

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 776**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2015** **PCT/EP2015/063674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015** **WO15193411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2015** **E 15730150 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3157958**

54 Título: **Células NK-92 que expresan CAR como agentes terapéuticos celulares**

30 Prioridad:

18.06.2014 EP 14173020

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

18.02.2021

73 Titular/es:

**CHEMOTHERAPEUTISCHES
FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS
(50.0%)**

Paul-Ehrlich-Strasse 42-44

60596 Frankfurt, DE y

**DRK-BLUTSPENDEDIENST BADEN-
WÜRTTEMBERG-HESSEN GGMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WELS, WINFRIED;
SCHÖNFELD, KURT;
TONN, TORSTEN;
GREZ, MANUEL y
ZHANG, CONGCONG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 806 776 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células NK-92 que expresan CAR como agentes terapéuticos celulares

La presente invención se refiere a una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 que contiene un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico y dos loci de integración de vectores en su genoma celular.

- 5 La presente invención se refiere además al uso de la célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2. La presente invención se refiere además al uso de la célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 como agente terapéutico celular direccionado y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer. La presente invención se refiere además a un procedimiento para generar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2, así como a un procedimiento para identificar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 y a la célula NK-92 específica de ErbB2 o línea celular obtenida o identificada por los procedimientos, así como sus usos.

Antecedentes de la invención

- 15 Las células asesinas naturales (NK) son un tipo de célula efectora importante para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer. Al igual que las células T, las células NK pueden modificarse para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) para potenciar la actividad antitumoral.

- 20 La aplicación exitosa de células T modificadas con CAR en pacientes con neoplasias positivas para CD19 ha demostrado la potencia de este enfoque para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer (ver, por ejemplo, Grupp et al., 2013), y las células T CAR que se dirigen a una variedad de antígenos tumorales diferentes están bajo desarrollo clínico activo (Kalos et al., 2013). El redireccionamiento mediado por CAR de células asesinas naturales (NK) se ha intentado con menos frecuencia, y hasta ahora no hay datos clínicos disponibles para tal enfoque. Las células NK juegan un papel importante en la inmunovigilancia del cáncer y representan un tipo de célula efectora importante para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer (Geller y Miller, 2011). A diferencia de las células T, no requieren sensibilización previa y reconocimiento de antígenos peptídicos presentados en complejo con moléculas de MHC. En cambio, su citotoxicidad puede desencadenarse rápidamente tras estimulación apropiada a través de receptores de superficie celular codificados por la línea germinal (Koch et al., 2013), que en parte señalan a través de CD3ζ. Por lo tanto, los CAR que contienen CD3ζ se unen fácilmente a las vías de señalización endógena en las células NK y desencadenan actividad citolítica (ver, por ejemplo, Müller et al., 2008). A pesar de estos avances, la experiencia con las células NK manipuladas con CAR y su desarrollo clínico aún es limitada. Debido a los mecanismos de defensa antivirales eficientes, la transferencia de genes a las células NK con vectores retro y lentivirales, así como los procedimientos de transfección física son menos eficientes que en las células T, lo que complica la generación de grandes cantidades de células que expresan CAR (Boissel et al., 2009). Esta restricción se puede superar mediante el empleo de líneas celulares NK clínicamente aplicables como NK-92, que permiten el aislamiento y la expansión de células que expresan CAR de una gran cantidad de células no transducidas (Müller et al., 2008).

- 35 Los estudios de fase I en pacientes con cáncer demostraron la seguridad de la infusión de células NK-92 no modificadas, que se irradiaron antes de la aplicación para evitar el injerto permanente. Por lo tanto, los signos clínicos de actividad solo se observaron en un subconjunto de pacientes (Tonn et al., 2013), probablemente debido a un reconocimiento tumoral insuficiente por las células NK-92 no modificadas que carecen de un receptor tumoral específico.

- 40 Uherek et al. (2002) describen el redireccionamiento de la actividad citolítica de las células asesinas naturales a las células cancerosas que expresan ErbB2, lo que resulta en la destrucción eficiente y selectiva de las células tumorales. Daldrop-Link et al. (2005) describen el marcado de la línea celular NK-92 humana asesina natural (NK) con agentes de contraste a base de óxido de hierro y monitorizan la distribución in vivo de las células NK-92 genéticamente manipuladas, que se dirigen contra los receptores HER2/neu, a tumores mamarios positivos para HER2/neu con resonancia magnética (MR).

- 45 En el documento WO 2012/031744 se divulgan receptores de antígeno quimérico A1 con una región de bisagra optimizada.

- La presente invención tiene como objetivo proporcionar células NK mejoradas por manipulación con CAR, que son adecuadas para uso clínico, en particular en el tratamiento de cánceres y como agentes terapéuticos celulares direccionados.

- 50 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar medios y procedimientos para generar e identificar molecularmente células NK mejoradas por manipulación con CAR.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve como se reivindica en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve mediante una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 que contiene un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende

un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, transmembrana y

5 dominios intracelulares de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3, en el que dicho vector está genómicamente integrado (i) en una región intergénica en el cromosoma 2, y (ii) en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando la célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la invención para su uso en medicina.

10 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando la célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando la célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la invención para su uso como agente terapéutico celular direccionado y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

15 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve mediante un procedimiento para generar una célula o línea celular NK-92 específica para ErbB2, que comprende las etapas de:

(1) proporcionar un lentivector que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3 para transducir células NK-92,

(2) transducir células NK-92 con dicho vector,

20 (3) derivar/generar clones de células individuales mediante dilución limitante;

(4) identificar células que expresan CAR mediante análisis de citometría de flujo con proteína de fusión ErbB2-Fc,

(5) seleccionar clon o clones celulares que muestran una expresión de CAR alta y estable durante el cultivo continuo,

25 (6) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra las células que expresan ErbB2,

(7) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra células negativas para ErbB2,

30 (8) seleccionar clon o clones celulares que muestran una alta citotoxicidad contra células que expresan ErbB2, es decir, citotoxicidad aumentada para células tumorales que expresan ErbB2 en comparación con células NK-92 no modificadas, y citotoxicidad baja o nula contra ErbB2 negativo, es decir, citotoxicidad reducida o nula para las células negativas para ErbB2 que son lisadas por células NK-92 no modificadas, y

(9) determinar el número y posición de la integración vectorial, y seleccionar los clones celulares que exhiben la integración vectorial en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve mediante un procedimiento para identificar una célula o línea celular NK-92 específica para ErbB2, que comprende las etapas de:

35 (i) determinar el número y la posición de integración de vector en la célula (clones), en el que el vector es un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región de bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3; y

40 (ii) seleccionar la célula (clones) que exhibe integración vectorial en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve mediante una célula o línea celular NK-92 obtenida o identificada por los procedimientos de acuerdo con la invención.

45 De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando la célula o línea celular NK-92 obtenida o identificada por los procedimientos de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2.

De acuerdo con la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando la célula o línea celular NK-92 obtenida o identificada por los procedimientos de acuerdo con la invención para su uso como agente terapéutico celular direccionado y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

Antes de que la presente invención se describa con más detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por una persona experimentada en la técnica.

Células NK-92 humanas que expresan CAR clínicamente utilizables

10 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2,

La célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 de la presente invención contiene un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende

un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, transmembrana y

15 dominios intracelulares de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3.

La célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 contiene dos loci de integración vectorial en su genoma celular.

La célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 se caracteriza porque dicho vector está genómicamente integrado (i) en una región intergénica en el cromosoma 2, y (ii) en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

20 La célula o línea celular NK-92 no modificada se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, Gong et al., 1994 o el documento WO 98/49268 A1. Las células NK-92 se depositan con la American Type Tissue Collection (ATCC no. CRL-2407).

- Integración vectorial

La célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 puede caracterizarse molecularmente e identificarse mediante dichas dos integraciones vectoriales.

25 Preferentemente, la célula o línea celular NK-92 de la presente invención se caracteriza porque mediante análisis por PCR del ADN genómico de dicha célula o línea celular se obtiene al menos uno de los siguientes productos de amplificación:

- PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 9;
- 30 • PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 3 y 4 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 10;
- PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 6 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11;
- 35 • PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 7 y 8 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12.

40 Análisis por PCR del ADN genómico de la célula o línea celular de la invención con cebadores oligonucleotídicos que se hibridan a secuencias de ADN genómico y vector adyacentes a sitios de unión 5' y 3' de secuencias cromosómicas e integradas vectoriales (específicamente, los cebadores oligonucleotídicos especificados en las SEQ ID NO. 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8) producen productos de amplificación de longitud y secuencia definidas (específicamente, los fragmentos de PCR especificados en las SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12), confirmando las integraciones vectoriales e identificando molecularmente la célula (clon) NK-92 de la presente invención.

1) Cebadores de oligonucleótidos que se hibridan a secuencias de ADN genómico y de vector adyacentes a sitios de unión 5' y 3' de secuencias cromosómicas y de vector integrado:

a) Integración del vector CAR en el gen TRAF2

45 a-1) parte 5' de la integración vectorial

Cebador TRAF2-F1 de PCR hacia adelante:

CTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO.1]

Cebador CAR-R1 de PCR en reverso (secuencia del vector subrayada)

CCGCTTAATACTGACGCTCTCG [SEQ ID NO. 2]

a-2) parte 3' de la integración vectorial

Cebador CAR-F1 de PCR hacia adelante (secuencia del vector subrayada)

ATCGCCACGGCAGAACTCA [SEQ ID NO. 3]

Cebador TRAF2-R1 de PCR en reverso

5 GACCCTTCACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]

b) Integración vectorial de CAR en la región intergénica del cromosoma 2

b-1) parte 5' de la integración vectorial

Cebador IGCHR2-F1 de PCR hacia adelante

TCAGTGAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]

10 Cebador CAR-R2 de PCR en reverso (secuencia vectorial subrayada)

TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT [SEQ ID NO. 6]

b-2) parte 3' de la integración vectorial

Cebador CAR-F2 de PCR hacia adelante (secuencia vectorial subrayada)

ACTGATAATTCGGTGGTGTGT [SEQ ID NO. 7]

15 Cebador IGCHR2_CAR-R1 de PCR en reverso (secuencia del vector subrayada)

CACTGTGGCTCACTGCTAGA [SEQ ID NO. 8]

2) Productos de amplificación de longitud y secuencia definidas:

a) Producto de amplificación de integración vectorial de CAR en el gen TRAF2

Integración vectorial de CAR en el gen TRAF2

20 parte 5' de integración vectorial

Producto de PCR TRAF2-CAR (5') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores: TRAF2-F1 (SEQ ID NO. 1), CAR-R1 (SEQ ID NO. 2)

letras minúsculas: gen TRAF2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

25 Longitud: 587 nucleótidos

SEQ ID NO. 9

```

cttcagcagggaccagaaacaaaactcacactctttcttctctgagttga      50
gactggaaaaatgaaagattgttttaggggaaacttgagggaacagtctg      100
ggcagcctgcagggcatggccctgttccctccagggctgggaaagtcagca      150
ctgctttctggtggcgaACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACA      200
AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG      250
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA      300
AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTC      350
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA      400
GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC      450
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAG      500
GGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGA CTAGCGGAGGCTAGAA      550
GGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGG                    587
    
```

b) Producto de amplificación de integración vectorial de CAR en el gen TRAF2

Integración vectorial de CAR en el gen TRAF2

parte 3' de integración vectorial

5 Producto de PCR CAR-TRAF2 (3') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores: CAR-F1 (SEQ ID NO. 3), TRAF2-R1 (SEQ ID NO. 4)

letras minúsculas: gen TRAF2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud: 503 nucleótidos

SEQ ID NO. 10

```

ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG      50
GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGCGAATTCGATAC      100
TCGAGGTCGAGGCAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA      150
AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA      200
GGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGG      250
GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG      300
GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTA      350
GTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC      400
CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAccttccctctgcagctgctgg      450
ctcagccgattgtatatgctgggagctctgcactaagcggttggtgaagg      500
gtc                                                            503
    
```

10

c) Producto de amplificación de integración vectorial de CAR en región intergénica del cromosoma 2

