuando se cosecharon en el Día 16, aumentando de 21,8 % a 44,3 % (Figura 9).

Ejemplo 7 - E4bp4 puede ser inhibido tanto por REV-ERB- α como por REV-ERB- β

[0170] El trabajo anterior ha enfatizado la acción de REV-ERB- α en la inhibición de la expresión de E4bp4, pero el papel del REV-ERB homólogo REV-ERB- β no se ha investigado. Por lo tanto, en la presente investigación se decidió examinar directamente el efecto de la eliminación del gen REV-ERB- α en la producción de linfocitos NK. Los Ejemplos anteriores sugieren que los ratones REV-ERB- α KO mejorarían la expresión de E4bp4 y, por lo tanto, mejorarían el desarrollo de linfocitos NK. Las HPC extraídas de médula ósea, así como los esplenocitos tomados de ratones WT (Rev-erb- α ^{+/+}) y REV-ERB- α KO (Rev-erb- α ^{-/-}) se analizaron mediante citometría de flujo. Si REV-ERB- α es responsable de la regulación de la producción de linfocitos NK, debe haber un mayor número de células NKP y NK en la médula ósea y, potencialmente, también en el bazo.

[0171] Sin embargo, como se muestra en la Figura 10, en ratones REV-ERB- α KO, el porcentaje de células NK y NKP no fue diferente del WT. Estos hallazgos sugieren que tanto REV-ERB- α como REV-ERB- β , que es un homólogo de REV-ERB- α , pueden estar inhibiendo la expresión de E4bp4. Cuando falta REV-ERB- α , REVERB- β puede compensar la actividad de REV-ERB- α . Respaldando esta hipótesis, los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en REV-ERB- α y REV-ERB- β han demostrado que tanto REV-ERB- α como REV-ERB- β se unen al locus de E4bp4 en exactamente las mismas regiones. Por otra parte, SR8278 es en realidad un inhibidor doble, que inhibe tanto REV-ERB- α como REV-ERB- β . Por lo tanto, el aumento de linfocitos NK cuando se administró SR8278 puede ser el resultado de la inhibición de ambos REV-ERB.

[0172] Esto se ve respaldado por los datos reportados en la Figura 11A, que demuestran que los ratones deficientes tanto de REV-ERB- α como de REV-ERB- β tienen un aumento muy significativo en la cantidad de linfocitos NKP. La Figura 11B proporciona evidencia adicional en apoyo de la función conjunta de REV-ERB- α y REV-ERB- β . La Figura 11B muestra que en ratones mutantes con ambos genes de REV-ERB eliminados (DKO) hay un aumento constante en las cantidades de linfocitos NKP en comparación con otros ratones de "control" (WT, ratones con solo un alelo de REV-ERB- α y REV-ERB- β eliminado (α Het/ β Het), y ratones con ambas copias de REV-ERB- β eliminadas (β KO)), mientras que otras células progenitoras no se ven afectadas.

[0173] Por lo tanto, los presentes inventores han proporcionado la primera evidencia de que la inhibición de REV-ERB- α y REV-ERB- β , tiene potencial terapéutico para aumentar el número de linfocitos NK, y que dicha inhibición se puede lograr usando compuestos de la invención tales como SR8278.

Materiales y procedimientos

Ratones

[0174] Se usaron ratones de tipo salvaje, ratones heterocigotos E4bp4 (*E4bp4*^{+/+}), ratones con genes inactivados E4bp4 (*E4bp4*^{-/-}), ratones con genes inactivados REV-ERB- α (*Rev-erb- α* ^{-/-}), ratones con genes inactivados REV-ERB- β (*Rev-erb- β* ^{-/-} o β KO), ratones con genes inactivados doble REV-ERB- α y β (*Rev-erb- α* ^{-/-} β ^{-/-} o DKO) y ratones heterocigotos REV-ERB- α y β (*Rev-erb- α* ^{+/+} β ^{+/+} o α Het/ β Het). Todos los ratones estaban en un fondo C57BL/6, entre 6 y 12 semanas de edad y emparejados por edad y sexo. Los ratones Rbpj^{fllox/fllox} estaban en un fondo de FVB. Todos los procedimientos experimentales y de cría de animales se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido y las directrices locales. Se genotipificaron ratones E4bp4 con el cebador directo 5'CTCTGAGCTGGCTGATGTG3' (cebador A) y el cebador inverso 5'GCTTCAAGTCTCCACCAAGC3' (cebador B) para la detección del alelo de tipo salvaje o 5'CCATGCTCCTGTCTTGATGA3' para la detección del alelo nulo.

Células y cultivo celular

[0175] Las células estromales OP9-GFP se cultivaron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (Sigma Aldrich) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 20 % y penicilina/estreptavidina (P/S). Para los experimentos realizados en placas de 96 pocillos, las células estromales OP9 se sembraron en placas a la

concentración de 2000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 1 día antes de la adición de HPCs. Para los experimentos realizados en placas de 24 pocillos, las células estromales OP9 se sembraron en placas a la concentración de 4000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 días antes de la adición de HPCs. Las células estromales EL08.1D2 se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle - modificación alfa (Alfa-MEM) complementado con 50 % de Myelocult M5300 (Stem Cell Technologies), 7,5 % de FBS, 50 µM de β-Mercaptoetanol, 1 µM de hidrocortisona y 1 % de P/S (Sigma Aldrich). Para los experimentos con células progenitoras CD34⁺ humanas, se irradiaron EL08.1D2 a 3000 rads/30 Gy y se sembraron en placas recubiertas con gelatina EmbryoMax de 96 pocillos (Millipore) a la concentración de 20.000 células/pocillo. Se cultivaron a 32 °C, CO₂ al 5 % durante la noche, antes de que las células CD34⁺ se transfirieran a ellas.

Aislamiento de HPCs de ratón

[0176] Las HSC negativas de linaje se purificaron a partir de médula ósea de ratón triturando los huesos de las patas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con suero de ternera fetal (FCS) al 2 % (STEMCELL Technologies), se llenaron hasta 40 ml con tampón de clasificación celular activada magnéticamente (MAC) (PBS, EDTA 2 mM, o 5 % de BSA, estéril y filtrado) y se centrifugaron a 800 g durante 2 minutos. Las células se volvieron a suspender en un cóctel conjugado con PE, (20 µl de anti-B220 (RA3-6B2), anticuerpos anti-CD2 de ratón (RM2-5, anti-Ter119 (TER119) y anti-NK.1.1 (PK136) y 5 µl de anti-CD11b (M1/70) y anti-GR-1 (RB6-8C5) (todos de Bioscience)) incubados durante 5 minutos a 4 °C, centrifugados y resuspendidos en micropérlas anti-PE durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron en un tampón MACS y se pasaron a través de columnas MACS. Esto permitió la selección negativa de HPCs. Después de la eliminación del linaje, se analizaron 50 µl de las células mediante citometría de flujo para verificar la pureza.

Desarrollo *in vitro* de linfocitos NK a partir de HPCs

[0177] Las HPC se sembraron en placas y se cultivaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 5x10⁵ HPC/pocillo en 1 ml de medio de citocina completo (medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich), 10 % FCS, 50 µM de β-Mercaptoetanol, 10 ng/ml de ligando Flt3 (Flt3L) (R&D Systems), 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems), 100 ng/ml de factor de células madre (SCF) (R&D Systems) y 1 % de P/S) durante 2 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. Luego, las HPC se transfirieron a células OP9 a 4500 células/pocillo para experimentos en placas de 96 pocillos y 3x10⁴ células/pocillo para experimentos en placas de 24 pocillos en medio de diferenciación de linfocitos NK de ratón (Alfa-MEM (Sigma Aldrich) más 20 % de FCS, 1 % de P/S y 30 ng/ml de IL-15). Las células se dejaron en cultivo a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 7 días con un cambio de medio de diferenciación de linfocitos NK de ratón en el día 3 o 4.

Desarrollo *in vitro* de células progenitoras de sangre de cordón umbilical humano

[0178] Las células progenitoras de sangre de cordón umbilical CD34⁺ fueron proporcionadas por Anthony Nolan Research Institute, University College, Londres. Estas células se aislaron de sangre de cordón umbilical y se crioconservaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento y transporte. Las células se descongelaron, se contaron y luego se sembraron en placas EL08.1D2 preparadas previamente a una concentración de 1000 células/pocillo en medio de diferenciación de linfocitos NK humanos (alfa-MEM más seroAB humana al 20 % (Invitrogen), 50 µM de β-Mercaptoetanol y 1 % de P/S junto con 5 ng/ml de IL-3 humana (Peprotech), 20 ng/ml de IL-7 humana (Peprotech), 10 ng/ml de FLT3-L humano (Peprotech), 20 ng/ml de SCF humano (Peprotech) y 10 ng/ml de IL-15 humana (Peprotech). Tenga en cuenta que la IL-3 humana solo es necesario para la primera semana de cultivo. Las células se dejaron en el cultivo a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 14 o 16 días con un cambio del medio de diferenciación de NK humanos en los días 7 y 12.

Citometría de flujo

[0179] Las células que se analizarán mediante citometría de flujo se pasaron a través de tamices celulares de 40 µm para eliminar los aglutinamientos y se lavaron con tampón PBS, se centrifugaron a 800 g durante 2 minutos y se volvieron a suspender en un tampón de clasificación de celular activado por fluorescencia (FACS) de 100 µl (PBS más BSA al 1 %) con anticuerpos conjugados con fluorocromo adecuados a una dilución de 1 en 300. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos, todos los cuales eran anti-ratón y son de eBioscience a menos que se especifique: 2B4 (clon m2B4(B6)458.1; BioLegend), CD2 (RM2-5), CD3 (17A2), CD11b (M1/70), CD19 (1D3), CD27 (LG.7F9), CD122 (TM-b1), CD127 (A7R34), B220 (RA3-6B2), ckit (ACK2), Flt3 (A2F10), Gr1 (RB6-8C5), NK1.1 (PK136), Sca1 (D7), Ter119 (TER119), NKp46 (29A1.4) anti-CD45 humano (HI30), anti-CD2 humano (RPA-2.10) y anti-CD56 humano (CMSSB). El cóctel de linaje contenía B220, CD2, CD11b, Gr1, NK1.1 y Ter119. Las células se tiñeron en la oscuridad a 4 °C durante 30 minutos y luego se lavaron con 2 ml de tampón FACS, se centrifugaron y volvieron a suspender en 300 µl de tampón FACS más yoduro de propidio (PI) también a una dilución de 1 en 300. La citometría de flujo se realizó usando el analizador de células LSRFortessa™ (Becton Dickinson Bioscience), se clasificó usando FACSAria (Becton Dickinson) como se indica y se realizó un análisis de datos completo usando FlowJo Software.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

[0180] Las reacciones de PCR individuales contenían 200 µM de dNTPS, 1 µM de cebador directo (cebador A), 1 µM de cebador inverso (cebador B o C) y 0,5 U de polimerasa Taq. Las reacciones de PCR se establecieron en las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos (1 ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 3 segundos, 72 °C durante 45 segundos (40 ciclos); 72 °C durante 3 minutos (1 ciclo); mantener a 4 °C.

5

Electroforesis de ADN

[0181] La electroforesis de ADN se realizó usando agarosa al 1 % (Sigma) disuelta en tampón TAE más 500 ng/ml de bromuro de etidio (Sigma). El ADN obtenido de las reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en gel y se realizó a 100 voltios durante aproximadamente 45 minutos. Los geles se obtuvieron por imágenes usando EC3 Imaging System (Ultra Violet Products Ltd).

10

Purificación de ARN

[0182] El ARN se extrajo usando el kit Qiagen RNeasy Micro según el protocolo del fabricante (Qiagen). La centrifugación se realizó a 8000 g durante 15 segundos y el flujo continuo se descartó. En resumen, se añadieron 350 µl de tampón RLT + 10 % (β-mercaptoetanol a las células recolectadas. El ARN se precipitó adicionalmente usando 300 µl de etanol al 70 % y se transfirió a la columna de centrifugación RNeasy MinElute y se centrifugó. A continuación, se añadieron 350 µl de tampón RW1 a la columna de centrifugación MinElute y se centrifugaron. A esto le siguió por la adición de 10 µl de DNasa I (Qiagen) y 70 µl de tampón RDD (Qiagen) y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 350 µl de tampón RW1 para lavar la DNasa I y se centrifugaron. Se añadieron 500 µl de tampón RPE a la columna y se centrifugaron, seguido de la adición de 500 µl de etanol al 80 % y se centrifugaron durante 2 minutos. Finalmente, se añadieron 14 µl de agua libre de RNasa para eluir el ARN y la columna se centrifugó durante 1 minuto a velocidad máxima. La concentración de ARN en cada muestra se midió usando Nanodrop, y todas las muestras se diluyeron a la misma concentración de trabajo.

20

25

Transcripción inversa (conversión de ARN en ADNc)

[0183] La transcripción inversa se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena transcriptor (Roche). Siguiendo el protocolo del fabricante, se preparó una mezcla plantilla-cebador para una reacción de 20 µl, donde todos los reactivos se proporcionan en el kit: ARN (1 µg a 5 µg), 2 µl de cebador hexámero aleatorio, recubrir la reacción hasta 13 µl con agua (calidad PCR). A continuación, la mezcla de plantilla-cebador se desnaturizó calentando el tubo durante 10 minutos a 65 °C para eliminar las estructuras secundarias de ARN. A esa mezcla de plantilla-cebador, se añadieron 4 µl de tampón de reacción de transcriptasa inversa transcriptor, 0,5 µl de inhibidor de RNasa protector, 2 µl de mezcla de desoxinucleótidos y 0,5 µl de transcriptasa inversa transcriptor. Los reactivos se mezclaron y se colocaron en un ciclador de bloque térmico con los siguientes ajustes: 25 °C durante 10 minutos; 55 °C durante 30 minutos; 85 °C durante 5 minutos y almacenar a 4 °C.