Integración vectorial de CAR en región intergénica del cromosoma 2

parte 5' de integración vectorial

Producto de PCR IGCHR2-CAR (5') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores: IGCHR2-F1 (SEQ ID NO. 5), CAR-R2 (SEQ ID NO. 6)

letras minúsculas: región intergénica del cromosoma 2

5

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud: 679 nucleótidos

SEQ ID NO. 11

```
tcagtggaatgggcagcttcaagttgatgtcatttcaatagtaacttatt 50
tcagtctacatacttcccaagaatgcaccatctcttttttatgtatttat 100
tatttttgagaaagagtgctcactctgtcgccaggtggagtgcattggca 150
tgatcttggtcactgtaacctccgtctcctgggttcaagccattctcct 200
gtctcagcctcccggttagtggggttataggcacacaccaccacgcccgg 250
ctaatttttgtatttttagtaaagatgggggtttcaccatggttgccaggc 300
tgggctcaaactcttgacttcaggtgatccgcccaccttggcctcccaaa 350
gtgctgggatgacaggcACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACA 400
AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG 450
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA 500
AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTC 550
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA 600
GCAGTGCGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC 650
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAA 679
```

d) Producto de amplificación de integración vectorial de CAR en región intergénica del cromosoma 2

10

Integración vectorial de CAR en región intergénica del cromosoma 2

parte 3' de integración vectorial

Producto de PCR CAR-IGCHR2 (3') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores: CAR-F2 (SEQ ID NO. 7), IGCHR2_CAR-R1 (SEQ ID NO. 8)

letras minúsculas: región intergénica del cromosoma 2

15

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud: 376 nucleótidos

SEQ ID NO. 12

ACTGATAATTCCGTGGTGTGTCGAATTCGATACTCGAGGTCGAGGCAAT	50
TCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCT	100
TAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCC	150
AACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC	200
CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAA	250
GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGT	300
TGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG	350
AAAATCTCTAGCAgtgagccacagt	376

- Citotoxicidad natural reducida y citotoxicidad específica alta

Preferiblemente, la célula o línea celular NK-92 de la presente invención se caracteriza porque:

- la célula o línea celular NK-92 muestra una citotoxicidad natural reducida o nula, es decir, citotoxicidad reducida o nula a las células negativas para ErbB2 que son lisadas por células NK-92 no modificadas,

y

- la célula o línea celular NK-92 muestra una citotoxicidad específica aumentada, es decir, citotoxicidad aumentada a células tumorales que expresan ErbB2 en comparación con las células NK-92 no modificadas.

Dicha citotoxicidad natural reducida constituye una característica de seguridad importante de la célula o línea celular de la invención, en particular en vista de un uso clínico.

La célula o línea celular NK-92 de la presente invención, en contraste con células NK-92 no modificadas, lisan las células tumorales que expresan ErbB2 con alta eficiencia, pero son menos propensas que las células NK-92 no modificadas a atacar células no diana negativas a ErbB2.

- Otras características

En una realización, el fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 13 (scFv FRP5) y/o está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 14.

El scFv FRP5 específico de ErbB2 se describe adicionalmente en los documentos EP 2 164 516 B1 y US 7,887,801 B2.

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son conocidos en la técnica. El CAR específico de ErbB2 usado en la presente invención comprende:

- (i) un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2,
- (ii) una región bisagra,
- (iii) dominios transmembrana e intracelular de CD28, y dominio intracelular de zeta-CD3.

En una realización, el receptor de antígeno quimérico (CAR) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15 y/o está codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 16.

Los CAR adecuados se describen adicionalmente en el documento WO 2012/031744.

Por ejemplo, el plásmido de transferencia lentiviral pS-5.28.z-W que codifica bajo el control transcripcional del promotor del virus formador de foco del bazo (SFFV) el receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste en un péptido señal de cadena pesada de inmunoglobulina, el fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2 (FRP5), una región bisagra (CD8α), seguida de dominios transmembrana e intracelular de CD28 y el dominio intracelular de CD3ζ. La secuencia de codificación CAR está flanqueada por repeticiones largas en terminales 5' y 3' (LTR) del vector.

Las células asesinas naturales (NK) son un tipo de célula efectora importante para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer. Al igual que las células T, las células NK pueden modificarse para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) para potenciar la actividad antitumoral, pero la experiencia con las células NK manipuladas con

CAR es limitada y faltan datos sobre el desarrollo clínico. Aquí, los inventores redirigieron las células NK-92 humanas clínicamente utilizables al antígeno ErbB2 (HER2) asociado al tumor expresado a niveles elevados por muchos cánceres de origen epitelial.

5 Siguiendo los procesos compatibles con GMP, los inventores generaron un clon de célula única NK-92/5.28.z que expresa un CAR específico de ErbB2 con dominios de señalización CD28 y CD3ζ.

10 Las integraciones vectoriales en el clon celular NK-92/5.28.z se mapearon por PCR mediada por amplificación lineal y secuenciación de ADN siguiendo procesos establecidos (Schmidt et al., 2003), que revelaron una integración de vectores en una región intergénica en el cromosoma 2, y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9. Como se discutió anteriormente, el análisis de PCR del ADN genómico con cebadores oligonucleotídicos que se hibridan a secuencias de ADN genómico y vector adyacentes a sitios de unión 5' y 3' de secuencias cromosómicas e integradas de vectores (por ejemplo, los cebadores oligonucleotídicos especificados en las SEQ ID NO. 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8) producen productos de amplificación de longitud y secuencia definidas (por ejemplo, los fragmentos de PCR especificados en las SEQ ID NO. 9, 10, 11, 12), confirmando las integraciones vectoriales e identificando molecularmente el clon celular NK-92/5.28.z.

15 Las células NK-92/5.28.z lisaron eficientemente células tumorales que expresan ErbB2 y de otro modo resistentes a NK in vitro, pero no lisaron las células negativas para ErbB2 resistentes a NK-92 no modificado. Inesperadamente, las células NK-92/5.28.z también mostraron citotoxicidad reducida para las células negativas para ErbB2 que se lisan fácilmente mediante células NK-92 no modificadas. Esto constituye una característica de seguridad importante de las células NK-92/5.28.z que, en contraste con las células NK-92 no modificadas, lisan las células tumorales que expresan ErbB2 con alta eficiencia, pero son menos propensas que las células NK-92 no modificadas a atacar a células no diana ErbB2 negativas. El reconocimiento específico de las células tumorales y la actividad antitumoral se mantuvieron in vivo, lo que resultó en el autoguiado de las células NK-92/5.28.z a xenoinjertos de carcinoma de mama ortotópico y reducción de metástasis pulmonar de células de carcinoma de células renales. La irradiación-y como posible medida de seguridad para aplicación clínica evitó la replicación de las células, mientras que se preservaba la actividad antitumoral in vitro e in vivo.

Una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 particularmente preferida de la invención es la célula o línea celular NK-92 identificada como NK-92/5.28.z que se depositó el 11 de junio de 2014 en el Instituto Leibniz DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, bajo el número de acceso DSM ACC3244.

30 La presente invención demuestra que es factible manipular células NK que expresan CAR como un agente terapéutico celular clonal, molecular y funcionalmente bien definido y continuamente expandible, y sugieren células NK-92/5.28.z como un candidato prometedor para desarrollo clínico.

Usos médicos

35 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona la célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2 de acuerdo con la invención para su uso en medicina.

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona la célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2.

Preferentemente, el cáncer, preferentemente los cánceres que expresan ErbB2, se seleccionan de

- 40
- cáncer de mama,
 - cáncer de ovarios,
 - cáncer gástrico,
 - cáncer de próstata,
 - carcinoma de células escamosas,
- 45
- cáncer de cabeza y cuello,
 - cáncer de colon,
 - cáncer de páncreas,
 - cáncer uterino,
 - cáncer de células renales,
- 50
- glioblastoma,

- meduloblastoma,
- sarcoma
- cáncer de pulmón.

En una realización preferida, las células son pretratadas por irradiación, preferiblemente por irradiación-γ.

5 Dicha irradiación puede incluirse como una medida de seguridad.

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona la célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la invención para su uso como agente terapéutico celular direccionado y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

10 Un "agente terapéutico celular", en particular un "agente terapéutico celular direccionado" o "agente terapéutico celular alogénico direccionado" se refiere a una célula inmunitaria adecuada para la aplicación para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer, que se modifica genéticamente para expresar un receptor de antígeno que reconoce específicamente un antígeno definido expresado en la superficie de una célula tumoral diana.

15 "Inmunoterapia adoptiva específica de células diana" o "inmunoterapia adoptiva contra el cáncer" o "terapia celular adoptiva (ACT)" se refiere a una forma de terapia en la que las células inmunes se transfieren a huéspedes portadores de tumores. Las células inmunes tienen reactividad antitumoral y pueden mediar efectos antitumorales directos o indirectos.

La manipulación genética de células NK-92 con CAR, como la proporcionada por esta invención, es muy adecuada para ACT y el tratamiento contra el cáncer.

20 Preferentemente, el uso comprende un pretratamiento de las células mediante irradiación, preferentemente irradiación-γ.

Dicha irradiación puede incluirse como una medida de seguridad.

Procedimiento para generar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para generar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2.

25 Dichos procedimientos permiten además identificar molecularmente la célula o línea celular NK-92 generada específica de ErbB2.

Dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (1) proporcionar un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 para transducir células NK-92,
- (2) transducir células NK-92 con dicho vector,
- (3) derivar/generar clones de células individuales mediante dilución limitante;
- (4) identificar células que expresan CAR mediante análisis de citometría de flujo con proteína de fusión ErbB2-Fc,
- 35 (5) seleccionar clon o clones celulares que muestran una expresión de CAR alta y estable durante el cultivo continuo,
- (6) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra las células que expresan ErbB2,
- (7) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra células negativas para ErbB2,
- (8) seleccionar clon o clones celulares que muestran una alta citotoxicidad contra las células que expresan ErbB2, es decir, citotoxicidad aumentada para las células tumorales que expresan ErbB2 en comparación con las células NK-92 no modificadas, y una citotoxicidad baja o nula contra ErbB2 negativo, es decir, citotoxicidad reducida o nula para células ErbB2 negativas que son lisadas por células NK-92 no modificadas, y
- 40 (9) determinar el número y posición de la integración vectorial, y seleccionar los clones celulares que exhiben la integración del vector en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

45

El vector para transducir células NK-92 de la etapa (1) es un vector integrante, específicamente, un vector lentiviral.

Un ejemplo para un vector lentiviral adecuado es el vector de plásmido de transferencia lentiviral pHRSIN-cPPT-WPREmut (Schambach et al., 2006).

Las personas experimentadas en la técnica conocen otros vectores lentivirales adecuados.

50 El vector lentiviral codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende

un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2,
una región bisagra,
dominios transmembrana e intracelular de CD28,
y dominio intracelular de zeta-CD3.

5 El vector lentiviral se puede generar siguiendo una metodología establecida conocida por una persona experimentada.

Un ejemplo adecuado para un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2 es scFv FRP5.

10 Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 13 (scFv FRP5) y/o está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 14.

El scFv FRP5 específico de ErbB2 se describe adicionalmente en los documentos EP 2 164 516 B1 y US 7,887,801 B2.

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son conocidos en la técnica. El CAR específico de ErbB2 usado en la presente invención comprende:

- 15 (i) un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2,
(ii) una región bisagra,
(iii) dominios transmembrana e intracelular de CD28, y dominio intracelular de zeta-CD3.

En una realización, el receptor de antígeno quimérico (CAR) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15 y/o está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 16.

20 Se conocen más ejemplos adecuados para receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, tal como se describe en el documento WO 2012/031744.

La etapa (1) comprende preferiblemente producir partículas de vector lentiviral pseudotipificadas VSV-G.

La etapa (2) se lleva a cabo preferiblemente siguiendo procesos que cumplen con GMP.

Las células NK-92 de la etapa (2) son preferiblemente células NK-92 humanas.

25 La etapa (5) comprende preferiblemente seleccionar clon o clones celulares que muestran una expresión de CAR alta y estable durante el cultivo continuo.

Las etapas (6) y (7) comprenden ensayos de citotoxicidad in vitro, tales como ensayos en base a FACS, preferiblemente que se llevan a cabo en diferentes proporciones de efector a diana (E/T).

30 Las células que expresan ErbB2 adecuadas son células tumorales que expresan ErbB2, tales como células de carcinoma de células renales murinas que expresan establemente ErbB2 humano (Renca-lacZ/ErbB2) o células de carcinoma de mama humano MDA-MB453 (ATCC no. HTB-131).

Dichas células negativas para ErbB2 se usan para evaluar o probar la citotoxicidad específica de los clones celulares.

35 Las células negativas para ErbB2 adecuadas son células sensibles a NK pero negativas para ErbB2, tales como células de eritroleucemia K562 humana (ATCC no. CCL-243).

Dichas células negativas para ErbB2 se usan para evaluar o probar la citotoxicidad natural/endógena, la citotoxicidad independiente de CAR de los clones celulares.

40 Los ensayos de citotoxicidad en la etapa (6) y/o (7) también se llevan a cabo preferiblemente con células NK-92 no modificadas (ATCC no. CRL-2407) y los resultados se comparan con los resultados de los clones celulares probados.

En la etapa (8), se seleccionan los clones celulares que muestran una alta citotoxicidad contra las células que expresan ErbB2 y citotoxicidad baja o nula contra las células negativas para ErbB2.

45 La etapa (9) comprende preferiblemente determinar el número y posición de la integración vectorial por PCR mediada por amplificación lineal (LAM-PCR) y secuenciación de ADN, y confirmación por análisis de PCR del ADN genómico.

Los cebadores adecuados para el análisis por PCR de ADN genómico y sus respectivos productos de amplificación son, por ejemplo (en una realización con un vector lentiviral):

Sitio de integración de vectores: integración vectorial CAR en el gen TRAF2

	Cebador hacia adelante	Cebador en reverso	Producto de amplificación
parte 5'	TRAF2-F1: CTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO.1]	CAR-R1: CCGCTTAATACTGACGCTCTCG[SEQ ID NO. 2]	TRAF2-CAR (5') 587 bp [SEQ ID NO. 9]
parte 3'	CAR-F1: ATCGCCACGGCAGAACTCA[SEQ ID NO. 3]	TRAF2-R1: GACCCTTCACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]	CAR-TRAF2 (3') 503 bp [SEQ ID NO. 10]

5 Sitio de integración vectorial: integración vectorial CAR en la región intergénica del cromosoma 2:

	Cebador hacia adelante	Cebador en reverso	Producto de amplificación
parte 5'	IGCHR2-F1: TCAGTGGGAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]	CAR-R2: TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT [SEQ ID NO. 6]	IGCHR2-CAR (5') 679 bp [SEQ ID NO. 11]
parte 3'	CAR-F2: ACTGATAATTCGGTGGTGTGT[SEQ ID NO. 7]	IGCHR2_ CAR-R1: CACTGTGGCTCACTGCTAGA[SEQ ID NO. 8]	IGCHR2-CAR (3') 376 [SEQ ID NO. 12]

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una célula o línea celular NK-92 obtenida por el procedimiento de acuerdo con la invención.

Procedimiento para identificar una célula o línea celular NK-92 específica para ErbB2

10 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar una célula o línea celular NK-92 específica para ErbB2.

Dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 15 (i) determinar el número y posición de la integración vectorial en la célula (clones), en el que el vector es un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento de anticuerpo scFv específico para ErbB2, una región de bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3; y
- (ii) seleccionar la célula (clones) que exhibe la integración vectorial en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.

20 Como se discutió anteriormente, el procedimiento comprende preferiblemente determinar el número y posición de la integración vectorial por PCR mediada por amplificación lineal (LAM-PCR) y secuenciación de ADN, y confirmación por análisis de PCR del ADN genómico.

Los cebadores adecuados para el análisis por PCR de ADN genómico y sus respectivos productos de amplificación son, por ejemplo (en una realización con un vector lentiviral), como se describió anteriormente.

Como se describe anteriormente en la presente memoria, preferiblemente, la célula (clon) se caracteriza porque mediante análisis por PCR del ADN genómico de dicha célula (clon) se obtiene al menos uno de los siguientes productos de amplificación:

- 5 -PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2 producen un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 9;
- PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 3 y 4 producen un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 10;
- PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 6 producen un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11;
- 10 -PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 7 y 8 producen un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12.

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una célula o línea celular NK-92 identificada por el procedimiento de acuerdo con la invención.

- 15 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona la célula o línea celular NK-92 obtenida o identificada por los procedimientos de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferentemente cánceres que expresan ErbB2.

Preferentemente, el cáncer, preferentemente los cánceres que expresan ErbB2, se seleccionan de:

- 20 • cáncer de mama,
• cáncer de ovarios,
• cáncer gástrico,
• cáncer de próstata,
• carcinoma de células escamosas,
• cáncer de cabeza y cuello,
• cáncer de colon,
25 • cáncer de páncreas,
• cáncer uterino,
• cáncer de células renales,
• glioblastoma,
• meduloblastoma,
30 • sarcoma, y
• cáncer de pulmón.

En una realización preferida, las células son pretratadas por irradiación, preferiblemente por irradiación-γ.

Dicha irradiación puede incluirse como una medida de seguridad.

- 35 Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona la célula o línea celular NK-92 obtenida o identificada por los procedimientos de acuerdo con la invención para su uso como agente terapéutico celular direccionado (aloténico) y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

Preferentemente, el uso comprende un pretratamiento de las células mediante irradiación, preferentemente irradiación-γ.

Dicha irradiación puede incluirse como una medida de seguridad.

40 Procedimientos de prevención y/o tratamiento

La divulgación también describe un procedimiento para la prevención y/o tratamiento contra el cáncer (en la presente memoria después del "procedimiento de tratamiento").

El cáncer puede ser cánceres que expresan ErbB2, tales como:

- 45 • cáncer de mama,
• cáncer de ovarios,
• cáncer gástrico,
• cáncer de próstata,
• carcinoma de células escamosas,
• cáncer de cabeza y cuello,

- cáncer de colon,
- cáncer de páncreas,
- cáncer uterino,
- cáncer de células renales,

- 5 • glioblastoma,
- meduloblastoma,
- sarcoma, y
- cáncer de pulmón.

Dicho procedimiento de tratamiento puede comprender o incluir inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

- 10 Dicho procedimiento de tratamiento puede comprender

administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva

(a) células NK-92 de acuerdo con la presente invención o células NK-92 obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención, y

(b) opcionalmente, excipiente o excipientes respectivos.

- 15 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de las células NK-92 se refiere a la cantidad que es suficiente para tratar la enfermedad respectiva (cáncer) o lograr el resultado respectivo de la inmunoterapia adoptiva específica de células diana.

Realización preferida

- 20 De acuerdo con la presente invención, las células NK-92 manipuladas con CAR se desarrollaron como un agente terapéutico de células alogénicas direccionadas. Aquí, describimos la generación y la caracterización molecular y funcional de una línea celular NK-92 específica de ErbB2 clonal adecuada para aplicaciones clínicas. Estas células NK-92/5.28.z se derivaron de un clon de células individuales después de la transducción lentiviral con un vector que codifica un CAR de segunda generación que tiene como objetivo la tirosina quinasa del receptor ErbB2 (HER2), un autoantígeno asociado a tumores expresado a niveles elevados por muchos cánceres humanos de origen epitelial (Hynes y Lane, 2005).

Siguiendo los procesos compatibles con GMP, generamos un clon de célula individual NK-92/5.28.z que expresa un CAR específico de ErbB2 con dominios de señalización CD28 y CD3ζ. Las integraciones de los vectores se mapearon por PCR mediada por amplificación lineal y secuenciación de ADN. Se evaluó el autoguiado tumoral in vivo y la actividad antimetastásica en modelos de ratón NOD-SCID IL2R^γ nulo (NSG).

- 30 Las células NK-92/5.28.z específicas de ErbB2 lisaron eficazmente células tumorales que expresan ErbB2 in vitro que eran resistentes a las células NK-92 no modificadas. De manera importante, el reconocimiento específico de las células tumorales positivas para ErbB2 y la actividad antitumoral se mantuvieron in vivo, lo que resultó en el autoguiado de las células NK-92/5.28.z a xenoinjertos de carcinoma de mama ortotópico y la reducción de metástasis pulmonar de células de carcinoma de células renales en modelos murinos.

- 35 Los datos que se muestran en la presente solicitud demuestran el direccionamiento exitoso de células NK-92 humanas al antígeno de superficie celular ErbB2 asociado a tumor mediante la expresión de una CAR de segunda generación humanizada y optimizada por codones. Siguiendo los procedimientos compatibles con GMP, establecimos a partir de un clon de células individuales molecularmente definido, una línea celular modificada con CAR que se expande continuamente, adecuada para el desarrollo clínico. Estas células NK-92/5.28.z muestran una expresión de CAR estable tras cultivo prolongado y citotoxicidad específica de antígeno diana in vitro e in vivo. La posibilidad de caracterizar completamente este clon celular a nivel molecular y celular agrega un importante grado de seguridad para la aplicación clínica del clon, en contraste con la composición heterogénea de las células NK y T primarias modificadas por CAR, en las que no es posible un análisis molecular exhaustivo.

- 45 En ratones, células NK-92/5.28.z marcadas con fluorocromo se enriquecieron selectivamente en xenoinjertos de carcinoma de mama ortotópico positivo para ErbB2 dentro de las 24 horas posteriores a inyección intravenosa, mientras que células NK-92 no modificadas no se acumularon en tumores. Esto demuestra que las células NK-92/5.28.z retienen la especificidad de la célula diana in vivo y son capaces de penetrar tejidos y autoguiarse a sitios tumorales distantes. En un modelo experimental de metástasis en base a células de carcinoma de células renales que expresan ErbB2, la inyección intravenosa de células NK-92/5.28.z redujo la formación de metástasis en diferentes experimentos en un 50 % o más, mientras que células NK-92 no modificadas no pudieron afectar el

crecimiento de nódulos tumorales pulmonares. De manera importante, la actividad antitumoral in vivo de células NK-92/5.28.z irradiadas con 10 Gy fue la misma que la de las células no irradiadas. Esto puede ser relevante para la aplicación clínica futura de NK-92/5.28.z, donde la irradiación de células puede incluirse como una medida de seguridad como se hizo previamente en ensayos clínicos de fase I con células NK-92 no modificadas (Arai et al. 2008; Tonn et al., 2013).

Las células inmunes en pacientes con tumor a menudo están funcionalmente comprometidas debido a la actividad inmunosupresora del cáncer. Por lo tanto, para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer con células NK, se prefieren células alogénicas derivadas de donantes, ya que no reconocen las células tumorales como "propias", evitando así las señales inhibitorias (Geller y Miller, 2011). Hemos demostrado que esta ventaja puede extenderse a las células NK-92 manipuladas con CAR.

Nuestros datos demuestran que es factible desarrollar células NK-92 manipuladas por CAR de una manera similar a un agente terapéutico celular obtenible externamente clonal, molecular y funcionalmente bien definido y continuamente expandible con actividad antitumoral selectiva y notablemente potenciada in vitro e in vivo. Dichas células son clínicamente útiles para el tratamiento de diversos tumores malignos positivos para ErbB2. Por lo tanto, la potente actividad antitumoral, la disponibilidad inmediata como un producto celular completamente caracterizable y la falta de riesgos obvios de fallas de fabricación hacen de estas células una alternativa válida y rentable a las células T de pacientes modificadas con CAR.

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitarla, sin embargo, a la misma.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Expresión del receptor de antígeno quimérico y citotoxicidad selectiva de células clonales NK-92/5.28.z.

A) Representación esquemática del plásmido de transferencia lentiviral pS-5.28.z-W que codifica bajo el control transcripcional del promotor del virus formador de foco del bazo (SFFV), el receptor de antígeno quimérico (CAR) 5.28.z. El CAR 5.28.z consiste en un péptido señal de cadena pesada (SP) de inmunoglobulina, el fragmento de anticuerpo scFv (FRP5) específico de ErbB2 (scFv), una región bisagra (CD8 α), seguido de dominios transmembrana e intracelular de CD28 y el dominio intracelular de CD3 ζ . La secuencia de codificación de CAR está flanqueada por repeticiones largas en terminales 5' y 3' (LTR) del vector (no mostrado).

B) La expresión de CAR por la línea celular clonal NK-92/5.28.z generada bajo condiciones GMP por transducción con el vector lentiviral S-5.28.z-W se determinó por citometría de flujo con proteína de fusión ErbB2-Fc (área abierta). Las células NK-92 no modificadas sirvieron como control (área gris).

C) Se investigó la destrucción celular específica por células NK-92/5.28.z (círculos rellenos) en ensayos de citotoxicidad en base a FACS en diferentes proporciones de efector a objetivo (E/T) usando células de carcinoma de células renales murinas como dianas que expresan establemente ErbB2 humano (Renca-lacZ/ErbB2) o EGFR humano (Renca-lacZ/EGFR) como un control. Las células NK-92 no modificadas se incluyeron para comparación (círculos abiertos).

D) Se investigó la citotoxicidad natural de las células NK-92/5.28.z contra dianas sensibles a NK pero negativas a ErbB2 en comparación con células NK-92 no modificadas utilizando células de eritroleucemia K562 humanas como dianas.