30

35

Cuantificación de ARN expresado diana usando qPCR en tiempo real

40

[0184]

Temperatura (°C)	Tiempo
95	20 minutos
95	3 segundos
96	30 segundos

Condiciones usadas para RT-qPCR

45

[0185] Se construyó una curva estándar usando ADNc de esplenocitos diluido a 1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. A los 2 ml de ADNc producidos en la etapa anterior, se añaden 5 µl de mezcla maestra de Taqman (Applied Biosystem), 0,5 µl de kit de ensayo de expresión génica de Taqman de Hprt, Nfil3, Id2 o Eomes (Applied Biosystem) y 2,5 µl de agua libre de RNasa. El programa usado se muestra en la Tabla 1 y la reacción se analizó durante 47 ciclos.

50

Análisis estadístico

[0186] El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Mann-Whitney en GraphPad Prism 7

55

Análisis

[0187] Los linfocitos NK son linfocitos que son capaces de producir citocinas, influir en otras células inmunitarias, así como destruir células cancerosas, infectadas por patógenos o dañadas directamente. Debido a estas

propiedades, los investigadores están interesados en incrementar el número de linfocitos NK para mejorar la citotoxicidad frente a células cancerosas o infectadas por patógenos. Los linfocitos NK se desarrollan a partir de HSCs en la médula ósea y son controlados por un procedimiento estrechamente regulado que involucra varios factores de transcripción y citocinas. E4bp4 es el gen más crítico que regula el desarrollo de linfocitos NK. E4bp4 tiene un efecto profundo en la producción de linfocitos NK a pesar de que solo hay un aumento relativamente pequeño en los niveles de ARNm de E4bp4 durante el desarrollo de linfocitos NK. Poco se sabe sobre los medios que existen para controlar la actividad de la proteína E4bp4. La capacidad de controlar la expresión de E4bp4 tendría implicaciones muy significativas para el desarrollo y la producción de linfocitos NK.

10 **[0188]** Las presentes invenciones han demostrado que tras la administración de SR8278, la producción de linfocitos NK en ensayos de producción de linfocitos NK aumenta más de 2 veces. En los ensayos llevados a cabo, el tiempo óptimo para añadir SR8278 al cultivo de HPC para la producción de linfocitos NK *in vitro* fue en el Día 2 y la dosis óptima fue de 10 μ M.

15 **[0189]** Dado que se sabe que SR8278 inhibe REV-ERB, se analizó un agonista de REV-ERB (GSK4112) y se descubrió que tenía el efecto opuesto a SR8278, lo que disminuye la producción de linfocitos NK. Esto refuerza la hipótesis de que la manipulación de la actividad de REV-ERB puede afectar la producción de linfocitos NK.

[0190] La importancia de la presencia de E4bp4 para la función SR8278 se investigó más a fondo. Las HPC se aislaron de ratones WT, E4bp4 KO y Het. En ausencia de E4bp4 en ratones E4bp4 KO, se descubrió que SR8278 no tenía ningún efecto en la producción de linfocitos NK. Con el fin de que SR8278 realice su actividad en el aumento de la producción de linfocitos NK, al menos un alelo de E4bp4 debe estar presente.

[0191] Puesto que E4bp4 desempeña un papel crítico en la acción de SR8278 en el aumento de la producción de linfocitos NK, se analizó la expresión de genes que están bajo control transcripcional de E4bp4, tal como Id2 y Eomes, y se descubrió que estaban regulados al alza de forma concomitante.

[0192] También se descubrió que la adición de SR8278 aumenta significativamente el desarrollo de linfocitos NK humanos a partir de HPC humanas cultivadas *in vitro*.

30 **[0193]** Los experimentos anteriores enfatizaron el papel de REV-ERB- α en la inhibición de la expresión de E4bp4. Para investigar el papel de REV-ERB- β , se realizó una prueba de tinción en células NKP y NK usando ratones WT y REV-ERB- α KO. Se descubrió que el porcentaje de células NK y NKP era similar en tipo salvaje KO y REV-ERB- α . Por lo tanto, es posible que REV-ERB- α no sea el único factor de transcripción que regula E4bp4, sino que su homólogo, REV-ERB- β , pueda tener también el mismo papel. En ausencia de REV-ERB- α , REV-ERB- β compensaría la actividad de REV-ERB- α , ya que son altamente homólogos. Esto está respaldado por los datos reportados en esta solicitud que demuestran que los ratones REV-ERB- α y REV-ERB- β KO doble demuestran un aumento en la cantidad de células NKP en comparación con las células de control, e incluso en comparación con los ratones REV-ERB- α KO o REV-ERB- $\alpha^{+/-}$ y REV-ERB- $\beta^{+/-}$ (α Het/ β Het).

40 **[0194]** El control de la expresión de E4bp4 mediante estímulos extrínsecos tiene implicaciones significativas para la producción de linfocitos NK humanos para su uso en inmunoterapia. Los procedimientos convencionales para la producción de linfocitos NK a partir de diversas fuentes (por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas y células madre de sangre del cordón umbilical) implican el uso de citocinas y células estromales para comprometer las células al linaje de NK, pero influir en la expresión de E4bp4 podría proporcionar una estrategia simple para mejorar el procedimiento. Por lo tanto, la manipulación de la expresión de E4bp4 tiene utilidad potencial en la producción de futuros productos inmunoterapéuticos de linfocitos NK, incluyendo la movilización directa de la producción de linfocitos NK *in vivo* como inmunoterapia.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

[0195]

<110> IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED
55 <120> LINFOCITOS CITOLÍTICOS NATURALES
<130> P48707WO
60 <150> GB 1703476,0
<151> 03/03/2017
<160> 9
65 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 1923
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1833)..(1833)
 <223> n e s a, c, g o t
 10
 <400> 1
 gcccttttct ttctcctcgt cggcccgaga gcaggaacac gataacgaag gaggcccaac 60
 ttcatccaat aaggagcctg acggatttat cccagacggt agaacaaaag gaagaatatt 120
 gatggatttt aaaccagagt ttttaaagag cttgagaata cggggaaatt aatttgttct 180
 cctacacaca tagatagggg aaggttggtt ctgatgcagc tgagaaaaat gcagaccgtc 240
 aaaaaggagc aggcgtctct tgatgccagt agcaatgtgg acaagatgat ggtccttaat 300
 tctgctttaa cggaagtgtc agaagactcc acaacagggtg aggacgtgct tctcagtga 360
 ggaagtgtgg ggaagaacaa atcttctgca tgtcggagga aacgggaatt cattcctgat 420
 gaaaagaaag atgctatgta ttgggaaaaa aggcggaaaa ataatgaagc tgccaaaaga 480
 tctcgtgaga agcgtcgact gaatgacctg gttttagaga acaaactaat tgcactggga 540
 gaagaaaacg ccactttaaa agctgagctg ctttcactaa aattaaagtt tggtttaatt 600
 agctccacag catatgctca agagattcag aaactcagta attctacagc tgtgtacttt 660
 caagattacc agacttccaa atccaatgtg agttcatttg tggacgagca cgaaccctcg 720
 atggtgtcaa gtagttgtat ttctgtcatt aaacactctc cacaaagctc gctgtccgat 780
 gtttcagaag tgtcctcagt agaacacacg caggagagct ctgtgcaggg aagctgcaga 840
 agtcctgaaa acaagttcca gattatcaag caagagccga tggaattaga gagctacaca 900
 agggagccaa gagatgaccg aggcctttac acagcgtcca tctatcaaaa ctatatgggg 960
 aattctttct ctgggtactc acactctccc ccactactgc aagtcaaccg atcctccagc 1020
 aactccccga gaacgtcggg aactgatgat ggtgtggtag gaaagtcac tcatggagaa 1080

```

gacgagcaac aggtcccca gggcccatc cattctccag ttgaactcaa gcatgtgcat      1140
gcaactgtgg ttaaagttcc agaagtgaat tcctctgcct tgccacacaa gctccggatc      1200
aaagccaaag ccatgcagat caaagtagaa gcctttgata atgaatttga ggccacgcaa      1260
aaactttcct cacctattga catgacatct aaaagacatt tcgaactcga aaagcatagt      1320
gccccaaagta tggtagattc ttctcttact cttttctcag tgcaagtgc taacattcaa      1380
gatttgtctc tcaaactgga gcaactggat caaaaagaac tgagtggcaa aactcagaat      1440
agtttcaaaa ctggagttgt tgaaatgaaa gacagtggct acaaagtttc tgacccagag      1500
aacttgtatt tgaagcaggg gatagcaaac ttatctgcag aggttgtctc actcaagaga      1560
cttatagcca cacaaccaat ctctgcttca gactctgggt aaattactac tgagtaagag      1620
ctgggcattt agaaagatgt catttgcaat agagcagtc attttgtatt atgctgaatt      1680
ttcactggac ctgtgatgtc atttactgt gatgtgcaca tgttgtctgt ttggtgtctt      1740
tttgtgcaca gattatgatg aagattagat tgtgttatca ctctgcctgt gtatagtcag      1800
atagtcatat gcgtaaggct gtatatatta agnttttatt tttgtgttgc tattataaag      1860
tgtgtaagtt accagtttca ataaaggatt ggtgacaaac acagaaaaaa aaaaaaaaaa      1920
aaa                                                                    1923

```

<210> 2
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Gln Leu Arg Lys Met Gln Thr Val Lys Lys Glu Gln Ala Ser Leu
 1 5 10 15

Asp Ala Ser Ser Asn Val Asp Lys Met Met Val Leu Asn Ser Ala Leu
 20 25 30

Thr Glu Val Ser Glu Asp Ser Thr Thr Gly Glu Asp Val Leu Leu Ser
 35 40 45

Glu Gly Ser Val Gly Lys Asn Lys Ser Ser Ala Cys Arg Arg Lys Arg
 50 55 60

Glu Phe Ile Pro Asp Glu Lys Lys Asp Ala Met Tyr Trp Glu Lys Arg
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Asn Glu Ala Ala Lys Arg Ser Arg Glu Lys Arg Arg Leu
 85 90 95

Asn Asp Leu Val Leu Glu Asn Lys Leu Ile Ala Leu Gly Glu Glu Asn

ES 2 928 879 T3

100					105					110					
Ala	Thr	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	Gly	Leu
		115					120					125			
Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Ser
	130					135					140				
Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Gln	Asp	Tyr	Gln	Thr	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Ser
145					150					155					160
Ser	Phe	Val	Asp	Glu	His	Glu	Pro	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Ser	Cys	Ile
				165					170					175	
Ser	Val	Ile	Lys	His	Ser	Pro	Gln	Ser	Ser	Leu	Ser	Asp	Val	Ser	Glu
			180					185					190		
Val	Ser	Ser	Val	Glu	His	Thr	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Gln	Gly	Ser	Cys
		195					200					205			
Arg	Ser	Pro	Glu	Asn	Lys	Phe	Gln	Ile	Ile	Lys	Gln	Glu	Pro	Met	Glu
	210					215					220				
Leu	Glu	Ser	Tyr	Thr	Arg	Glu	Pro	Arg	Asp	Asp	Arg	Gly	Ser	Tyr	Thr
225					230					235					240
Ala	Ser	Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Met	Gly	Asn	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ser
				245					250					255	
His	Ser	Pro	Pro	Leu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro
			260					265					270		
Arg	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Asp	Gly	Val	Val	Gly	Lys	Ser	Ser	Asp	Gly
		275					280					285			
Glu	Asp	Glu	Gln	Gln	Val	Pro	Lys	Gly	Pro	Ile	His	Ser	Pro	Val	Glu
	290					295					300				
Leu	Lys	His	Val	His	Ala	Thr	Val	Val	Lys	Val	Pro	Glu	Val	Asn	Ser
305					310					315					320
Ser	Ala	Leu	Pro	His	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys	Ala	Lys	Ala	Met	Gln	Ile
				325					330					335	
Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Asp	Asn	Glu	Phe	Glu	Ala	Thr	Gln	Lys	Leu	Ser
			340					345					350		

Ser Pro Ile Asp Met Thr Ser Lys Arg His Phe Glu Leu Glu Lys His
355 360 365

Ser Ala Pro Ser Met Val His Ser Ser Leu Thr Pro Phe Ser Val Gln
370 375 380

Val Thr Asn Ile Gln Asp Trp Ser Leu Lys Ser Glu His Trp His Gln
385 390 395 400

Lys Glu Leu Ser Gly Lys Thr Gln Asn Ser Phe Lys Thr Gly Val Val
405 410 415

Glu Met Lys Asp Ser Gly Tyr Lys Val Ser Asp Pro Glu Asn Leu Tyr
420 425 430

Leu Lys Gln Gly Ile Ala Asn Leu Ser Ala Glu Val Val Ser Leu Lys
435 440 445

Arg Leu Ile Ala Thr Gln Pro Ile Ser Ala Ser Asp Ser Gly
450 455 460

<210> 3

<211> 2793

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

gggcacgagg cgctccctgg gatcacatgg tacctgctcc agtgccgcgt gcggcccggg	60
aaccctgggc tgctggcgcc tgcgagagc cctctgtccc agggaaaggc tcgggcaaaa	120
ggcggctgag attggcagag tgaaatatta ctgccgaggg aacgtagcag ggcacacgtc	180
tcgcctcttt gcgactcggg gccccgtttc tccccatcac ctacttactt cctggttgca	240
acctctcttc ctctgggact tttgcaccgg gagctccaga ttcgccaccc cgcagcgctg	300
cggagccggc aggcagaggc accccgtaca ctgcagagac ccgaccctcc ttgctacctt	360
ctagccagaa ctactgcagg ctgattcccc ctacacactc tctctgctct tcccatgcaa	420
agcagaactc cgttgctca acgtccaacc cttctgcagg gctgcagtcc ggccacccca	480
agaccttgct gcaggggtgt tcggatcctg atcgtgagtc gcgggggtcca ctccccgccc	540
ttagccagtg cccagggggc aacagcggcg atcgcaacct ctagtgtgag tcaagggtcca	600
gtttgaatga ccgctctcag ctggtgaaga catgacgacc ctggactcca acaacaacac	660
aggtggcgtc atcacctaca ttgggtccag tggctcctcc ccaagccgca ccagccctga	720
atccctctat agtgacaact ccaatggcag cttccagtcc ctgacccaag gctgtccac	780
ctacttccca ccatcccca ctggctccct caccgaagac ccggctcgct cctttgggag	840
cattccaccc agcctgagtg atgacggctc cccttcttcc tcattcttct cgctcgctac	900