Figura 2. Caracterización molecular de células clonales NK-92/5.28.z.

A) Representación esquemática de los sitios de integración del vector CAR lentiviral S-5.28.z-W (recuadro sombreado) flanqueado por secuencias de repeticiones largas en terminales (LTR) 5' y 3' (recuadros rellenos) en ADN genómico (recuadros abiertos). Se indica la estrategia de PCR para mapear los sitios de integración en el gen TRAF2 en el cromosoma 9 y en una región intergénica en el cromosoma 2. **B-C)** Análisis de PCR de integraciones vectoriales.

B) Se amplificaron secuencias de ADN específicas que abarcan las uniones entre el gen TRAF2 y el extremo 5' del vector CAR integrado (TRAF2-CAR), y entre el extremo 3' del vector CAR integrado y el gen TRAF2 (CAR-TRAF2) por PCR con ADN genómico de 3 pasajes diferentes de células NK-92/5.28.z como plantilla y los pares de cebadores de oligonucleótidos indicados, produciendo productos de amplificación característicos de 587 y 503 bp. El ADN genómico de células NK-92 no modificadas, así como las muestras sin ADN de plantilla (H₂O) se incluyeron como controles.

C) Del mismo modo, las secuencias de ADN específicas que abarcan las uniones entre la región intergénica en el cromosoma 2 y los extremos 5' (IGCHR2-CAR) y 3' (CAR-IGCHR2) del vector CAR integrado se amplificaron, produciendo productos de amplificación de 679 y 376 bp característicos. M: marcador de ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

Figura 3. Crecimiento y actividad citotóxica de las células NK-92/5.28.z tras la irradiación-γ.

A) Para investigar el efecto sobre la viabilidad, se irradiaron células NK-92/5.28.z con 5 o 10 Gy y se cultivaron durante hasta 72 horas. La proliferación se analizó contando células viables en los puntos de tiempo indicados usando exclusión con azul tripán.

B) La actividad citotóxica de las células NK-92/5.28.z 24 horas después de la irradiación con 10 Gy contra células de carcinoma de mama MDA-MB453 positivas para ErbB2 y MDA-MB468 negativas para ErbB2, se determinó en ensayos de citotoxicidad en base a FACS en diferentes proporciones de efector a diana (E/T) como se indica (círculos rellenos). Las células NK-92 no modificadas 24 horas después de la irradiación se incluyeron para comparación (círculos abiertos).

Figura 4. Autoguiado de células NK-92/5.28.z a carcinomas de mama ErbB2 positivos in vivo. Las células NK-92 no modificadas (panel superior) o NK-92/5.28.z específicas de ErbB2 (panel inferior) se marcaron con reactivo de marcado DiD fluorescente y se inyectaron por vía intravenosa en ratones NSG que llevaban xenoinjertos de carcinoma de mama ortotópico MDA-MB453/EGFP establecidos. Veinticuatro horas después de la inyección, se extirparon los tumores, se prepararon suspensiones de células individuales y se analizó la presencia de células que expresaban EGFP y marcadas con DiD. Las células NK positivas para DiD están indicadas en gris oscuro (cuadrantes inferiores derechos). Las células de carcinoma de mama positivas para EGFP (cuadrantes superiores izquierdos) y las células estromales murinas doble negativas (cuadrantes inferiores izquierdos) están indicadas en gris claro. Los eventos doble positivos (cuadrante superior derecho) representan conjugados de células diana NK-92/5.28.z y MDA-MB453/EGFP que expresan CAR. Se muestran datos citométricos de flujo representativos de un animal de cada grupo (n=3).

Figura 5. Actividad antitumoral in vivo de células NK-92/5.28.z.

A) Para investigar la actividad antitumoral, a los ratones NSG se les inyectaron por vía intravenosa células de carcinoma de células renales Renca-lacZ/ErbB2. Luego los animales fueron tratados dos veces por inyección i.v. de células NK-92 no modificadas o NK-92/5.28.z clonales en los días 1 y 3 después de la inyección de células tumorales. Los ratones de control recibieron PBS. Cuatro semanas después de la exposición tumoral, se extirparon los pulmones y se contaron los nódulos tumorales en la superficie pulmonar.

B) En un experimento separado, los ratones NSG inyectados con células Renca-lacZ/ErbB2 fueron tratados como se describió anteriormente con células NK-92 o NK-92/5.28.z no irradiadas, o células NK-92/5.28.z irradiadas con 10 Gy como se indica. Se muestran los valores medios $\pm$ SEM; n=5. ns, p > 0,05; *, P < 0,05; **, p < 0,01.

Ejemplos

Ejemplo 1

1.1 Procedimientos

Células y condiciones de cultivo

Las células de eritroleucemia K562 humanas (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Lonza, Köln, Alemania). Se cultivaron células de carcinoma de mama MDA-MB453 y MDA-MB468 humanas, y células HEK 293T (todas ATCC) en DMEM (Lonza). Todos los medios se complementaron con FBS inactivado por calor al 10 %, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. Se propagaron células NK-92 humanas (ATCC) en medio X-VIVO 10 (Lonza) suplementado con plasma humano inactivado por calor al 5 % (Servicio de Sangre de la Cruz Roja Alemana Baden-Württemberg - Hessen, Frankfurt, Alemania) y 100 IU/ml de IL-2 (Proleukin; Novartis Pharma, Nürnberg, Alemania). Las células murinas de carcinoma de células renales Renca-lacZ/ErbB2 y Renca-lacZ/EGFR que expresan ErbB2 o EGFR humano se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 mg/ml de zeocina y 0,48 mg/ml de G418 (Maurer-Gebhard et al., 1998).

Generación de células NK-92/5.28.z que expresan CAR

La secuencia CAR 5.28.z se diseñó mediante el ensamblaje in silico de un péptido señal de cadena pesada de inmunoglobulina, un fragmento de anticuerpo scFv(FRP5) específico de ErbB2 y una región bisagra CD8α modificada (en donde una cisteína no emparejada dentro de la región bisagra fue reemplazada por serina), seguido por los dominios transmembrana e intracelular CD28 y el dominio intracelular CD3ζ. Se sintetizó un gen de fusión con codón optimizado (GeneArt, Regensburg, Alemania) y se insertó en el plásmido de transferencia lentiviral pHR'SIN-cPPT-WPREmut (Schambach et al., 2006), dando como resultado el plásmido de transferencia lentiviral pS-5.28.z-W. Se generaron partículas de vector pseudotipificado VSV-G y las células NK-92 se transdujeron como se describió previamente (Sahm et al., 2012), y para el clon celular NK-92/5.28.z confirmado por análisis de PCR de ADN genómico con cebadores de oligonucleótidos que produjeron productos de PCR característicos que abarcan las uniones entre el ADN cromosómico y las secuencias de vectores integrados.

Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de las células NK-92 hacia las células diana se analizó en ensayos en base a FACS como se describe (Sahm et al., 2012). Brevemente, las células diana se marcaron con calceína violeta AM (Sondas Moleculares, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se cocultivaron con células efectoras en diversas proporciones de efector a objetivo (E/T) durante 2 horas a 37 ° C. Después del cocultivo, se agregaron 250 µl de una solución de yoduro de propidio (PI) de 1 µg/ml a cada muestra 5 minutos antes del análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Los datos se analizaron con el software FACSDiva (BD Biosciences). Para calcular la citotoxicidad específica, el número de células diana lisadas espontáneamente en la ausencia de células efectoras se sustrajo del número de células diana muertas determinadas como doble positivo para calceína violeta AM y PI en la muestra medida.

Irradiación de células NK-92

Las células NK-92/5.28.z y NK-92 no modificadas se recolectaron por centrifugación, se contaron, lavaron, resuspendieron en medio de crecimiento fresco y se irradiaron con 5 o 10 Gy usando un dispositivo Biobeam 2000 (Gamma Service Medical, Leipzig, Alemania). Para los ensayos in vitro de proliferación y citotoxicidad, las células irradiadas se lavaron, se resuspendieron en medio de crecimiento fresco y se cultivaron hasta 72 horas. La proliferación se analizó contando células viables en diferentes puntos de tiempo usando exclusión de azul de tripano. Para los experimentos in vivo, las células se irradiaron con 10 Gy y se aplicaron directamente.

Autoguiado tumoral de células NK-92

Las células de carcinoma de mama MDA-MB453 que expresan EGFP se derivaron por transducción de células MDA-MB453 con un vector lentiviral que codifica EGFP y enriquecimiento mediante clasificación de células por citometría de flujo. Se indujeron xenoinjertos de carcinoma de mama ortotópico en ratones hembra NOD-SCID IL2R γ^{nulo} (NSG) de 4 a 6 semanas de edad (Charles River, Sulzfeld, Alemania) mediante inyección de 5×10^6 células MDA-MB453/EGFP suspendidas en Matrigel (BD Biosciences) en la almohadilla de grasa mamaria. Cuando los tumores eran palpables, las células NK-92/5.28.z o NK-92 no modificadas se marcaron con el reactivo de marcado DiD (1,1'-diocetadecil-3,3,3',3' tetrametilindodicarbocianina) (Sondas Moleculares/Life Technologies, Darmstadt, Alemania) como se describe (Tavri et al., 2009), e inyectado en la vena lateral de la cola de los ratones con tumor (1×10^7 células/animal; 3 animales por grupo). Veinticuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los ratones, se extirparon los tumores, se prepararon suspensiones de células individuales y se analizó la presencia de células que expresaban EGFP y marcadas con DiD en un citómetro de flujo FACSCanto II.

Actividad antitumoral in vivo

Se inyectaron ratones hembra NSG de cuatro a 6 semanas de edad con 1×10^5 células Renca-lacZ/ErbB2 en la vena lateral de la cola en el día 0. Luego, los animales fueron tratados por inyección i.v. de 1×10^7 de NK-92/5.28.z o células NK-92 no modificadas en los días 1 y 3 después de la inyección de células tumorales (5 ratones/grupo). Los ratones de control recibieron PBS. En experimentos separados, los ratones NSG inyectados con células Renca-lacZ/ErbB2 también fueron tratados con células NK-92/5.28.z irradiadas (10 Gy), o células NK-92/5.28.z no irradiadas y células NK-92 no modificadas como controles (5 ratones/grupo). Cuatro semanas después de la exposición al tumor, se sacrificaron todos los animales, se extirparon los pulmones y se contaron los nódulos tumorales en la superficie pulmonar como se describe (Maurer-Gebhard et al., 1998).

Análisis estadístico

Las diferencias entre los valores se evaluaron mediante la prueba t de Student de dos colas sin emparejar. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. Los cálculos estadísticos se realizaron con el software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

1.2 Resultados

Generación de un clon de células individuales NK-92/5.28.z específico de ErbB2

El receptor de antígeno quimérico 5.28.z se utilizó para generar una línea celular NK-92 específica de ErbB2 clínicamente aplicable (Figura 1A). Se produjeron partículas de vector CAR lentiviral pseudotipificadas VSV-G y se transdujeron células NK-92 de un banco de células NK-92 maestro certificado (Arai et al., 2008). Los clones de células individuales se derivaron por dilución limitante, y las células que expresan CAR se identificaron por análisis de citometría de flujo con proteína de fusión ErbB2-Fc. Un total de 15 clones de células individuales que expresan CAR se caracterizaron funcional y molecularmente, lo que albergaba entre una y cuatro copias de vectores. Un clon celular denominado NK-92/5.28.z que mostró una expresión de CAR alta y estable durante el cultivo continuo en un entorno que refleja la expansión a gran escala bajo condiciones de GMP se seleccionó para un análisis posterior (Figura 1B). La actividad citotóxica selectiva de las células redireccionadas se evaluó usando células de carcinoma de células renales murinas Renca-lacZ/ErbB2 que expresan establemente ErbB2 humano. Las células clonales NK-92/5.28.z mostraron una alta citotoxicidad hacia estas células diana que expresan ErbB2, que eran resistentes al NK-92 no modificado (Figura 1C, panel izquierdo). En contraste, las células Renca-lacZ/EGFR negativas para ErbB2

negativa pero por lo demás isogénicas que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico no mostraron una sensibilidad potenciada a las células efectoras (Figura 1C, panel derecho). Esto indica que la muerte celular estuvo mediada por la interacción de CAR 5.28.z con su antígeno diana ErbB2.