ctcctcctcc ttctataatg ggagccccc tgggagtcta caagtggcca tggaggacag	960
cagccgagtg tccccagca agagcaccag caacatcacc aagctgaatg gcatggtgtt	1020
actgtgtaaa gtgtgtgggg acgttgccctc gggcttccac tacggtgtgc acgcctgcga	1080
gggctgcaag ggctttttcc gtccggagcat ccagcagaac atccagtaca aaaggtgtct	1140
gaagaatgag aattgctcca tcgtccgcat caatcgcaac cgctgccagc aatgtcgctt	1200
caagaagtgt ctctctgtgg gcatgtctcg agacgctgtg cgttttgggc gcatcccaa	1260
acgagagaag cagcggatgc ttgctgagat gcagagtgcc atgaacctgg ccaacaacca	1320
gttgagcagc cagtgccgc tggagacttc acccaccag caccaccac caggcccat	1380
gggcccctcg ccaccccctg ctccggtccc ctcaccctg gtgggcttct ccagtttcc	1440
acaacagctg acgcctccca gatccccaag ccctgagccc acagtggagg atgtgatatc	1500
ccaggtggcc cgggcccac gagagatctt cacctacgc catgacaagc tgggcagctc	1560
acctggcaac ttcaatgcca accatgcac aggtagccct ccagccacca cccacatcg	1620
ctgggaaaat cagggtgcc cacctgccc caatgacaac aacaccttgg ctgccagcg	1680
tcataacgag gccctaaatg gtctgcgcca ggctccctcc tcctaccctc ccacctggcc	1740
tcctggccct gcacaccaca gctgccacca gtccaacagc aacgggcacc gtctatgcc	1800
caccacgtg tatgcagccc cagaaggcaa ggcacctgcc aacagtcccc ggcagggcaa	1860
ctcaaagaat gttctgctgg catgtcctat gaacatgtac ccgcatggac gcagtgggcg	1920
aacggtgcag gagatctggg aggatctctc catgagcttc acgcccgtg tgcgggaggt	1980
ggtagagttt gccaaacaca tcccgggctt ccgtgacctt tctcagcatg accaagtac	2040
cctgcttaag gctggcacct ttgaggtgct gatggtgcgc tttgcttcgt tgttcaacgt	2100
gaaggaccag acagtgatgt tcctaagccg caccacctac agcctgcagg agcttggtgc	2160
catgggcatg ggagacctgc tcagtgccat gttcgacttc agcgagaagc tcaactccct	2220
ggcgcttacc gaggaggagc tgggcctctt caccgcggtg gtgcttgtct ctgcagaccg	2280
ctcgggcatg gagaattccg ctccggtgga gcagctccag gagacgctgc tgcgggctct	2340
tcgggctctg gtgctgaaga accggccctt ggagacttcc cgcttcacca agctgctgct	2400
caagctgccg gacctgcgga ccctgaacaa catgcattcc gagaagctgc tgtccttccg	2460
ggtggacgcc cagtgaaccg cccggccggc cttctgccgc tgcccccttg tacagaatcg	2520
aactctgcac ttctctctcc tttaacgagac gaaaaggaaa agcaaaccag aatcttattt	2580
atattgttat aaaatattcc aagatgagcc tctggccccc tgagccttct tgtaaatacc	2640
tgctccctc ccccatcacc gaacttcccc tcctccccta tttaaaccac tctgtctccc	2700
ccacaaccct cccctggccc tctgatttgt tctgttctctg tctcaaatcc aatagttcac	2760

agctgagctg gcttcaaaaa aaaaaaaaaa aaa

2793

<210> 4

<211> 614

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	1	5	10	15
Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	20	25	30	
Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Gly	Cys	35	40	45	
Pro	Thr	Tyr	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	50	55	60	
Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Ser	65	70	75	80
Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Tyr	Asn	85	90	95	
Gly	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	Ser	Arg	100	105	110	
Val	Ser	Pro	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Leu	Asn	Gly	Met	115	120	125	
Val	Leu	Leu	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	His	Tyr	130	135	140	
Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Ile	145	150	155	160
Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Tyr	Lys	Arg	Cys	Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Cys	Ser	165	170	175	
Ile	Val	Arg	Ile	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Cys	Arg	Phe	Lys	Lys	180	185	190	
Cys	Leu	Ser	Val	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	195	200	205	
Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Leu	Ala	Glu	Met	Gln	Ser	Ala	Met				

ES 2 928 879 T3

210					215					220					
Asn	Leu	Ala	Asn	Asn	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Cys	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser
225					230					235					240
Pro	Thr	Gln	His	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro
				245					250					255	
Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Pro	Gln	Gln
			260					265					270		
Leu	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Asp	Val
		275					280					285			
Ile	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Ala	His	Arg	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Ala	His
290						295					300				
Asp	Lys	Leu	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Asn	Phe	Asn	Ala	Asn	His	Ala	Ser
305					310					315					320
Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	His	Arg	Trp	Glu	Asn	Gln	Gly	Cys
				325					330					335	
Pro	Pro	Ala	Pro	Asn	Asp	Asn	Asn	Thr	Leu	Ala	Ala	Gln	Arg	His	Asn
			340					345					350		
Glu	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
		355					360					365			
Trp	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	His	His	Ser	Cys	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Asn
370						375					380				
Gly	His	Arg	Leu	Cys	Pro	Thr	His	Val	Tyr	Ala	Ala	Pro	Glu	Gly	Lys
385					390					395					400
Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Pro	Arg	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Asn	Val	Leu	Leu
			405						410					415	
Ala	Cys	Pro	Met	Asn	Met	Tyr	Pro	His	Gly	Arg	Ser	Gly	Arg	Thr	Val
			420					425					430		
Gln	Glu	Ile	Trp	Glu	Asp	Phe	Ser	Met	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	Arg
		435					440					445			
Glu	Val	Val	Glu	Phe	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Gly	Phe	Arg	Asp	Leu	Ser
450						455					460				

Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu
465 470 475 480

Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met
485 490 495

Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly
500 505 510

Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn
515 520 525

Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val
530 535 540

Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu
545 550 555 560

Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys
565 570 575

Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu
580 585 590

Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser
595 600 605

Phe Arg Val Asp Ala Gln
610

<210> 5

<211> 1740

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (994)..(994)

<223> n e s a, c, g o t

<400> 5

atggaggtga atgcaggagg tgtgattgcc tatatcagtt cttccagctc agcctcaagc	60
cctgcctctt gtcacagtga gggttctgag aatagtttcc agtcctcctc ctcttctggt	120
ccatcttctc caaatagctc taattctgat accaatggta atcccaagaa tggatgatctc	180
gccaatattg aaggcatctt gaagaatgat cgaatagatt gttctatgaa aacaagcaaa	240
tcgagtgcac ctgggatgac aaaaaatcat agtgggtgtga caaaatttag tggcatgggt	300
ctactgtgta aagtctgtgg ggatgtggcg tcaggattcc actatggagt tcatgcttgc	360
gaaggctgta agggtttctt tcggagaagt attcaacaaa acatccagta caagaagtgc	420
ctgaagaatg aaaactgttc tataatgaga atgaatagga acagatgtca gcaatgtcgc	480
ttcaaaaagt gtctgtctgt tggaatgtca agagatgctg ttcggtttgg tcgtattcct	540
aagcgtgaaa aacagaggat gctaattgaa atgcaaagtg caatgaagac catgatgaac	600
agccagttca gtggtcactt gcaaaaatgac acattagtag aacatcatga acagacagcc	660
ttgccagccc aggaacagct gcgacccaag cccaactgg agcaagaaaa catcaaaagc	720
tcttctcctc catcttctga ttttgcaaag gaagaagtga ttggcatggg gaccagagct	780
cacaaggata cttttatgta taatcaagag cagcaagaaa actcagctga gagcatgcag	840
ccccagagag gagaacggat tccaagaac atggagcaat ataatttaaa tcatgatcat	900
tgcggcaatg ggcttagcag ccattttccc tgtagtgaga gccagcagca tctcaatgga	960
cagttcaaag ggaggaatat aatgcattac ccanatggcc atgccatttg tattgcaa	1020
ggacattgta tgaacttctc caatgcttat actcaaagag tatgtgatag agttccgata	1080
gatggatddd ctcagaatga gaacaagaat agttacctgt gcaacactgg aggaagaatg	1140
catctgggtt gtccaatgag taagtctcca tatgtggatc ctcataaatc aggacatgaa	1200
atctgggaag aattttcgat gagcttcact ccagcagtga aagaagtggg ggaatttgca	1260
aagcgtattc ctgggttcag agatctctct cagcatgacc aggtcaacct tttaaaggct	1320
gggacttttg aggttttaaat ggtacggttc gcatcattat ttgatgcaaa ggaacgtact	1380
gtcacctttt taagtggaaa gaaatatagt gtggatgatt tacactcaat ggagcaggg	1440
gatctgctaa actctatggt tgaatttagt gagaagctaa atgccctcca acttagtgat	1500
gaagagatga gtttgtttac agctgttgct ctggtatctg cagatcgatc tggaatagaa	1560
aacgtcaact ctgtggaggc tttgcaggaa actctcattc gtgcactaag gaccttaata	1620
atgaaaaacc atccaaatga ggcctctatt tttacaaaac tgcttctaaa gttgccagat	1680
cttcgatctt taaacaacat gcactctgag gagctcttgg cttttaaaagt tcacccttaa	1740

<210> 6

<211> 578

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (332)..(332)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 6

Met	Glu	Val	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15	

ES 2 928 879 T3

Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Ser	Cys	His	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser		
			20					25						30			
Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Asn		
		35					40					45					
Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Glu		
	50					55					60						
Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Ile	Asp	Cys	Ser	Met	Lys	Thr	Ser	Lys		
65					70					75					80		
Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Met	Thr	Lys	Asn	His	Ser	Gly	Val	Thr	Lys	Phe		
				85					90					95			
Ser	Gly	Met	Val	Leu	Leu	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Gly		
			100					105					110				
Phe	His	Tyr	Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg		
		115					120					125					
Arg	Ser	Ile	Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Tyr	Lys	Lys	Cys	Leu	Lys	Asn	Glu		
	130					135					140						
Asn	Cys	Ser	Ile	Met	Arg	Met	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Cys	Arg		
145					150					155					160		
Phe	Lys	Lys	Cys	Leu	Ser	Val	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Phe		
				165					170					175			
Gly	Arg	Ile	Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Leu	Ile	Glu	Met	Gln		
			180					185					190				
Ser	Ala	Met	Lys	Thr	Met	Met	Asn	Ser	Gln	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Gln		
		195					200					205					
Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Glu	His	His	Glu	Gln	Thr	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln		
	210					215					220						
Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser		
225					230					235					240		
Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Asp	Phe	Ala	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Gly	Met		
				245					250					255			
Val	Thr	Arg	Ala	His	Lys	Asp	Thr	Phe	Met	Tyr	Asn	Gln	Glu	Gln	Gln		

ES 2 928 879 T3

260							265					270				
Glu	Asn	Ser	Ala	Glu	Ser	Met	Gln	Pro	Gln	Arg	Gly	Glu	Arg	Ile	Pro	
		275					280					285				
Lys	Asn	Met	Glu	Gln	Tyr	Asn	Leu	Asn	His	Asp	His	Cys	Gly	Asn	Gly	
	290					295					300					
Leu	Ser	Ser	His	Phe	Pro	Cys	Ser	Glu	Ser	Gln	Gln	His	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Gln	Phe	Lys	Gly	Arg	Asn	Ile	Met	His	Tyr	Pro	Xaa	Gly	His	Ala	Ile	
				325					330					335		
Cys	Ile	Ala	Asn	Gly	His	Cys	Met	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	
			340					345					350			
Arg	Val	Cys	Asp	Arg	Val	Pro	Ile	Asp	Gly	Phe	Ser	Gln	Asn	Glu	Asn	
		355					360					365				
Lys	Asn	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asn	Thr	Gly	Gly	Arg	Met	His	Leu	Val	Cys	
	370					375					380					
Pro	Met	Ser	Lys	Ser	Pro	Tyr	Val	Asp	Pro	His	Lys	Ser	Gly	His	Glu	
385					390					395					400	
Ile	Trp	Glu	Glu	Phe	Ser	Met	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	Lys	Glu	Val	
				405					410					415		
Val	Glu	Phe	Ala	Lys	Arg	Ile	Pro	Gly	Phe	Arg	Asp	Leu	Ser	Gln	His	
			420					425					430			
Asp	Gln	Val	Asn	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Phe	Glu	Val	Leu	Met	Val	
		435					440					445				
Arg	Phe	Ala	Ser	Leu	Phe	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Thr	Phe	Leu	
	450					455					460					
Ser	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ser	Val	Asp	Asp	Leu	His	Ser	Met	Gly	Ala	Gly	
465					470					475					480	
Asp	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Phe	Glu	Phe	Ser	Glu	Lys	Leu	Asn	Ala	Leu	
				485					490					495		
Gln	Leu	Ser	Asp	Glu	Glu	Met	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Val	
			500					505					510			

Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ile Glu Asn Val Asn Ser Val Glu Ala Leu
515 520 525

Gln Glu Thr Leu Ile Arg Ala Leu Arg Thr Leu Ile Met Lys Asn His
530 535 540

Pro Asn Glu Ala Ser Ile Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu Pro Asp
545 550 555 560

Leu Arg Ser Leu Asn Asn Met His Ser Glu Glu Leu Leu Ala Phe Lys
565 570 575

Val His

<210> 7

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo A para la detección de alelo de tipo salvaje E4bp4

10

<400> 7

ctctgagctt ggctgatgtg 20

<210> 8

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador inverso para la detección de E4bp4

<400> 8

gcttcaagtc tccaccaagc 20

<210> 9

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador para la detección del alelo nulo E4bp4

<400> 9

ccatgctcct gtcttgatga 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *ex vivo* para expandir una población de linfocitos NK, que comprende las etapas de:
 - 5 a) cultivar una muestra que comprende células progenitoras hematopoyéticas (HPC) obtenida de un paciente;
 - b) poner en contacto dicha muestra con un compuesto que inhibe la acción de REV-ERB; y
 - c) expandir dichas células *in vitro* para producir una población de linfocitos NK.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho compuesto aumenta la expresión de E4bp4 al
10 disminuir la actividad de REV-ERB.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde dicho compuesto disminuye la actividad de
 - 15 (a) REV-ERB- α y/o REV-ERB- β , preferentemente REV-ERB- β ; o
 - (b) REV-ERB- α y REV-ERB- β .
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho compuesto es:
 - 20 (a) un antagonista de REV-ERB, preferentemente un antagonista de REV-ERB- α y REV-ERB- β ; y/o
 - (b) seleccionado de entre una molécula pequeña, un reactivo PROTAC, un ARN bicatenario (ARNbc), un ARN de interferencia pequeña (ARNip), un ARN de horquilla pequeña (ARNhp), un microARN, un ARN antisentido, un aptámero, un anticuerpo, una ribozima, un péptido o un peptidomimético, donde preferentemente el compuesto es una molécula pequeña.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto es SR8278, ARN5187, 2-(5-metilfuran-2-carbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de etilo, 4-((4-clorobencil)((5-nitrotiofen-2-il)metil)amino)-N-fenilpiperidin-1-carboxamida, 4-(((1-(4-fluorofenil)ciclopentil)amino)metil)-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol, 1-(2-fluorofenil)-N-(3-((1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina o 1-(4-fluorofenil)-N-(3-(1-metilpiperidin-4-il)metil)bencil)ciclopentan-1-amina, preferentemente SR8278.
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra de HPCs se obtiene de médula ósea, sangre de cordón umbilical y/o sangre periférica.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto se añade
35 dentro de los 2 días posteriores al aislamiento de las HPCs en la muestra de la reivindicación 1(a).

Figura 1

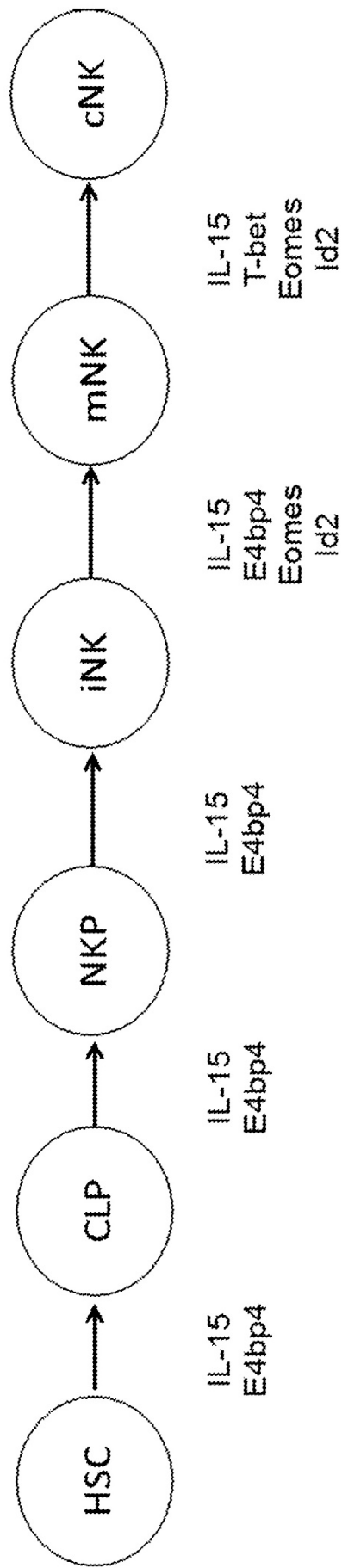
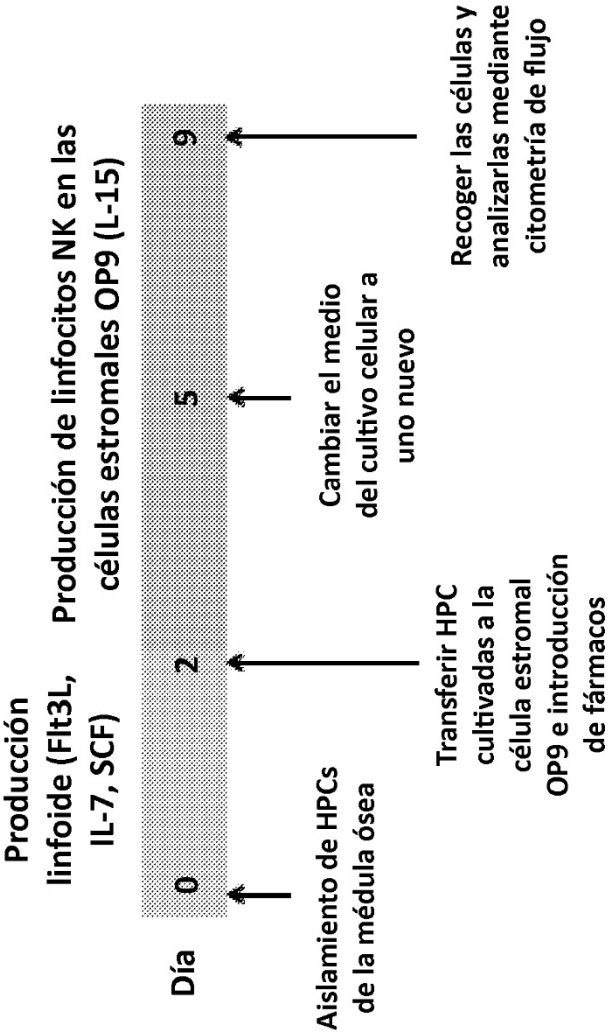


Figura 2



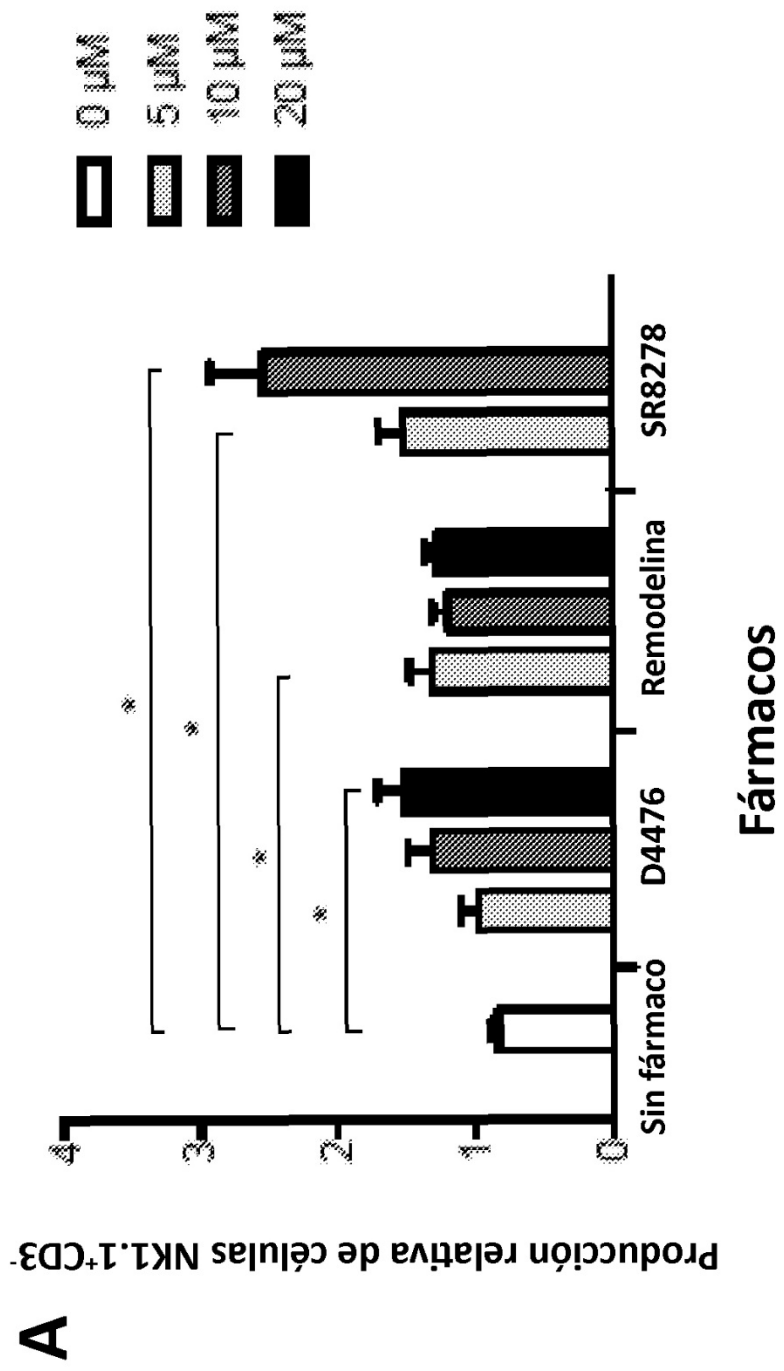


Figura 3

Figura 3 (continuación)