5 La citotoxicidad endógena, independiente de CAR de las células NK-92/5.28.z se investigó usando células de eritroleucemia humana K562 negativas para ErbB2 pero sensibles a NK como dianas. Mientras que las células K562 eran altamente sensibles a células NK-92 no modificadas negativas para CAR, fueron destruidas en un grado mucho menor por las células NK-92/5.28.z específicas de ErbB2 (Figura 1D).

10 En conjunto, estos datos demuestran que las células NK-92/5.28.z son altamente selectivas y destruyen eficazmente las células tumorales que expresan ErbB2, mientras que su citotoxicidad endógena a dianas negativos para ErbB2 se reduce notablemente en comparación con las células NK-92 no modificadas.

Caracterización molecular de células NK-92/5.28.z específicas de ErbB2

15 La PCR mediada por amplificación lineal (LAM-PCR) y la secuenciación de ADN revelaron una integración vectorial cada uno en una región intergénica en el cromosoma 2, y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9 de las células clonales NK-92/5.28.z (Figura 2A). Los sitios de integración se confirmaron mediante análisis de PCR del ADN genómico de células NK-92/5.28.z de tres pasajes diferentes durante el cultivo continuo durante varios meses, amplificando así secuencias de ADN específicas que abarcan las uniones entre el gen TRAF2 y el extremo 5' del vector CAR integrado, y entre el extremo 3' del vector CAR integrado y el gen TRAF2 (Figura 2B, paneles superiores), así como secuencias de ADN específicas que abarcan las uniones entre la región intergénica en el cromosoma 2 y extremos 5' y 3' del vector CAR integrado (Figura 2B, paneles inferiores). En cada caso, el ADN 20 genómico de los diferentes pasajes de las células NK-92/5.28.z produjo los mismos productos de amplificación característicos de longitud y secuencia definidas, lo que demuestra la estabilidad a largo plazo de las integraciones vectoriales. No se obtuvieron productos de amplificación con los mismos cebadores de oligonucleótidos tras el análisis por PCR del ADN genómico de células NK-92 no modificadas, lo que indica que el análisis por PCR específico de las integraciones vectoriales CAR también representa una poderosa herramienta de diagnóstico para 25 identificar molecularmente el clon celular NK-92/5.28.z.

a) Producto de amplificación TRAF2-CAR (5')

Integración vectorial CAR en el gen TRAF2

parte 5' de integración vectorial

Producto de PCR TRAF2-CAR (5') a partir de ADN genómico de células NK-92/5.28.z

30 Cebadores:

TRAF2-F1: CTTTCAGCAGGGACCAGAAACAA [SEQ ID NO.1]

CAR-R1: CCGCTTAATACTGACGCTCTCG [SEQ ID NO. 2]

letras minúsculas: gen TRAF2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud:

35 587 nucleótidos

SEQ ID NO. 9

ES 2 806 776 T3

```

cttcagcagggaccagaaacaaaactcacactctttcttctctgagttga      50
gactggaaaaatgaaagattgttttaggggaaacttgagggaacagtctg      100
ggcagcctgcagggcatggccctgttccctccagggctgggaaagtcagca      150
ctgctttctggtggcgaACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACA      200
AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG      250
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA      300
AGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC      350
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA      400
GCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC      450
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAG      500
GGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGAAGTAGCGGAGGCTAGAA      550
GGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGG                    587

```

b) Producto de amplificación CAR-TRAF2 (3')

Integración vectorial CAR en el gen TRAF2

parte 3' de integración vectorial

5 Producto de PCR CAR-TRAF2 (3') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores:

CAR-F1: ATCGCCACGGCAGAACTCA [SEQ ID NO. 3]

TRAF2-R1: GACCCTTCACCCAACGCTTAG [SEQ ID NO. 4]

letras minúsculas: gen TRAF2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

10 Longitud: 503 nucleótidos

SEQ ID NO. 10

```

ATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG      50
GGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTCGAATTCGATAC      100
TCGAGGTCGAGGCAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACA      150
AGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA      200
GGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGG      250
GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG      300
GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTGCTTCAAGTA      350
GTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC      400
CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAccttccctctgcagctgctgg      450
ctcagccgattgtatatgtctgggagctctgcactaagcgttggtgaagg      500
gtc                                                            503

```

c) Producto de amplificación IGCHR2-CAR (5')

Integración vectorial CAR en la región intergénica del cromosoma 2

parte 5' de integración vectorial

15 Producto de PCR IGCHR2-CAR (5') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

Cebadores:

IGCHR2-F1: TCAGTGGAATGGGCAGCTTCAAGT [SEQ ID NO. 5]

CAR-R2: TTCAGCAAGCCGAGTCCTGCGT

[SEQ ID NO. 6]

letras minúsculas: región intergénica del cromosoma 2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud: 679 nucleótidos

SEQ ID NO. 11

tcagtggaatgggcagcttcaagttgatgtcatttcaatagtaacttatt	50
tcagtctacatacttcccaagaatgcaccatctcttttttatgtatttat	100
tatttttgagaaagagtctcactctgtcgcccaggctggagtgcaatggca	150
tgatcttggtcactgtaacctccgtctcctgggttcaagccattctcct	200
gtctcagcctcccggttagtgggttataggcacacaccaccacgcccgg	250
ctaatttttgatttttagtaaaagatggggtttcaccatgttgggcaggc	300
tgggtcaaaactcttgacttcaggtgatccgcccaccttggcctccaaa	350
gtgctgggatgacaggcACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACA	400
AGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG	450
CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA	500
AGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC	550
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA	600
GCAGTGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC	650
5 TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAA	679

d) Producto de amplificación CAR-IGCHR2 (3')

Integración vectorial CAR en la región intergénica del cromosoma 2

parte 3' de integración vectorial

Producto de PCR CAR-IGCHR2 (3') a partir de ADN genómico de células NK-92/5-28.z

10 Cebadores:

CAR-F2: ACTGATAATTCCGTGGTGGTGTGT

[SEQ ID NO. 7]

IGCHR2_CAR-R1: CACTGTGGCTCACTIGCTAGA

[SEQ ID NO. 8]

letras minúsculas: región intergénica del cromosoma 2

letras mayúsculas: secuencia vectorial

Longitud: 376 nucleótidos

SEQ ID NO. 12

ACTGATAATTCCGTGGTGGTGTGTCGAATTTCGATACTCGAGGTGAGGCAAT	50
TCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCT	100
TAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCC	150
AACGAAGACAAGATCTGCTTTTTTGGTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC	200
CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAA	250
GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGT	300
TGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG	350
15 AAAATCTCTAGCAgtgagccacagt	376

Destrucción de células diana por células NK-92/5.28.z irradiadas

En los ensayos clínicos de fase I con NK-92 no modificado, se incluyó la irradiación de células con 10 Gy antes de la infusión como medida de seguridad para prevenir el injerto permanente (Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013). Medidas de seguridad similares pueden ser importantes para el uso clínico de células NK-92 redireccionadas. Por lo

tanto, probamos los efectos de la irradiación- γ en crecimiento y actividad citotóxica de las células clonales NK-92/5.28.z. La irradiación con 5 Gy fue suficiente para evitar una mayor replicación, mientras que el número de células viables NK-92/5.28.z permaneció casi constante durante 24 horas después de la exposición a 5 o 10 Gy antes de disminuir gradualmente (Figura 3A). Para evaluar los efectos sobre la actividad citotóxica, se cultivaron células NK-92/5.28.z irradiadas con 10 Gy durante 24 horas y luego se coincubaron durante dos horas con células de carcinoma de mama MDA-MB453 humano que expresan ErbB2 como dianas. Las NK-92/5.28.z irradiadas mostraron una citotoxicidad alta y específica hacia las células MDA-MB453 (lisis específica del 65 % en una proporción E/T de 10:1), mientras que no lisaron las células de carcinoma de mama MDA-MB468 humanas negativas para ErbB2. (Figura 3B). Ni las células MDA-MB453 ni MDA-MB468 fueron destruidas por células NK-92 irradiadas no modificadas.

Autoguiado de células NK-92/5.28.z a carcinomas de mama positivos para ErbB2

El potencial de las células NK-92/5.28.z para autoguiarse a tumores establecidos se investigó en un modelo de carcinoma de mama ortotópico. Las células MDA-MB453 transducidas con un vector lentiviral que codifica EGFP se implantaron en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NSG hembra, y se dejaron crecer hasta que los tumores fueran palpables. Luego, las células NK-92/5.28.z y NK-92 no modificadas se marcaron con reactivo de marcaje fluorescente DiD, y se inyectaron por vía intravenosa en los animales portadores de tumores. Veinticuatro horas después, se extirparon los tumores, se prepararon suspensiones de células individuales y se analizó la presencia de células tumorales que expresan EGFP y células NK marcadas con DiD. En ratones inyectados con NK-92 no modificado, solo se encontraron algunas de las células NK en los tumores (Figura 4, panel superior). En contraste, las células NK-92/5.28.z se enriquecieron fuertemente en xenoinjertos MDA-MB453/EGFP (Figura 4, panel inferior). De manera importante, también encontramos conjugados de células NK-92/5.28.z y MDA-MB453/EGFP en las suspensiones celulares preparadas a partir de los tumores. Estos datos demuestran que las células NK-92/5.28.z retienen la especificidad de la célula diana in vivo y son capaces de penetrar en los tejidos y autoguiarse a sitios tumorales distantes.

Actividad antitumoral in vivo de células NK-92/5.28.z

Para la evaluación de la actividad antitumoral in vivo, elegimos un modelo experimental de metástasis pulmonar. Los ratones NSG recibieron inyecciones intravenosas de células Renca-lacZ/ErbB2, seguidas de inyecciones i.v. de células NK-92 no modificadas o NK-92/5.28.z redireccionadas en los días 1 y 3 después de la inoculación de células tumorales. Los ratones de control recibieron PBS. Cuatro semanas después de la exposición tumoral, se extirparon los pulmones y se contaron los nódulos tumorales en la superficie pulmonar. Si bien el tratamiento con células NK-92 no modificadas no afectó la formación de metástasis en comparación con los controles tratados con PBS, las células NK-92/5.28.z redireccionadas redujeron el número de nódulos tumorales pulmonares en este experimento en aproximadamente un 50 % (número medio de metástasis en la superficie pulmonar: PBS: $37,7 \pm 5,4$; NK-92: $36 \pm 5,1$; NK-92/5.28.z: $19 \pm 2,6$; $p < 0,05$) (Figura 5A). Para evaluar si las células NK-92/5.28.z retienen la actividad antitumoral in vivo después de la irradiación- γ , se realizó un experimento similar empleando células NK-92/5.28.z que se irradiaron con 10 Gy antes de la inyección. Los animales de control se trataron con células NK-92/5.28.z no irradiadas o células NK-92 no irradiadas no modificadas. En comparación con el tratamiento con células NK-92 no modificadas, tanto las células NK-92/5.28.z no irradiadas como las irradiadas redujeron notablemente el número de nódulos tumorales pulmonares (número medio de metástasis en la superficie pulmonar: NK-92: $68,3 \pm 9,1$; NK-92/5.28.z: $21 \pm 4,9$; NK-92/5.28.z irradiadas: $14,4 \pm 5,5$; $p < 0,01$) (Figura 5B). Estos datos demuestran actividad antitumoral específica de células NK-92/5.28.z aplicadas sistémicamente contra células tumorales que expresan ErbB2 en un modelo que refleja enfermedad diseminada. De manera importante, la viabilidad y funcionalidad de las células NK-92/5.28.z se conservaron transitoriamente después de la irradiación- γ a una dosis que impide más replicación de las células efectoras, lo que permite el reconocimiento y destrucción de las células diana in vivo.

Referencias

- Arai S, Meagher R, Swearingen M, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 2008;10(6):625-632.
- Boissel L, Betancur M, Wels WS, et al. Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res*. 2009;33(9):1255-1259.
- Daldrup-Link HE, Meier R, Rudelius M, Piontek G, Piert M, Metz S, Settles M, Uherek C, Wels W, Schlegel J, Rummeny EJ. In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging. *Eur Radiol*. 2005;15(1):4-13.
- Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:1445-1459.
- Gong et al., Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*. 1994 Apr;8(4):652-8.
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-1518.

- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-354.
- Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*. 2013;39(1):49-60.
- 5 Koch J, Steinle A, Watzl C, et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol*. 2013;34(4):182-191.
- Maurer-Gebhard M, Schmidt M, Azemar M, et al. Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res*. 1998;58(12):2661-2666.
- 10 Müller T, Uherek C, Maki G, et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(3):411-423.
- Sahm C, Schonfeld K, Wels WS. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother*. 15 2012;61(9):1451-1461.
- Schambach A, Böhne J, Baum C, et al. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther*. 2006; 13(7):641-645.
- 20 Schmidt M, Carbonaro DA, Speckmann C, et al. Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med*. 2003;9(4):463-468.
- Tavri S, Jha P, Meier R, et al. Optical imaging of cellular immunotherapy against prostate cancer. *Mol Imaging*. 2009;8(1):15-26.
- Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1563-1570.
- 25 Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*. 2002;100(4):1265-73.