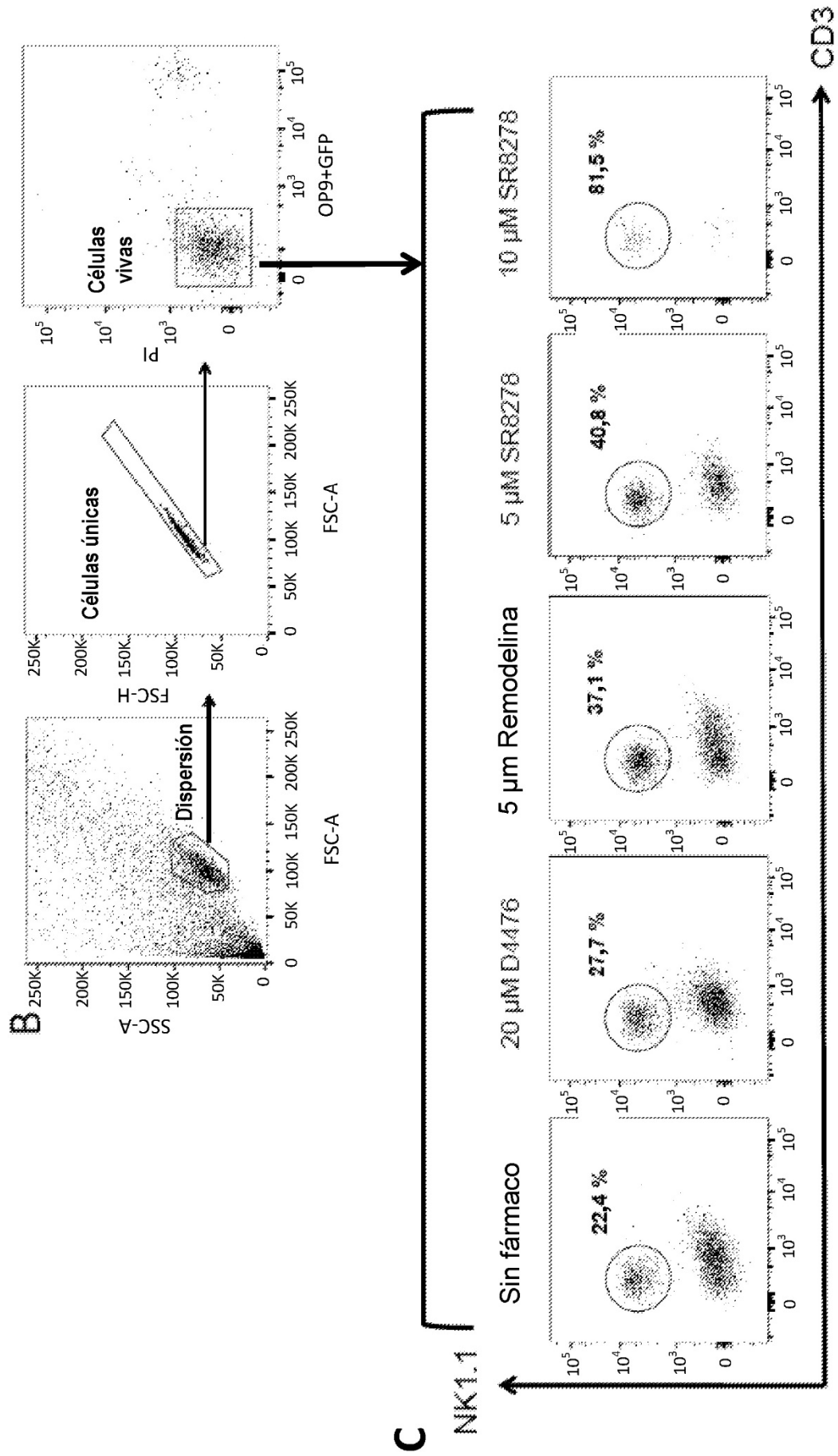


Figura 4

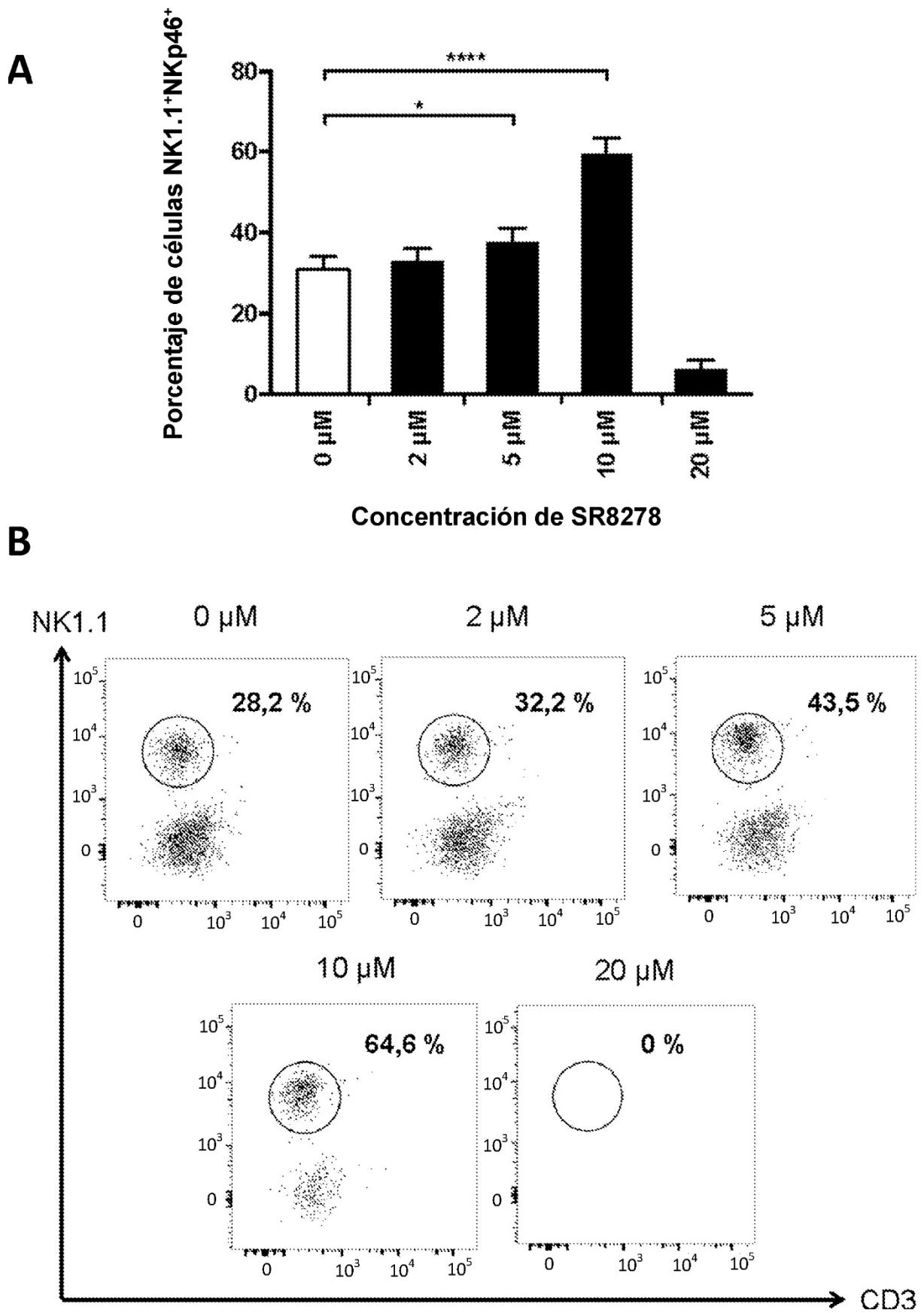


Figura 5

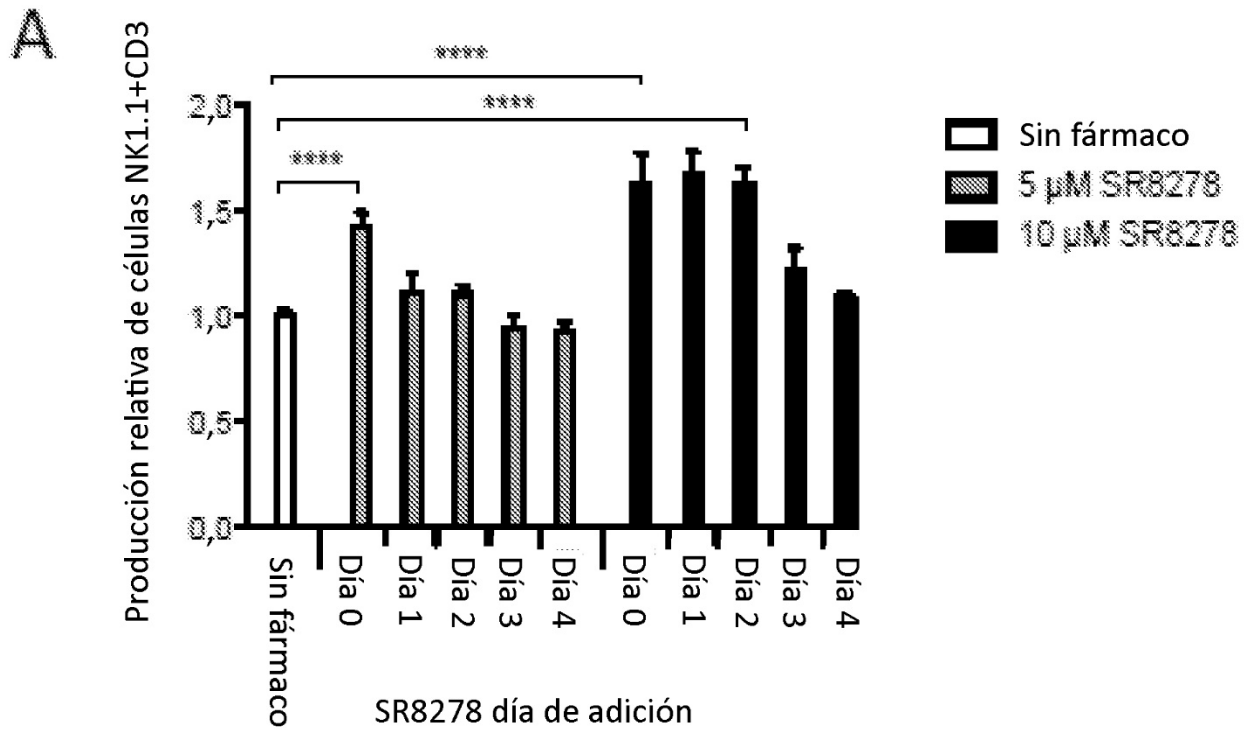


Figura 5 (continuación)

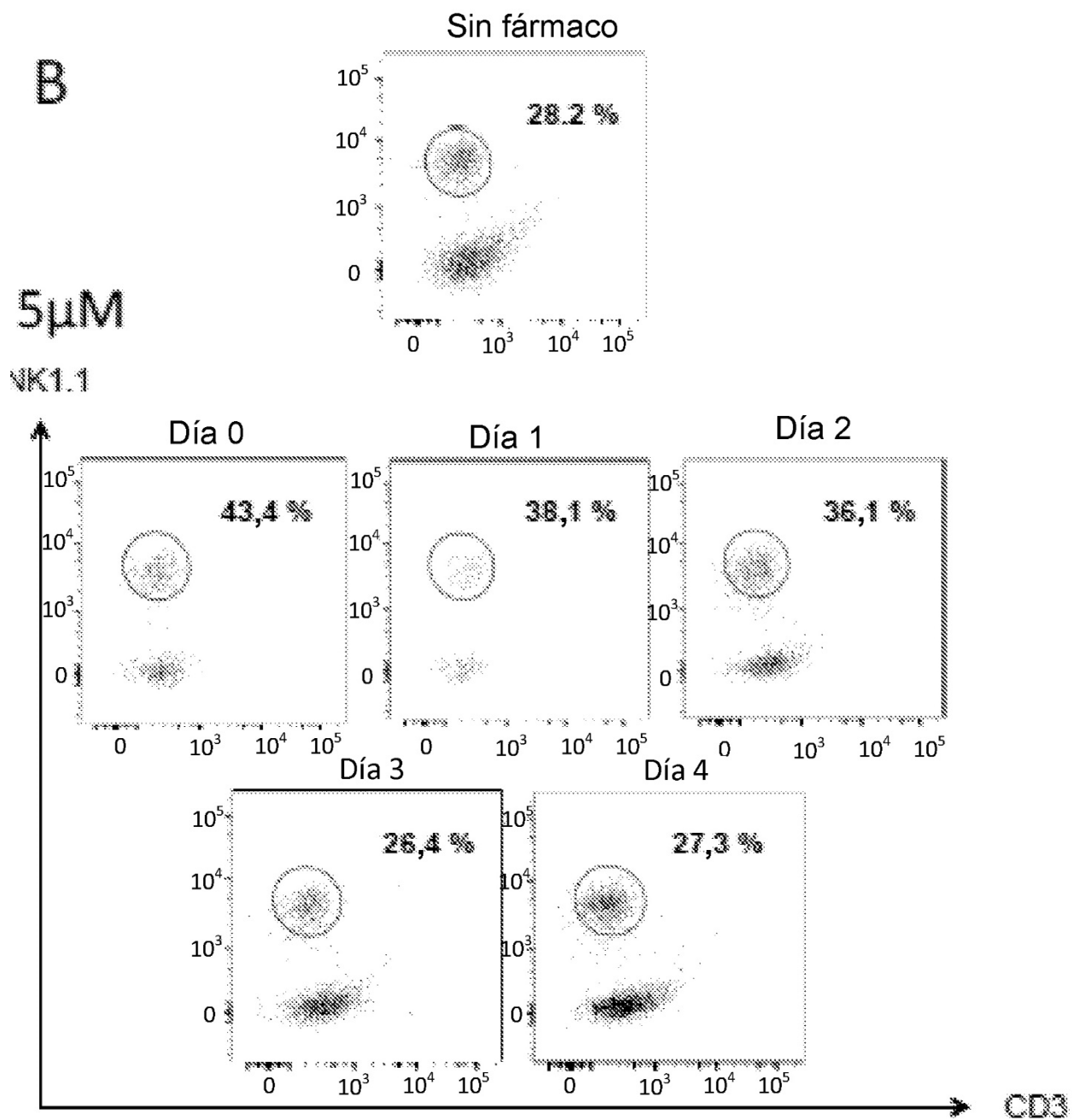


Figura 5B (continuación)

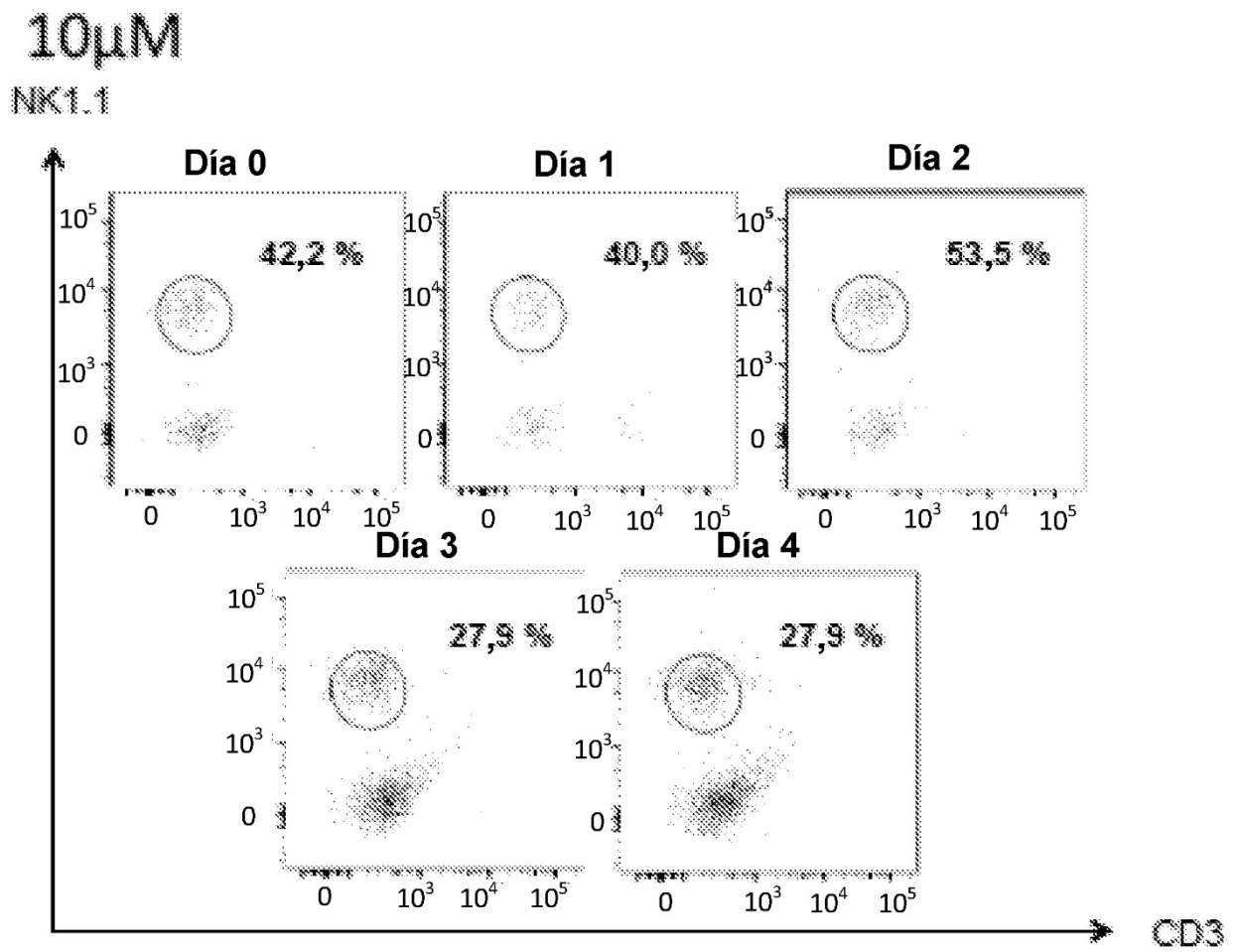


Figura 5 (continuación)