Listado de secuencias

- 30 <110> Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus y DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH
- <120> Células NK-92 que expresan CAR como agentes terapéuticos celulares
- <130> C31927WO
- <150> EP 14 173 020.0
- <151> 2014-06-18
- 35 <160> 16
- <170> versión de PatentIn 3.5
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador
- <400> 1
- cttcagcagg gaccagaaac aa 22

<210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 ccgcttaata ctgacgtctt cg 22
 <210> 3
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 3
 atcgccacgg cagaactca 19
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 gacccttcac ccaacgttta g 21
 25 <210> 5
 <211> 24
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 5
 tcagtgaat gggcagcttc aagt 24
 <210> 6
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador
 <400> 6
 ttcagcaagc cgagtctgc gt 22
 <210> 7

5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

10 <400> 7
 actgataatt ccgtggtgtt gt 22
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 cactgtggct cactgctaga 20

20 <210> 9
 <211> 587
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

25 <223> Producto de amplificación de la integración vectorial CAR en el gen TRAF2
 <400> 9
 cttcagcagg gaccagaaac aaaactcaca ctctttcttc tctgagttga gactggaaaa 60
 atgaaagatt gtttttagggg aaacttgagg gaacagtctg ggcagcctgc agggcatggc 120
 cctgttcctc cagggctggg aaagtcagca ctgctttctg gtggcgaact ggaagggcta 180

attcactccc aacgaagaca agatctgctt tttgcttgta ctgggtctct ctggttagac 240
cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa 300
agcttgccctt gagtgttca agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag 360
agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc ccgaacaggg 420
acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg cttgctgaag 480
cgcgcacggc aagagggcag gggcggcgac tgggtgagtac gccaaaaatt ttgactagcg 540
gaggctagaa ggagagagat ggggtgcgaga gcgtcagtat taagcgg 587

<210> 10

<211> 503

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de amplificación de la integración vectorial CAR en el gen TRAF2

<400> 10

atcgccacgg cagaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg 60
ctgggcactg ataattccgt ggtgttgctg aattcgatac tcgaggtcga ggcaattcga 120
gctcgggtacc tttaagacca atgacttaca aggacgtgt agatcttagc cactttttta 180
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaacg aagacaagat ctgctttttg 240
cttggtactgg gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag 300
ggaaccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc 360
gtctgttggt tgactctggt aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa 420
tctctagcac cttccctctg cagctgctgg ctcagccgat tgtatatgct gggagctctg 480
cactaagcgt tgggtgaagg gtc 503

10 <210> 11

<211> 679

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Producto de amplificación de la integración vectorial CAR en la región intergénica del cromosoma 2

<400> 11

tcagtggaat gggcagcttc aagttgatgt catttcaata gtaacttatt tcagtctaca 60
tacttcccaa gaatgcacca tctctttttt atgtatttat tattttgaga aagagtctca 120
ctctgtcgcc caggctggag tgcaatggca tgatcttggc tcaactgtaac ctccgtctcc 180
tgggttcaag ccattctcct gtctcagcct cccgggtagt ggggttatag gcacacacca 240
ccacgcccgg ctaatttttg tatttttagt aaagatgggg tttcaccatg ttggccaggc 300
tgggctcaaa ctcttgactt caggtgatcc gccaccttg gcctcccaa gtgctgggat 360
gacaggcact ggaagggcta attcactccc aacgaagaca agatctgctt tttgcttgta 420
ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc 480
cactgcttaa gcctcaataa agcttgccct gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctctgt 540
tgtgtgactc tggttaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta 600
gcagtggcgc ccgaacaggg acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg 660
caggactcgg cttgctgaa 679

<210> 12

<211> 376

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de amplificación de la integración vectorial CAR en la región intergénica del cromosoma 2

<400> 12

actgataatt ccgtgggtgt gtcgaattcg atactcgagg tcgaggcaat tcgagctcgg 60
tacctttaag accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa 120
aggggggact ggaagggcta attcactccc aacgaagaca agatctgctt tttgcttgta 180
ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc 240
cactgcttaa gcctcaataa agcttgccct gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctctgt 300
tgtgtgactc tggttaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta 360
gcagtgagcc acagtg 376

10

<210> 13

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fragmento FRP5 de anticuerpo scFv específico de ErbB2

<400> 13

ES 2 806 776 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe

ES 2 806 776 T3

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
130 135 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
210 215 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys

<210> 14

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento FRP5 de anticuerpo scFv específico de ErbB2

<400> 14

caggtgcagc tgcagcagag cggccctgag ctgaagaagc ccggcgagac agtcaagatc	60
agctgcaagg ccagcggcta ccccttcacc aactacggca tgaactgggt gaaacaggcc	120
ccaggccagg gactgaagtg gatgggctgg atcaacacca gcaccggcga gagcaccttc	180
gccgacgact tcaagggcag attcgacttc agcctggaaa ccagcgccaa caccgcctac	240
ctgcagatca acaacctgaa gagcgaggac agcgccacct acttttgcg cagatgggag	300
gtgtaccacg gctacgtgcc ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtccagcggc	360
ggagggggct ctggcggcgg aggatctggg ggagggggca gcgacatcca gctgaccag	420
agccacaagt ttctgagcac cagcgtgggc gaccgggtgt ccatcacctg caaagccagc	480
caggacgtgt acaacgccgt ggcctgggat cagcagaagc ctggccagag cccaagctg	540
ctgatctaca gcgccagcag ccggtacacc ggcgtgccca gcaggttcac cggcagcggc	600
agcggcccag acttcacctt caccatcagc agcgtgcagg ccgaggacct ggccgtgtac	660
ttctgccagc agcacttccg gacccccttc accttcggct ccggcaccaa gctggaaatc	720
5 aag	723

<210> 15

<211> 504

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Receptor de antígeno quimérico específico de ErbB2

<400> 15

ES 2 806 776 T3

Met	Asp	Trp	Ile	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly			
1				5					10					15				
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys			
			20					25					30					
Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe			
		35					40					45						
Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu			
	50					55					60							
Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Phe	Ala			
65					70					75					80			
Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Asp	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Asn			
				85					90					95				
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr			
			100					105					110					

ES 2 806 776 T3

Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Trp	Glu	Val	Tyr	His	Gly	Tyr	Val	Pro	Tyr	Trp	115	120	125
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	130	135	140
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	145	150	155
His	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	165	170	175
Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Tyr	Asn	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	180	185	190
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg	Tyr	195	200	205
Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Asp	Phe	210	215	220
Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	225	230	235
Cys	Gln	Gln	His	Phe	Arg	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	245	250	255
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	260	265	270
Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	275	280	285
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	290	295	300
Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	305	310	315
Leu	Asp	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	325	330	335
Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	340	345	350
Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	355	360	365

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
370 375 380

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
385 390 395 400

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
405 410 415

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
420 425 430

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
435 440 445

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
450 455 460

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
465 470 475 480

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
485 490 495

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500

<210> 16

<211> 1515

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico específico de ErbB2

<400> 16

atggactgga tctggcggat tctgttcctg gtcggggctg ccacaggcgc ccacagccag	60
gtgcagctgc agcagagcgg ccctgagctg aagaagcccg gcgagacagt caagatcagc	120
tgcaaggcca gcggctaccc cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa acaggcccca	180
ggccagggac tgaagtggat gggctggatc aacaccagca ccggcgagag caccttcgcc	240
gacgacttca agggcagatt cgacttcagc ctggaaacca gcgccaacac cgcctacctg	300
cagatcaaca acctgaagag cgaggacagc gccacctact tttgcgccag atgggaggtg	360
taccacggct acgtgcccta ctggggccag ggcaccaccg tgaccgtgtc cagcggcgga	420
gggggctctg gcggcggagg atctggggga gggggcagcg acatccagct gaccagagc	480
cacaagtttc tgagcaccag cgtgggcgac cgggtgtcca tcacctgcaa agccagccag	540
gacgtgtaca acgccgtggc ctggtatcag cagaagcctg gccagagccc caagctgctg	600
atctacagcg ccagcagccc gtacaccggc gtgccagca ggttcaccgg cagcggcagc	660
ggcccagact tcaccttcac catcagcagc gtgcaggccg aggacctggc cgtgtacttc	720
tgccagcagc acttcgggac ccccttcacc ttccggtccg gcaccaagct ggaaatcaag	780
gccctgagca acagcatcat gtacttcagc cacttcgtgc ccgtgtttct gcccgccaa	840
cccaccacca cccctgcccc cagaccccct accccagccc ccacaatcgc cagccagccc	900
ctgagcctga ggcccagggc cagcagacct gccgctgggg gagccgtgca caccaggggc	960
ctggacaagc ccttctgggt gctggctctg gtcggcggag tgctggcctg ttacagcctg	1020
ctggtcaccg tggccttcat catcttttgg gtccgcagca agcggagccg gctgctgcac	1080
agcgactaca tgaacatgac cccaaggcgg ccaggcccca cccggaagca ctaccagccc	1140
tatgcccctc ctagggactt cgccgcctac cggtcacagag tgaagttcag ccgcagcgcc	1200
gacgcccctg cctaccagca gggccagaac cagctgtaca acgagctgaa cctgggcagg	1260
cgggaggaat acgacgtgct ggacaagcgc agaggccggg accctgagat gggcggcaag	1320
cccaggcgga agaacccccca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc	1380
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggcgac gcggcaaggg ccacgacggc	1440
ctgtaccagg gcctgtccac cgccaccaag gacacctacg acgccctgca catgcaggcc	1500
ctgcctcccc gttaa	1515

REIVINDICACIONES

1. Una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2,
que contiene un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende
un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, dominios transmembrana e intracelulares
de CD28, y dominio intracelular de zeta-CD3,
y en el que dicho vector está genómicamente integrado (i) en una región intergénica en el cromosoma 2, y (ii) en el
gen *TRAF2* en el cromosoma 9.
2. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula o línea celular se
caracteriza porque mediante análisis por PCR del ADN genómico de dicha célula o línea celular se obtiene al
menos uno de los siguientes productos de amplificación:
 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2 produce un producto de amplificación con la secuencia de
nucleótidos de la SEQ ID NO. 9;
 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 3 y 4 produce un producto de amplificación con la secuencia de
nucleótidos de la SEQ ID NO. 10;
 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 6 produce un producto de amplificación con la secuencia de
nucleótidos de la SEQ ID NO. 11;
 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 7 y 8 produce un producto de amplificación con la secuencia de
nucleótidos de la SEQ ID NO. 12.
3. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que muestra citotoxicidad natural reducida
o nula, es decir, citotoxicidad reducida o nula para células negativas para ErbB2 que son lisadas por células NK-92
no modificadas,
y que muestra citotoxicidad específica aumentada, es decir, citotoxicidad aumentada para las células tumorales que
expresan ErbB2 en comparación con las células NK-92 no modificadas.
4. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el fragmento de
anticuerpo scFv específico de ErbB2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 13 (*scFv FRP5*) y/o
está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 14.
5. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el receptor de
antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 15 (*CAR de longitud completa*) y/o
está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 16.
6. La célula NK-92 o línea celular NK-92/5.28.z, que fue depositada el 11 de junio de 2014 en el Instituto Leibniz
DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH con el número de acceso DSM ACC3244.
7. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en medicina.
8. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la
prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2,
en el que el cáncer, preferiblemente los cánceres que expresan ErbB2, es/son más preferiblemente seleccionados
de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, cáncer
de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer uterino, cáncer de células renales, glioblastoma,
meduloblastoma, sarcoma y cáncer de pulmón.
9. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como agente
terapéutico celular direccionado y/o para inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.
10. La célula o línea celular NK-92 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende un
pretratamiento de las células mediante irradiación, preferiblemente irradiación-γ.
11. Un procedimiento para generar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2, que comprende las etapas
de:
 - (1) proporcionar un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento
de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 y
dominio intracelular de zeta-CD3 para transducir células NK-92,
 - (2) transducir células NK-92 con dicho vector,

- (3) derivar/generar clones de células individuales mediante dilución limitante;
- (4) identificar células que expresan CAR mediante análisis de citometría de flujo con proteína de fusión ErbB2-Fc,
- 5 (5) seleccionar clon o clones celulares que muestran una expresión de CAR alta y estable durante cultivo continuo,
- (6) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra células que expresan ErbB2,
- (7) evaluar la actividad citotóxica de las células redireccionadas contra células negativas para ErbB2,
- 10 (8) seleccionar clon o clones celulares que muestran citotoxicidad aumentada a células tumorales que expresan ErbB2 en comparación con células NK-92 no modificadas y citotoxicidad reducida o nula a células negativas para ErbB2 que son lisadas por células NK-92 no modificadas, y
- (9) determinar el número y posición de la integración vectorial, y seleccionar los clones celulares que exhiben la integración vectorial en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen TRAF2 en el cromosoma 9.
12. Un procedimiento para identificar una célula o línea celular NK-92 específica de ErbB2, que comprende las etapas de:
- 15 (i) determinar el número y posición de la integración vectorial en la célula (clones), en el que el vector es un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un fragmento de anticuerpo scFv específico de ErbB2, una región de bisagra, dominios transmembrana e intracelular de CD28 y dominio intracelular de zeta-CD3; y
- 20 (ii) seleccionar la célula (clones) que exhibe la integración vectorial en una región intergénica en el cromosoma 2 y en el gen *TRAF2* en el cromosoma 9,
- en el que preferiblemente la célula (clon) se **caracteriza porque** mediante análisis de PCR del ADN genómico de dicha célula (clon) se obtiene al menos uno de los siguientes productos de amplificación:
- PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 9;
 - 25 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 3 y 4 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 10;
 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 6 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 11;
 - 30 - PCR con cebadores de las SEQ ID NO. 7 y 8 produce un producto de amplificación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 12.
13. Una célula o línea celular NK-92 obtenida por el procedimiento de la reivindicación 11 o identificada por el procedimiento de la reivindicación 12.
14. La célula o línea celular NK-92 de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en la prevención y/o tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cánceres que expresan ErbB2,
- 35 preferiblemente que comprende un pretratamiento de las células por irradiación, más preferiblemente irradiación-Y,
- y/o para su uso como agente terapéutico celular direccionado y/o para su uso en inmunoterapia adoptiva contra el cáncer
- 40 preferiblemente que comprende un pretratamiento de las células por irradiación, más preferiblemente irradiación-Y.
15. La célula o línea celular NK-92 para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el cáncer, preferiblemente los cánceres que expresan ErbB2, se seleccionan de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer uterino, cáncer de células renales, glioblastoma, meduloblastoma, sarcoma y cáncer de pulmón.
- 45

Figura 1 A-B

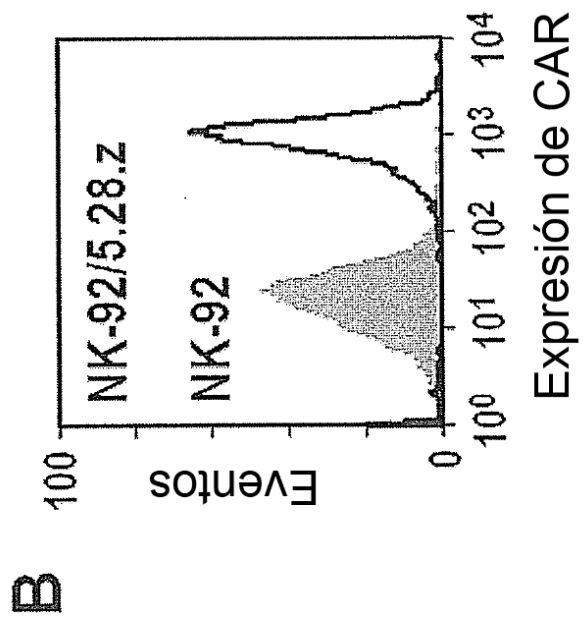
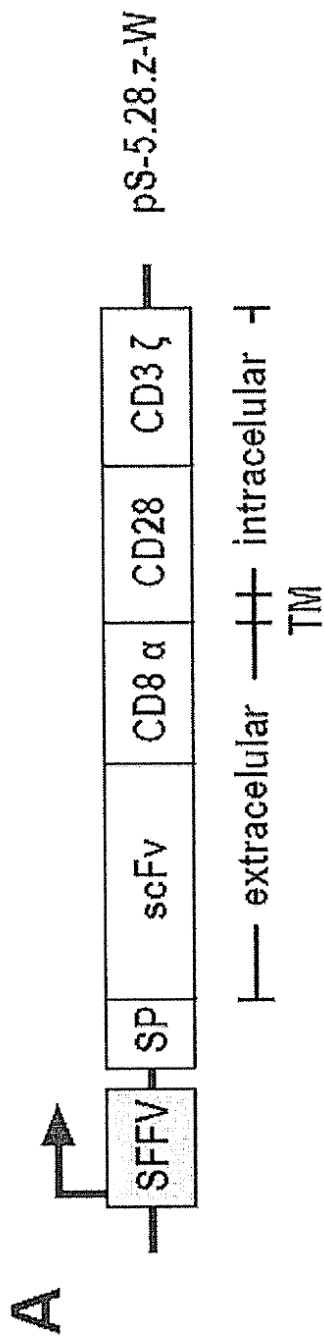