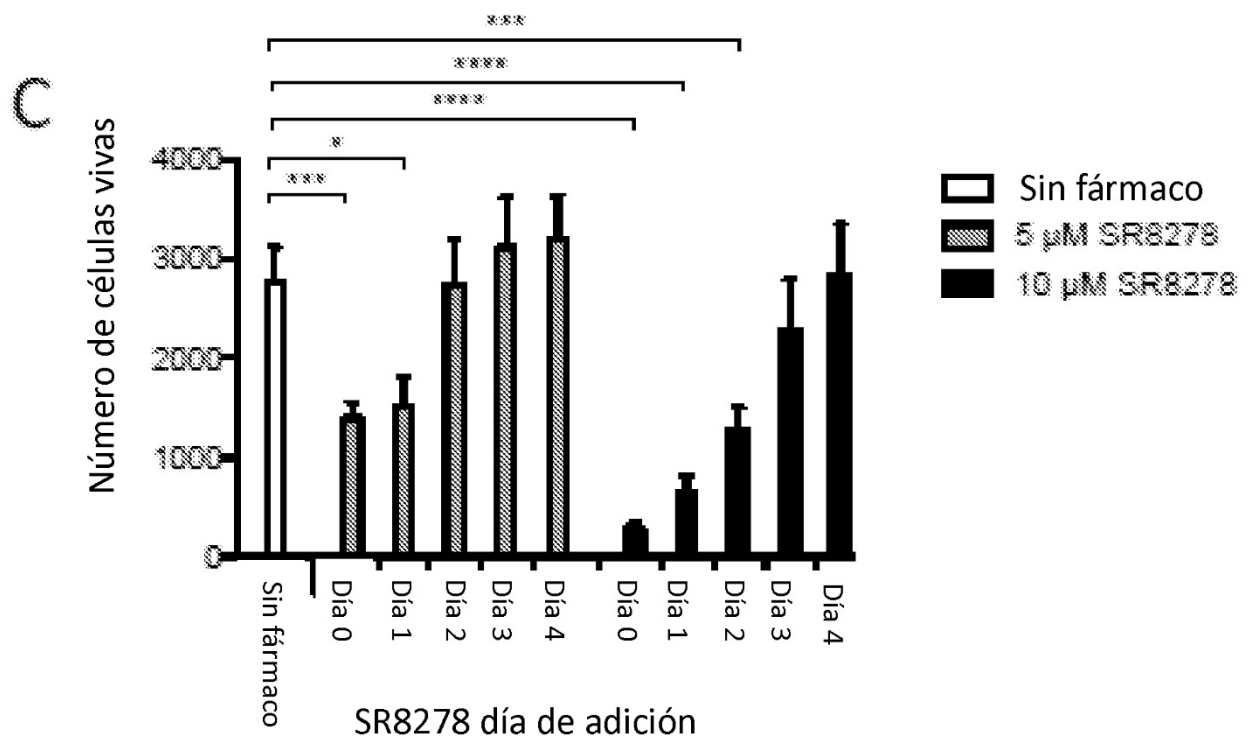


Figura 6

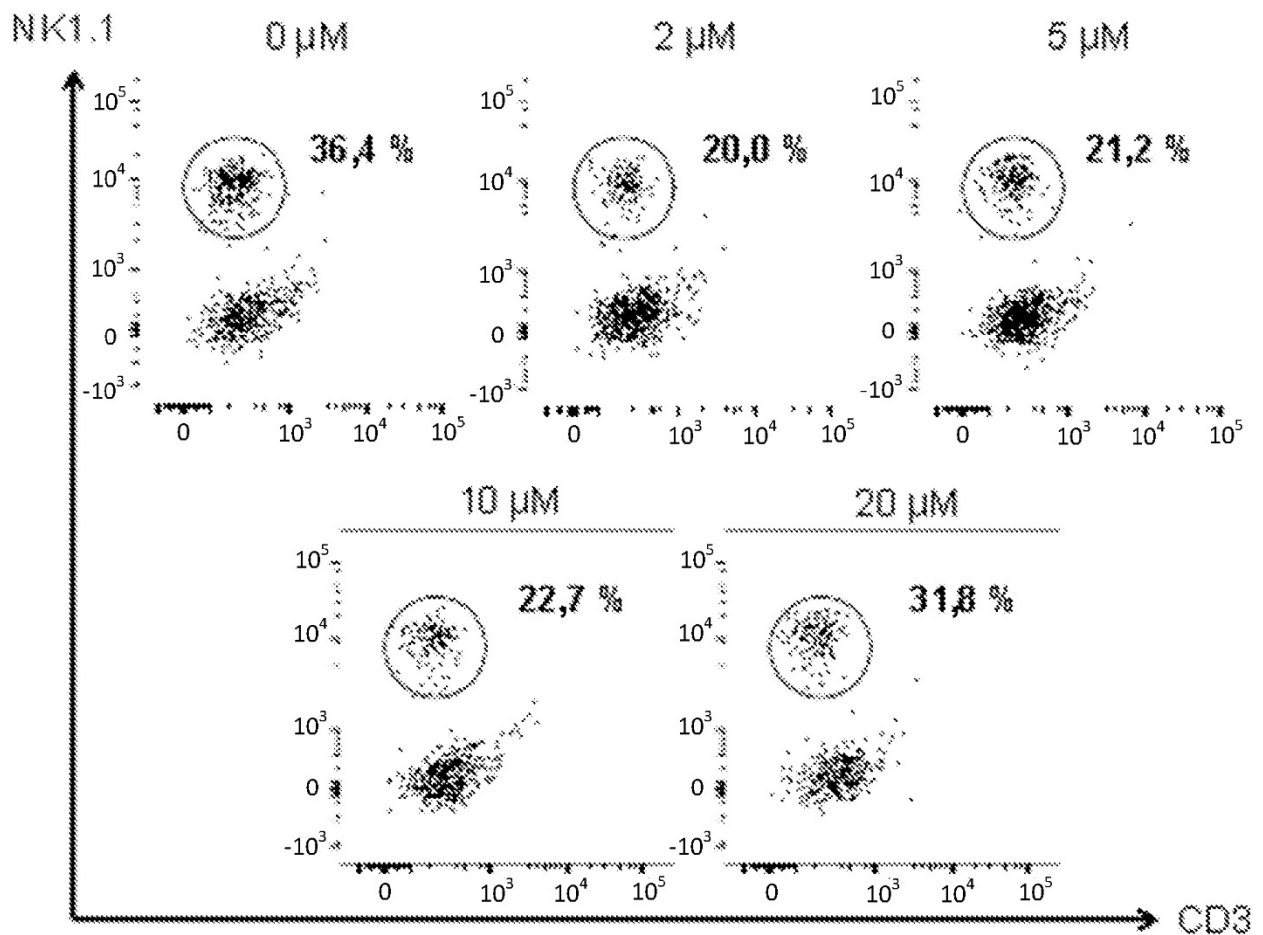
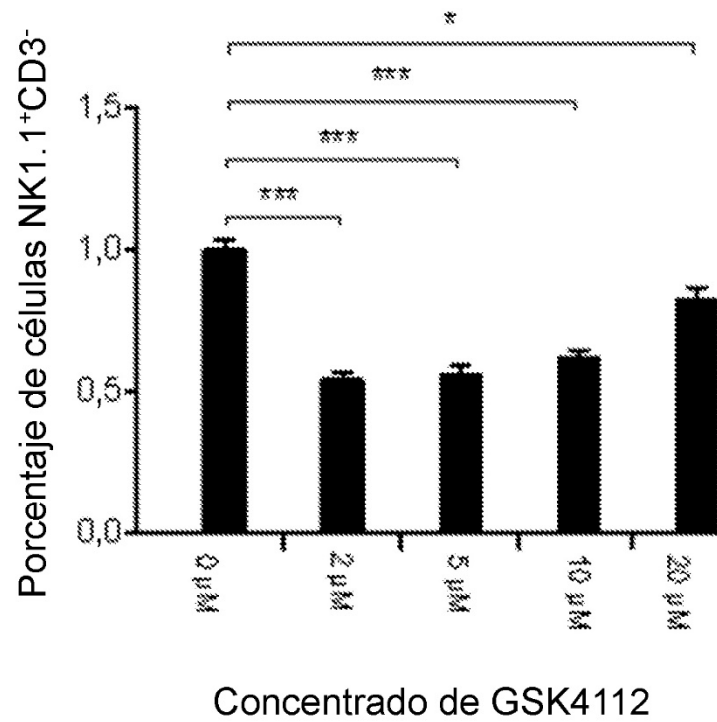


Figura 7

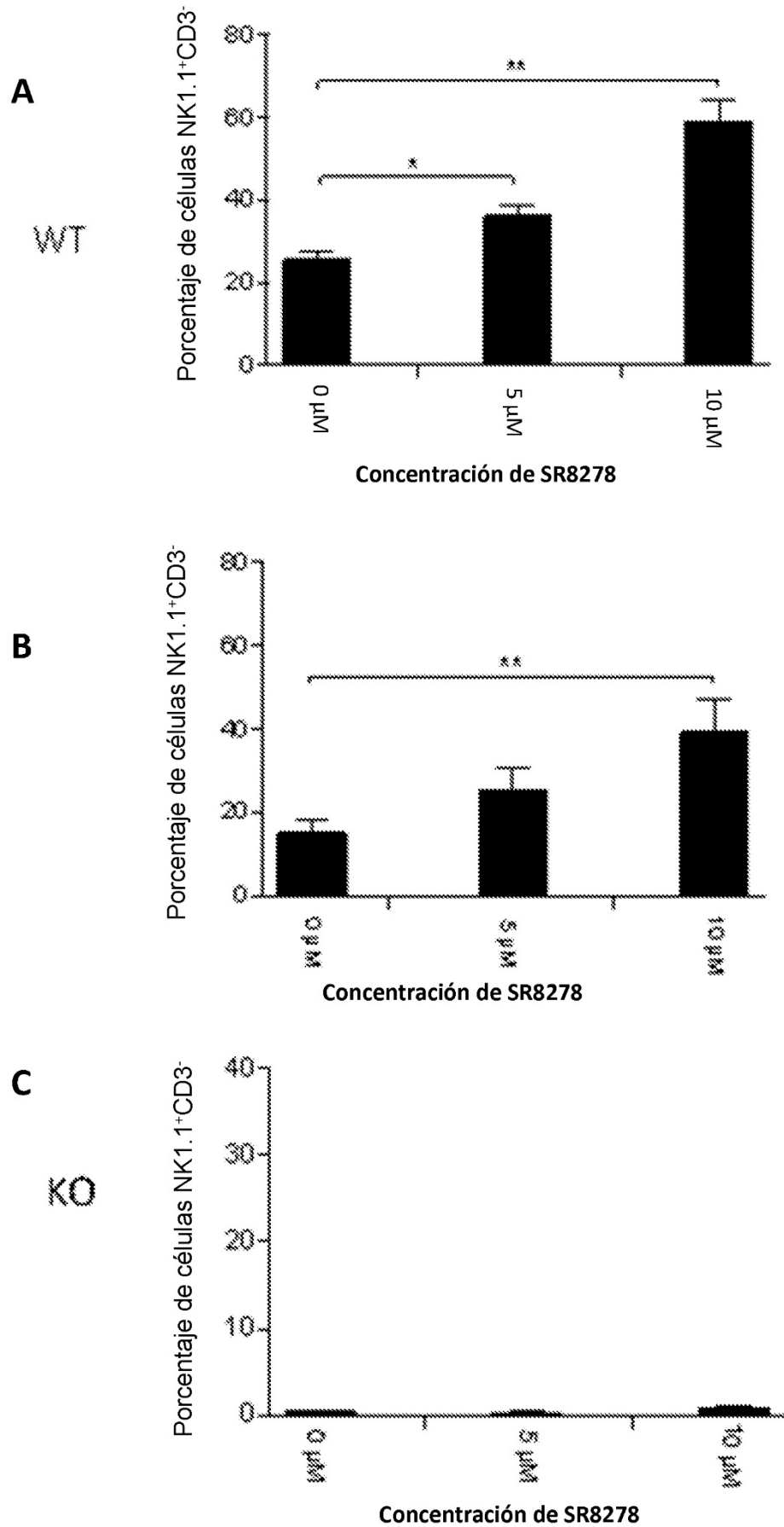


Figura 7 (continuación)

D

NK1.1

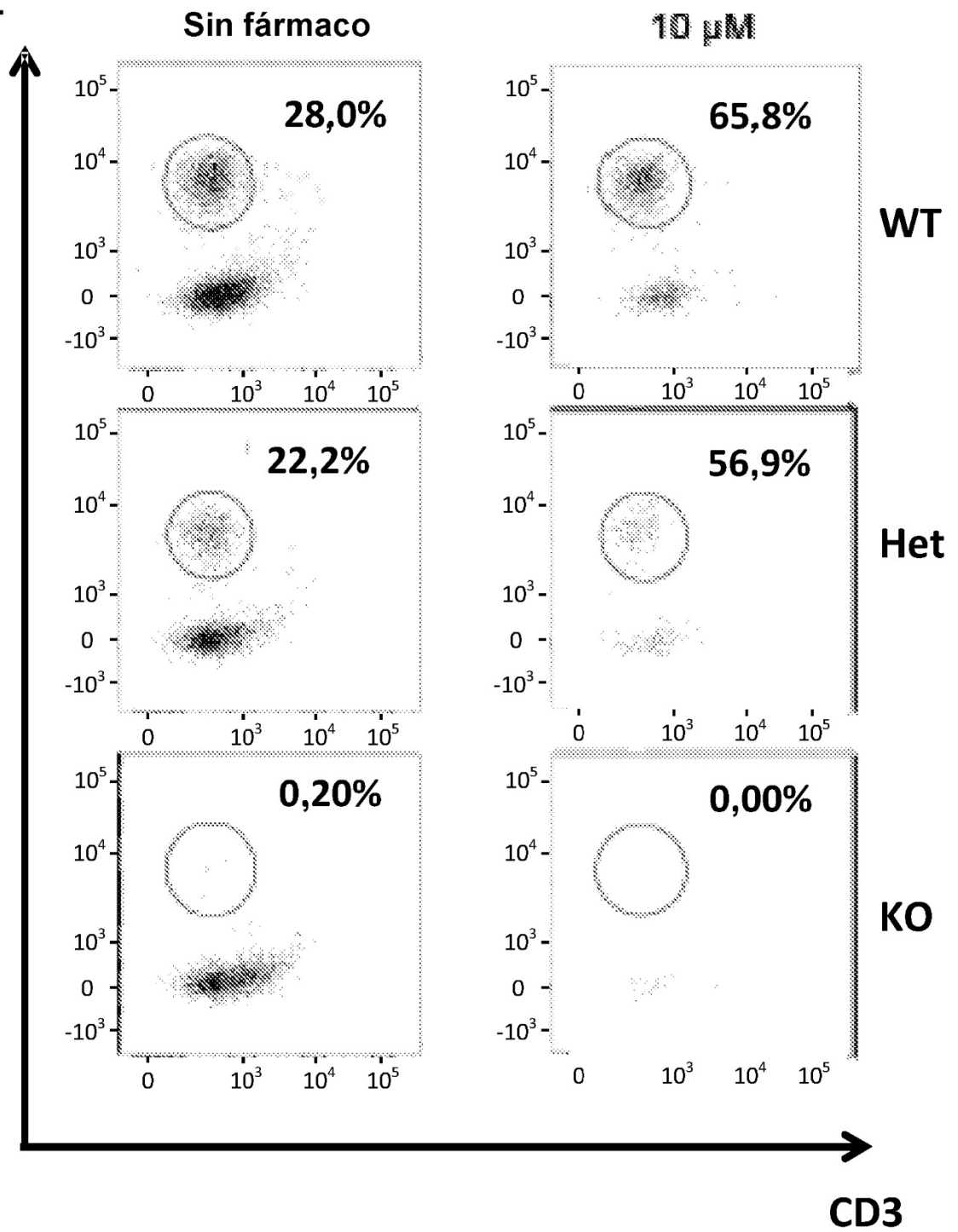


Figura 8

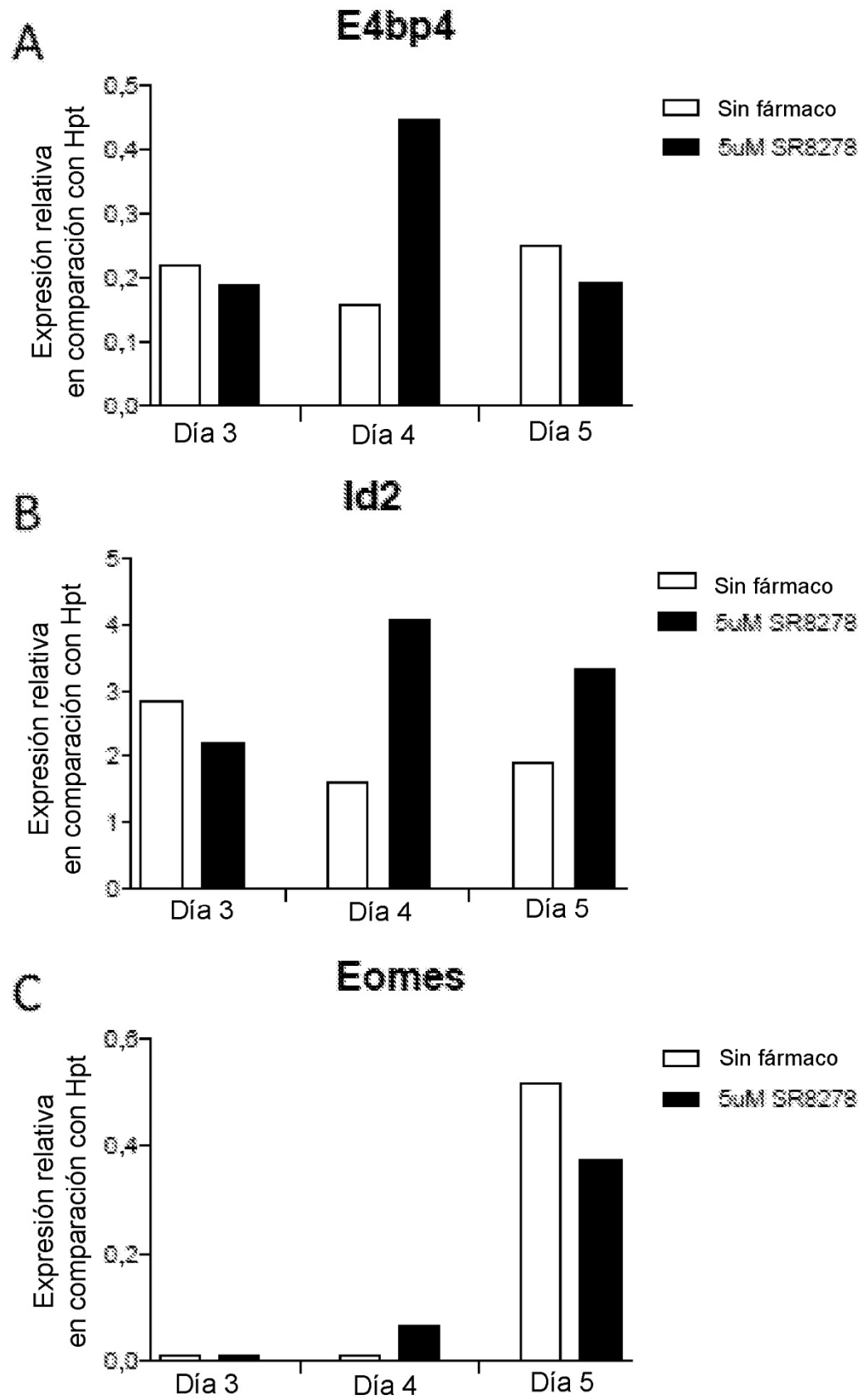


Figura 9

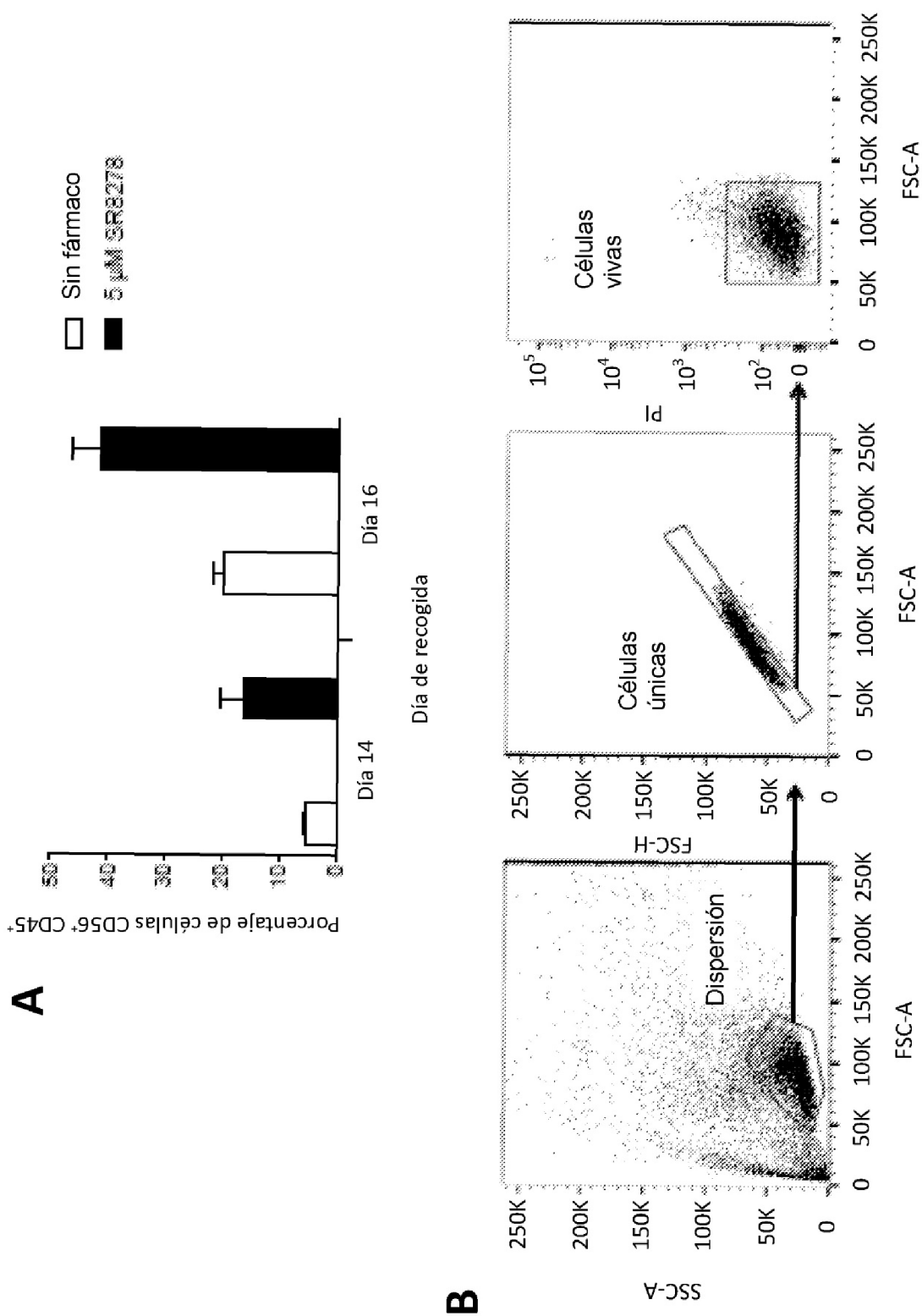


Figura 9 (continuación)

C

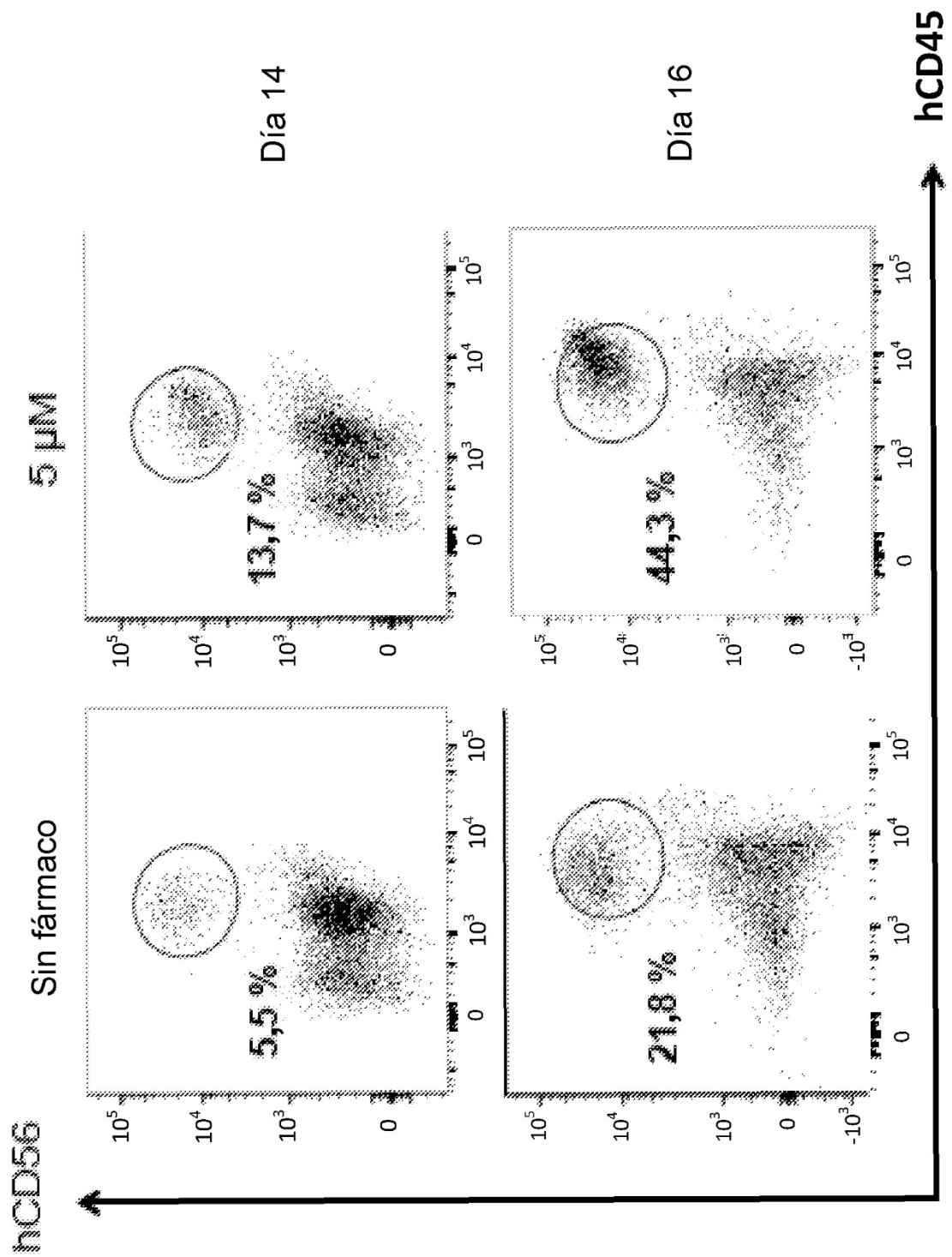
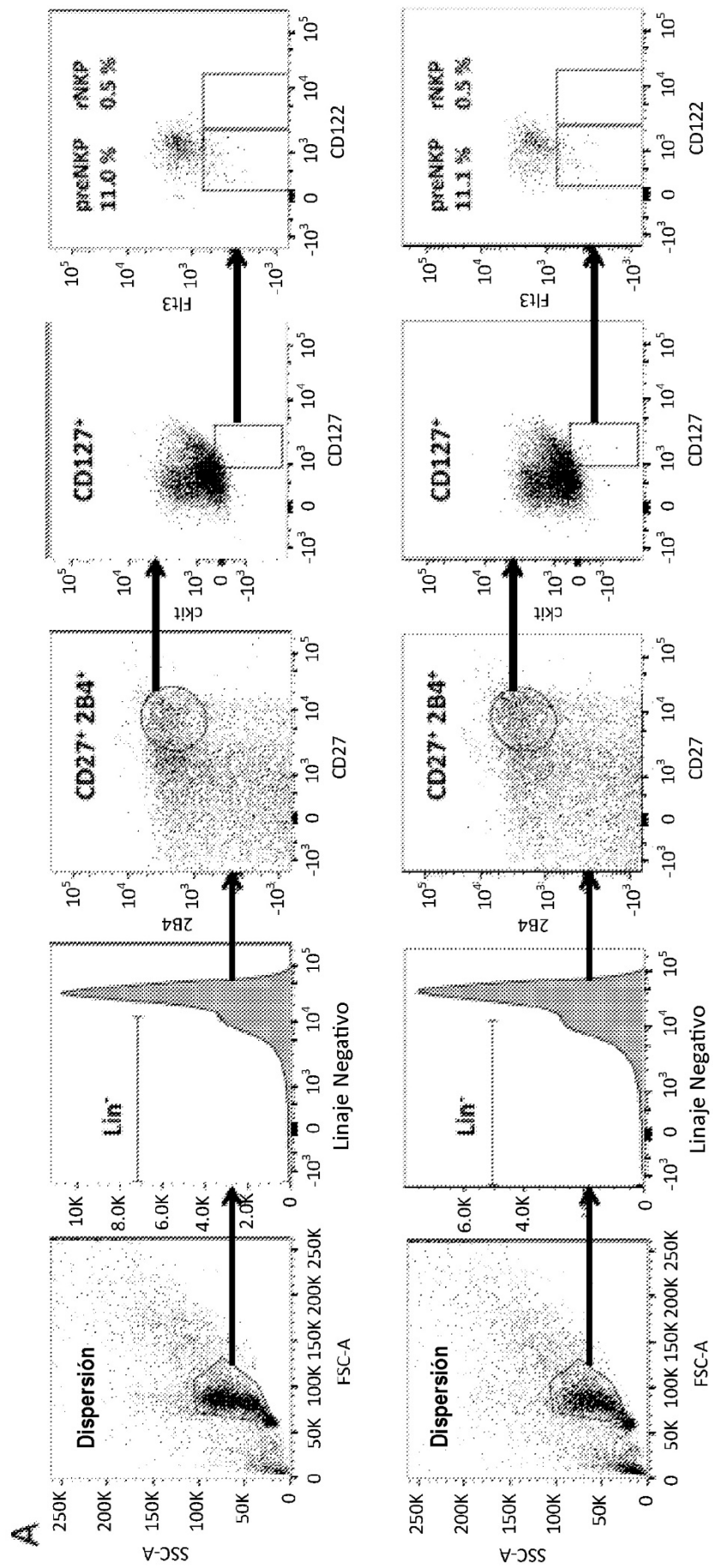