Figura 1 C-D

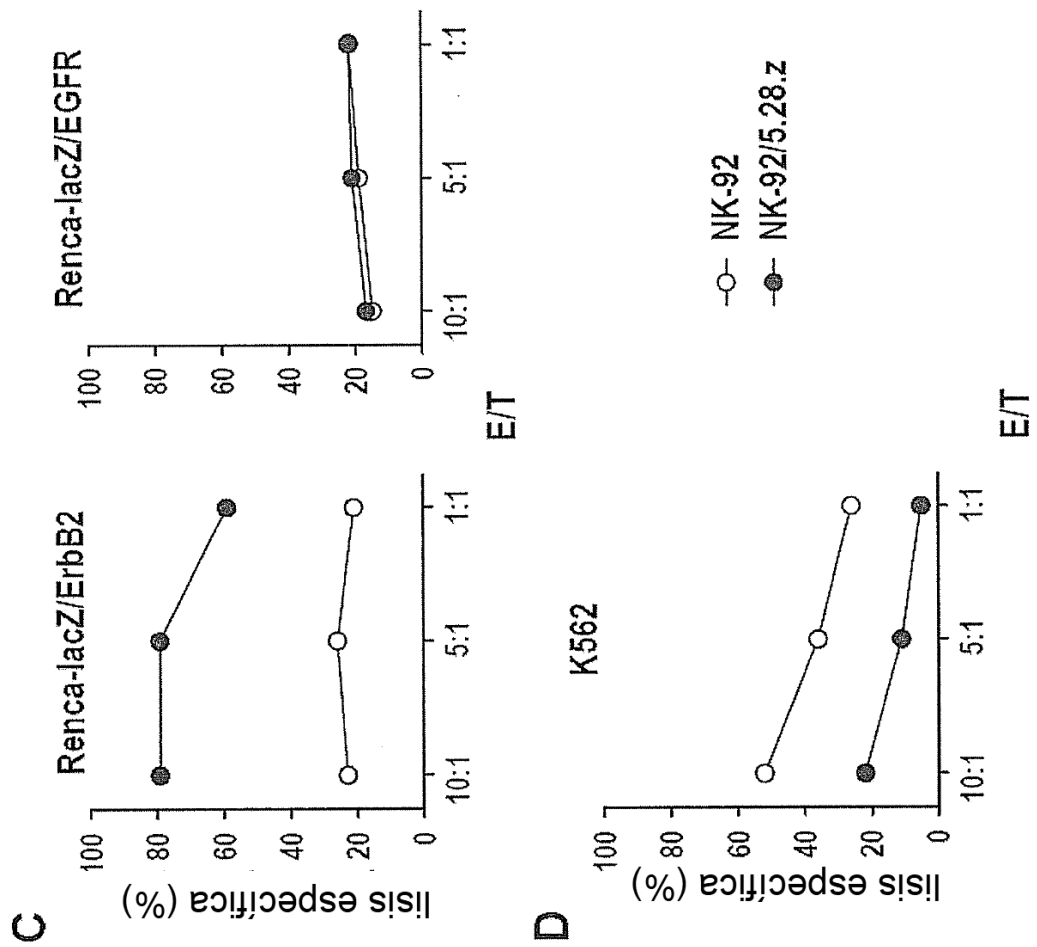


Figura 2A

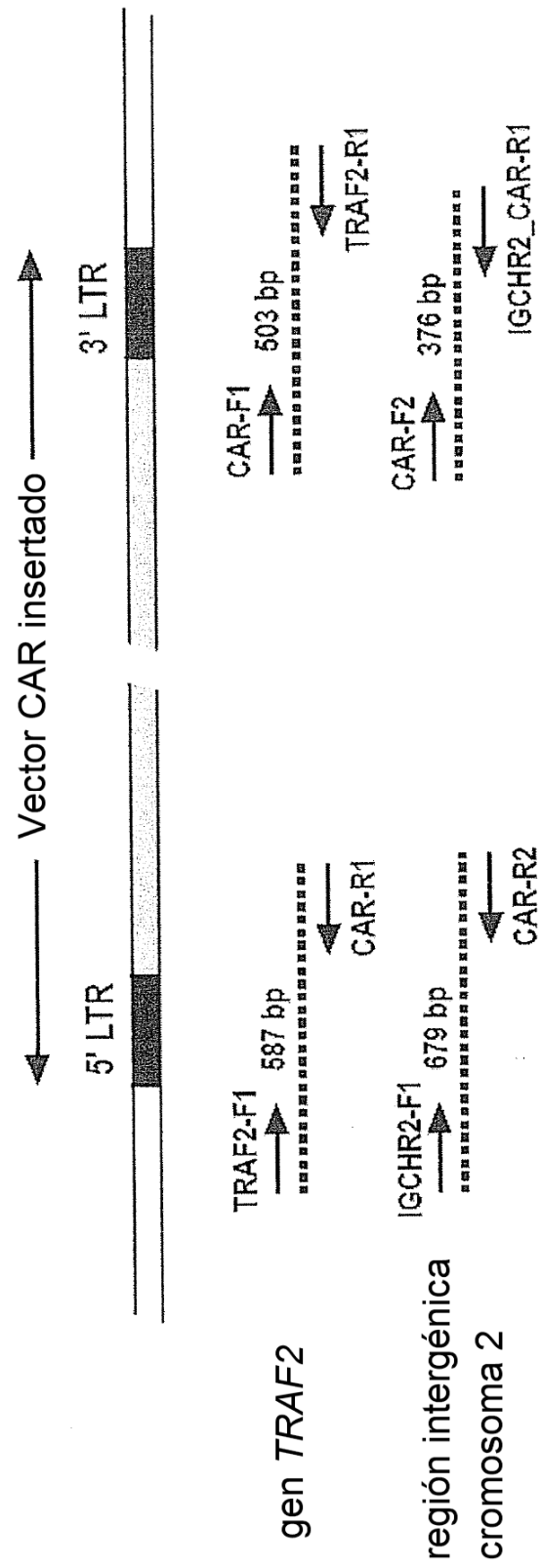


Figura 2B

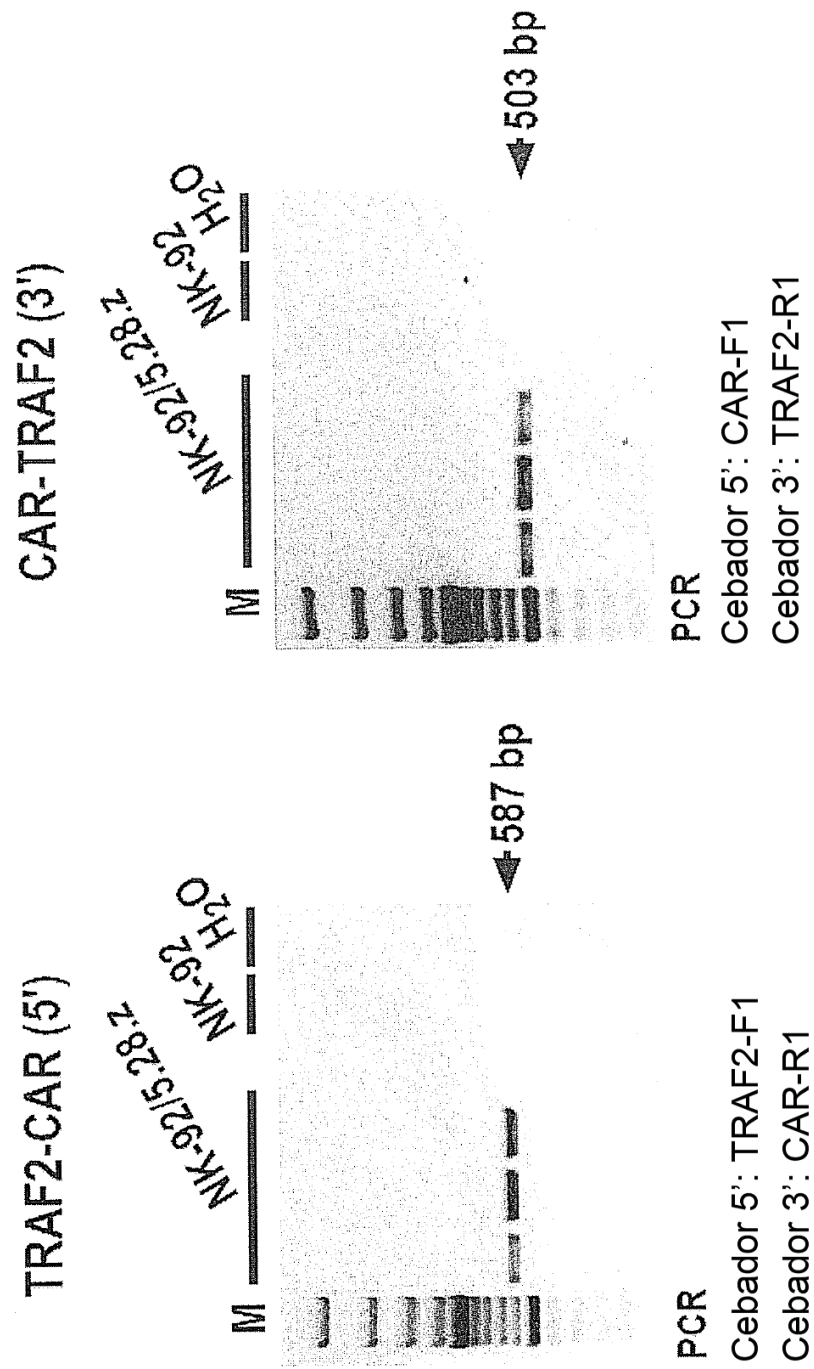


Figura 2C

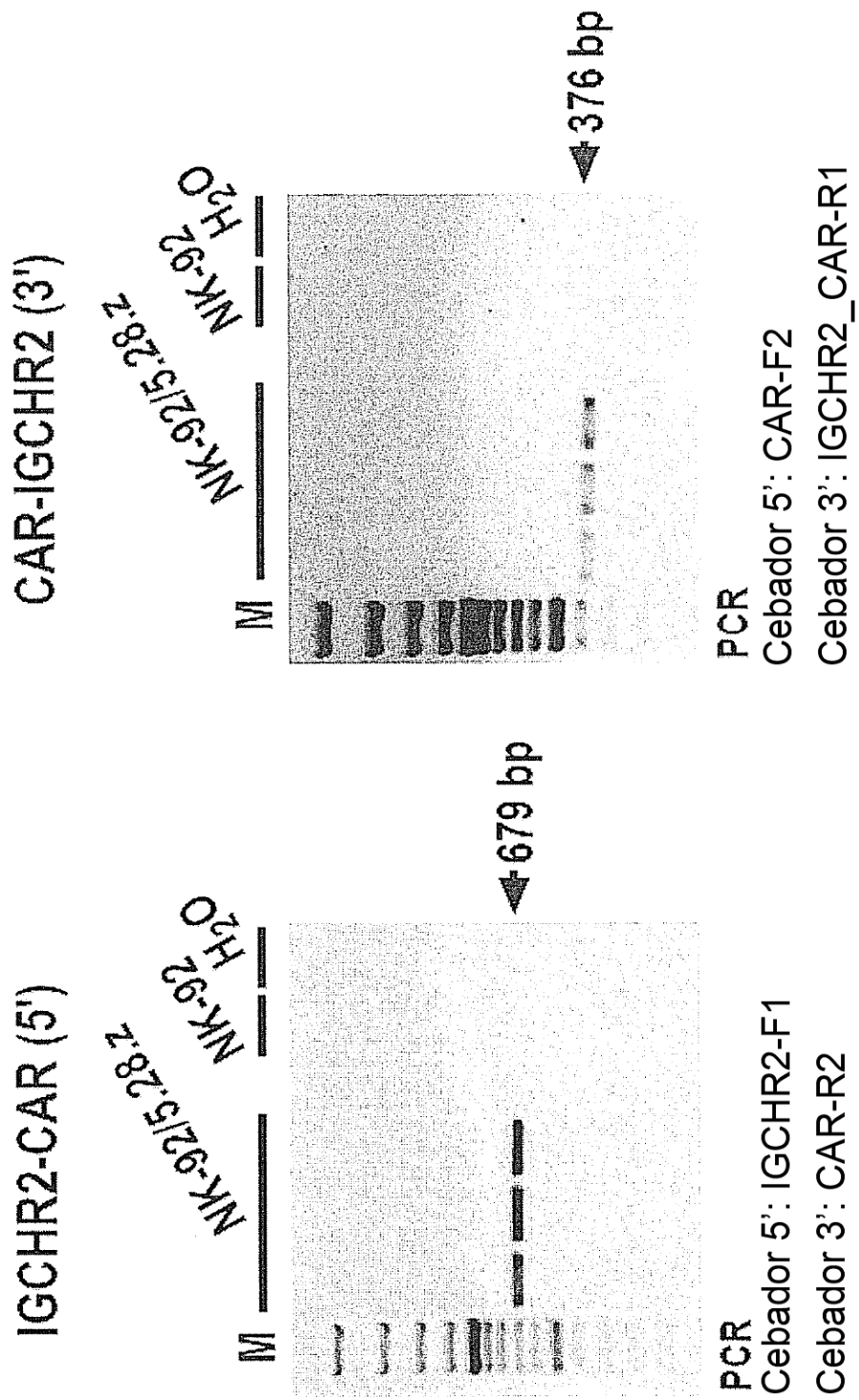


Figura 3

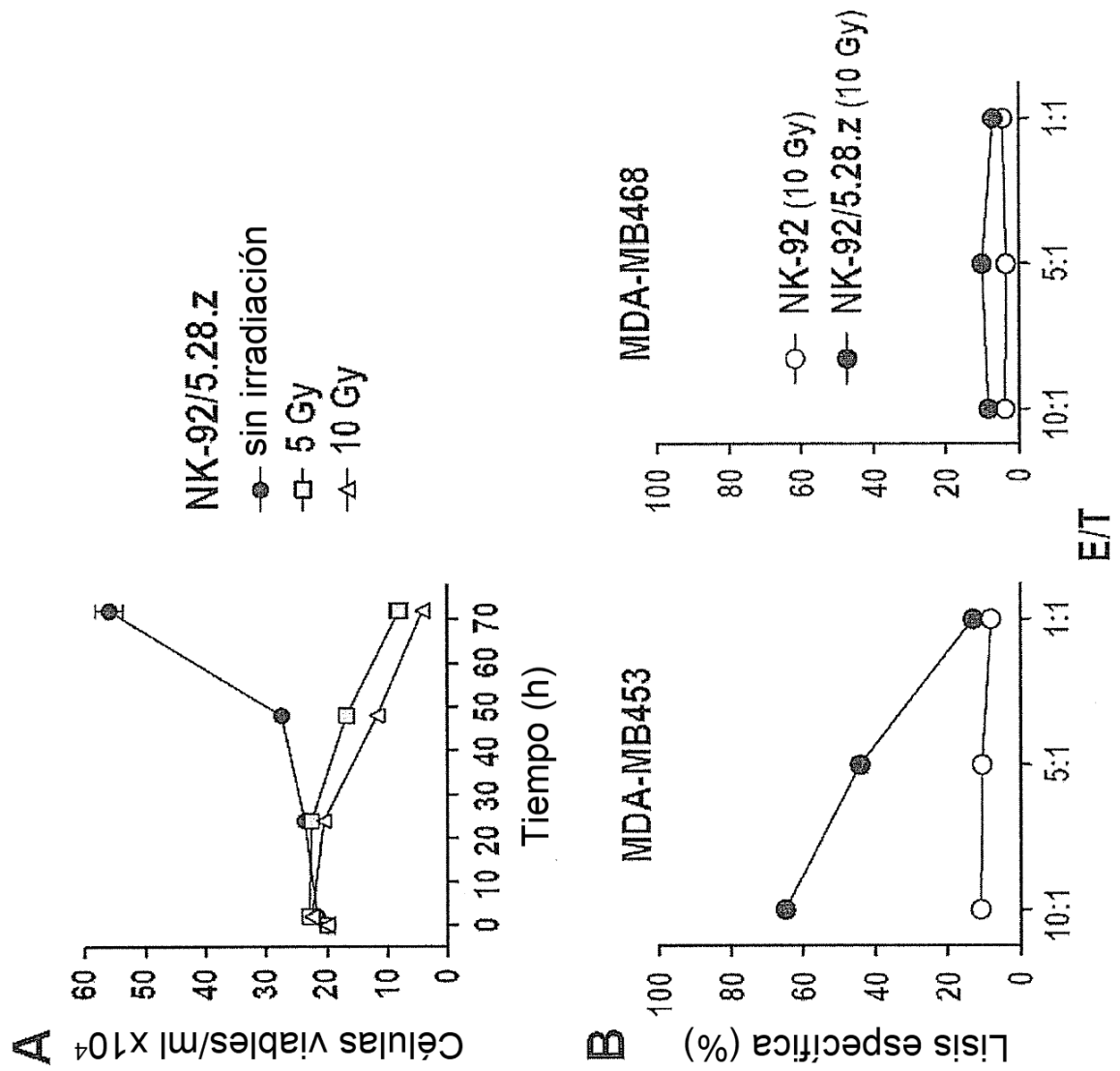


Figura 4

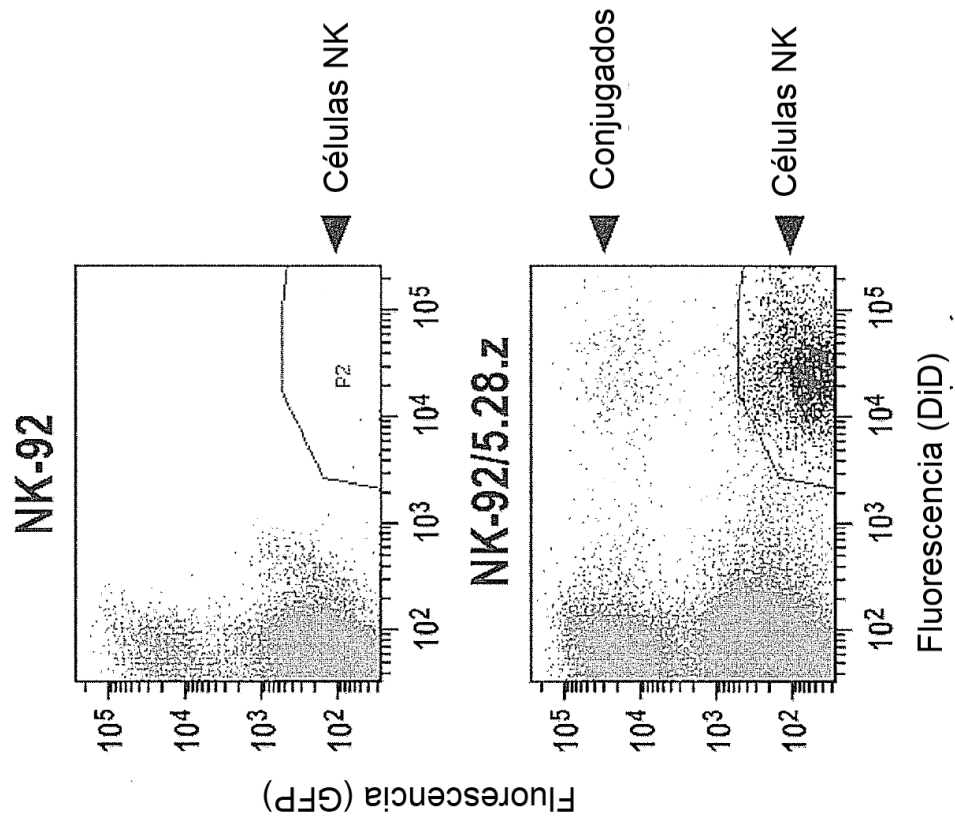


Figura 5