Figura 10



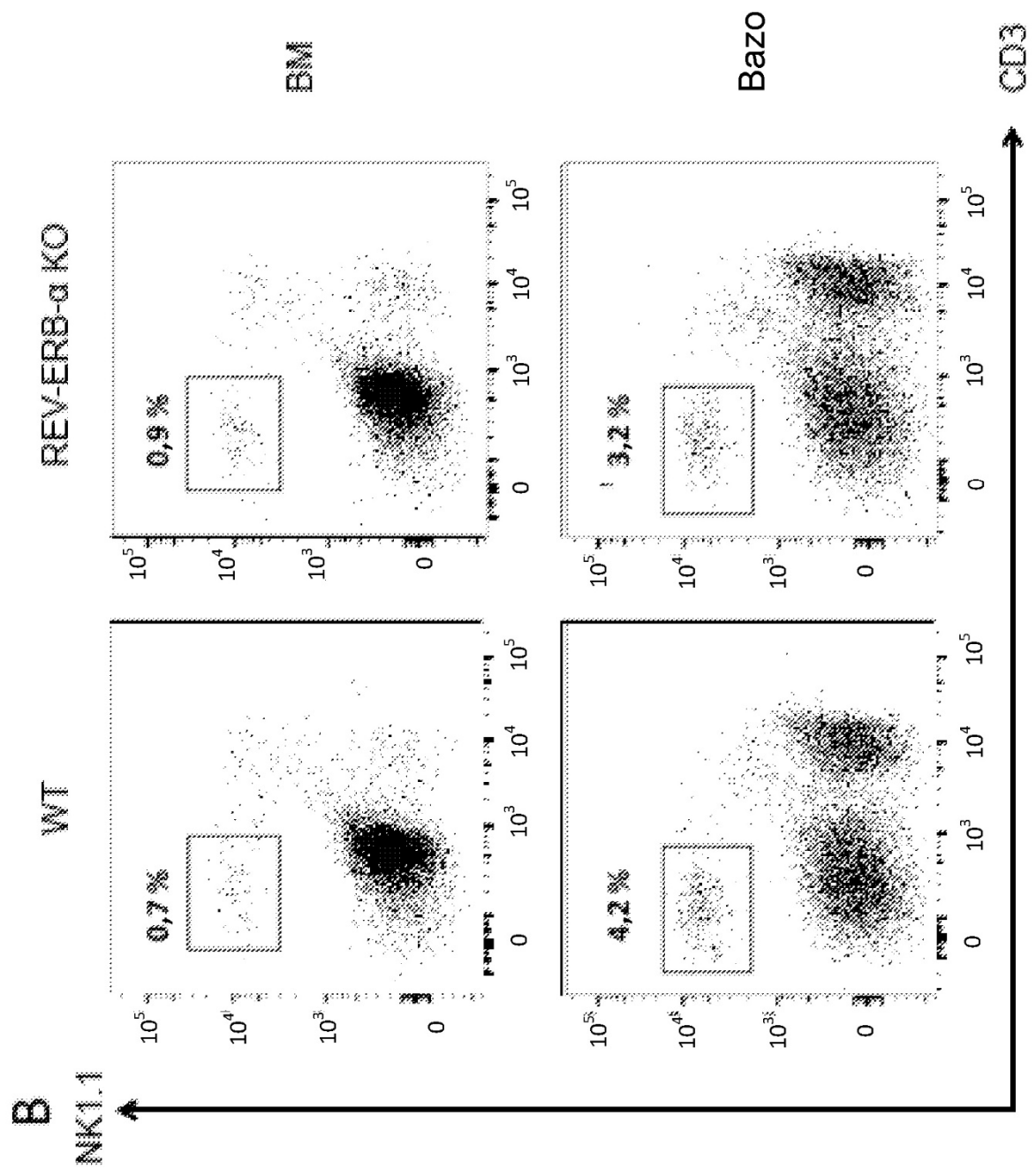
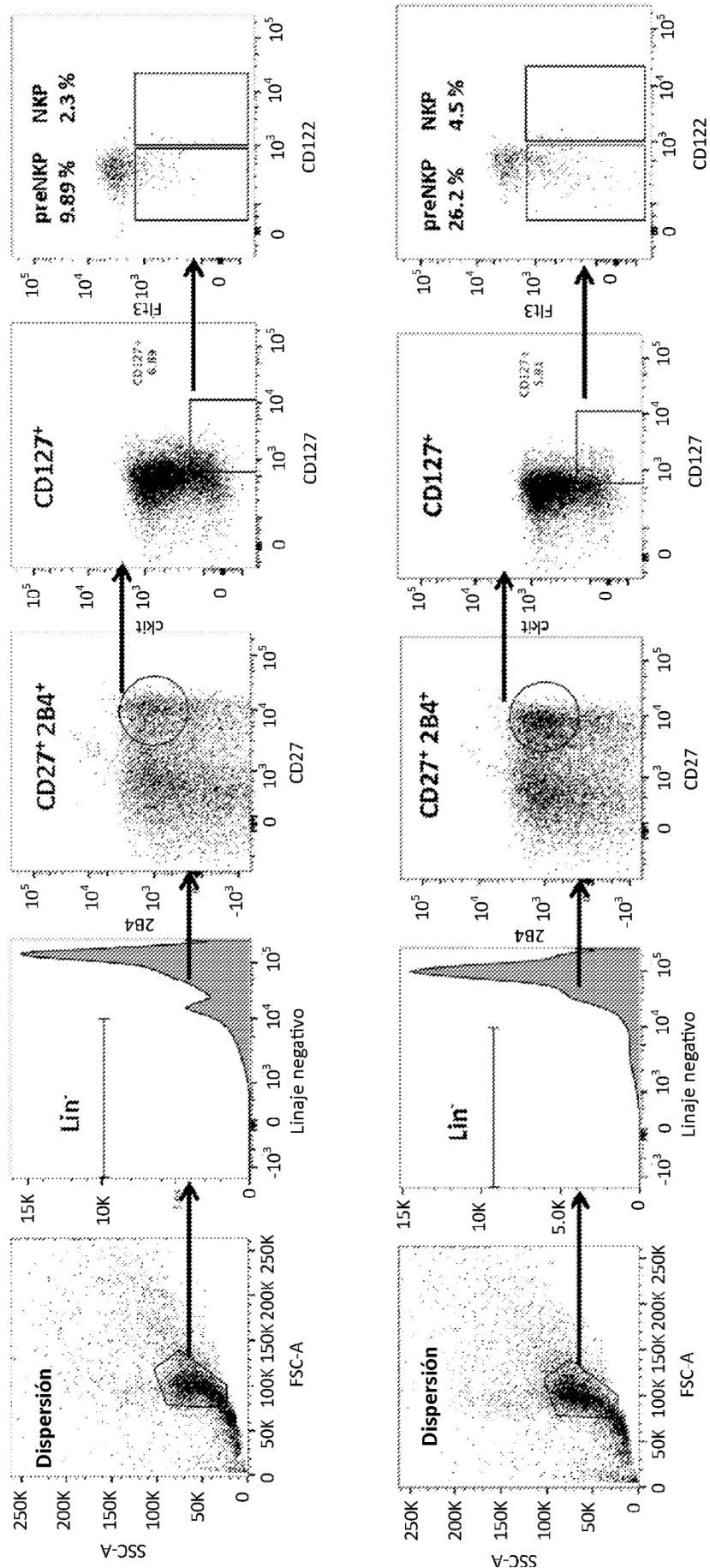


Figura 10 (continuación)

Figura 11

A



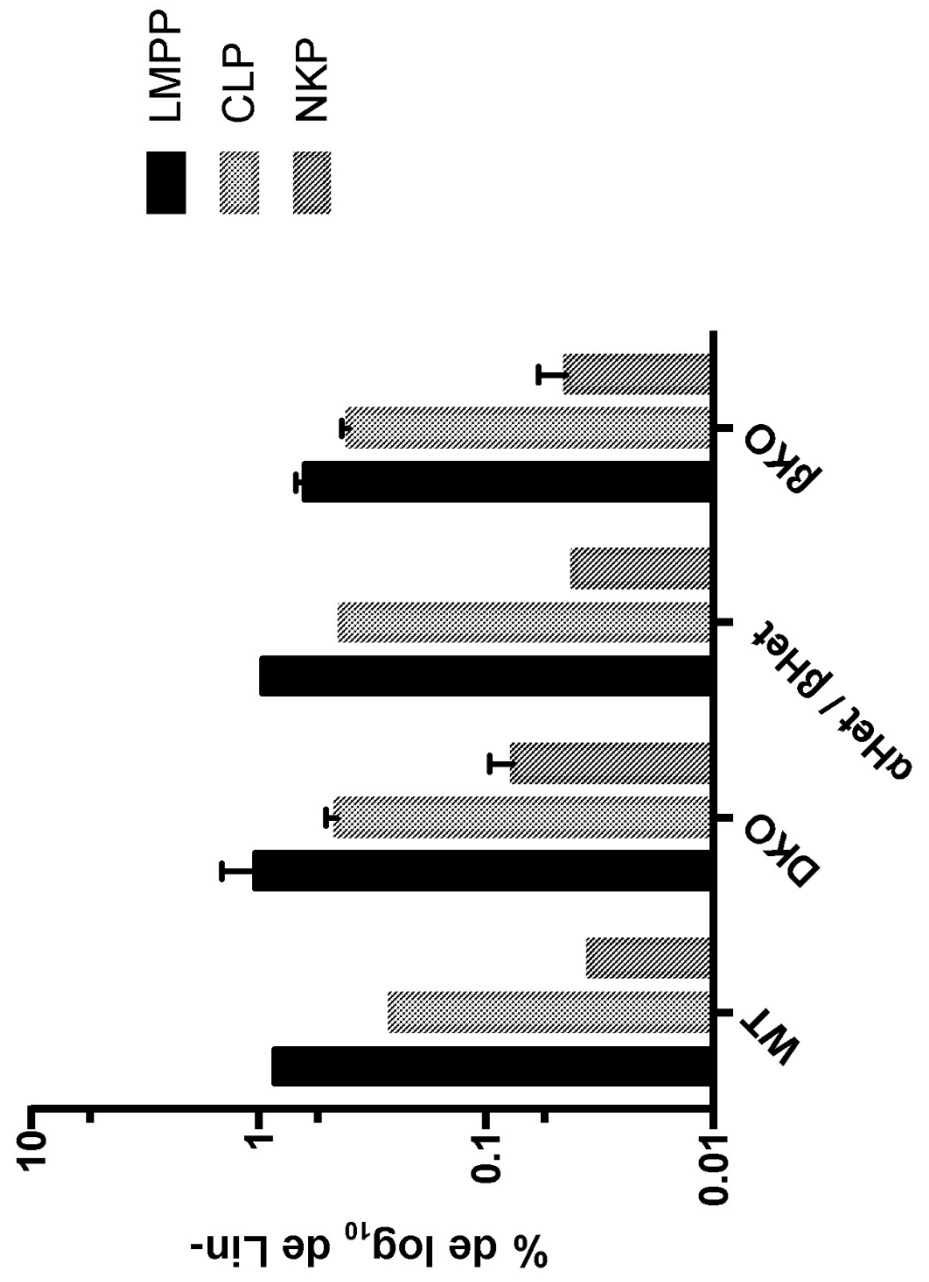


Figura 11 (continuación)

B