

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 952**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2005** **E 15150984 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023** **EP 2921500**

54 Título: **Líneas de células asesinas naturales humanas genéticamente modificadas**

30 Prioridad:

10.07.2004 US 586581 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2023

73 Titular/es:

**THE INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
(100.0%)
333 Cottman Avenue
Philadelphia, PA 19111, US**

72 Inventor/es:

CAMBELL, KERRY S.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 955 952 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

Líneas de células asesinas naturales humanas genéticamente modificadas

Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a un método para la evaluación in vitro de la eficacia de un anticuerpo para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El método utiliza ciertas líneas de células asesinas naturales (NK) que han sido manipuladas genéticamente para expresar una proteína receptora de la superficie celular CD16 que participa en las respuestas de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método que utiliza la línea de células asesinas naturales NK-92 que, ha sido modificada para expresar la proteína receptora de superficie celular Fc CD16, y en una segunda realización, que ha sido modificada para expresar tanto la proteína receptora de superficie celular Fc CD16 como una o más de las proteínas de señalización accesorias asociadas tales como FcR- γ o TCR- ζ y/o una citoquina tal como IL-2.

Antecedentes

Varios anticuerpos, sobre todo Rituximab (MabThera[®]; Hoffmann-LaRoche, Ltd; Basilea, Suiza) y Herceptin[®] (Genentech, Inc.; South San Francisco, CA), han demostrado un valor terapéutico significativo como agentes antitumorales altamente selectivos y efectivos. Aunque estos anticuerpos pueden unirse a antígenos específicos en las células tumorales, su actividad antitumoral depende, al menos en parte, de la unión posterior de las células asesinas naturales (NK; se proporciona una tabla de abreviaturas en la Tabla Z, ubicada después de los Ejemplos) para la porción Fc (constante) del anticuerpo con la consiguiente destrucción de la célula tumoral a través de un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Las células NK son una clase de linfocitos que normalmente comprenden aproximadamente el 10 % de los linfocitos en un ser humano. La función principal de las células NK es proporcionar una respuesta inmunitaria celular innata contra el tumor y las células infectadas (objetivo). También se han demostrado y/o se consideran probables funciones en el cebado y regulación de la respuesta inmunitaria humoral, el desarrollo fetal y la eliminación de células normales estresadas o dañadas. Las células NK, que se caracterizan por tener un fenotipo CD3⁺/CD56⁺, muestran una variedad de receptores de superficie celular activadores e inhibidores. La unión o ligadura de un receptor activador de células NK al ligando correspondiente en una célula objetivo hace que la célula NK ejerza un efecto citotóxico directamente contra la célula objetivo y secrete una variedad de citocinas que realizan funciones tales como la estimulación y el reclutamiento de otros elementos del sistema inmunológico para actuar contra el objetivo. Las células NK activadas lisan las células objetivo a través de la secreción de las enzimas perforina y granzima, la estimulación de los receptores iniciadores de la apoptosis y otros mecanismos menos caracterizados.

Los receptores inhibidores de las células NK interactúan predominantemente con las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I ("MHC-I") en la superficie de una célula normal. Cuando interactúan así, estos receptores inhibidores evitan que las células NK se activen. Las moléculas del MHC-I definen a las células como "pertenecientes" a un individuo en particular. Dado que la expresión de estas moléculas del MHC-I puede prevenir la activación de las células NK hacia una célula objetivo, se cree que las células NK pueden ser activadas solo por células en las que faltan estas moléculas del MHC-I "propias" o son defectuosas, como sucede a menudo para células tumorales o infectadas por virus. El fenotipo y el patrón de activación de las células NK son distintos de los que presentan los linfocitos T citotóxicos ("CTL", fenotipo CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺) que son activados por células objetivo que muestran pequeños fragmentos de péptidos extraños derivados de virus o células tumorales unidos a las moléculas del MHC-I de superficie. Los científicos han especulado que las células NK evolucionaron como una respuesta a las células tumorales e infectadas que evaden la destrucción por parte de los CTL a través de la supresión o interrupción de la presentación de moléculas del MHC-I presentadoras de péptidos.

Las células NK se han evaluado como agentes terapéuticos en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Las células NK utilizadas para este fin se aíslan de la fracción de linfocitos de sangre periférica ("PBL") de sangre del sujeto, se expanden en cultivo celular para obtener un número suficiente de células y luego se vuelven a introducir en el sujeto. Aunque los resultados de esta terapia han sido prometedores, la preparación de las células NK autólogas es costosa, laboriosa y requiere mucho tiempo. Además, el control de calidad de estas células se complica porque cada preparación es específica del sujeto. En particular, la cantidad de células NK que pueden aislarse de un sujeto puede variar sustancialmente, y estas células son a menudo deficientes en capacidad proliferativa y/o actividad citotóxica. Otra limitación del uso de células NK como agente terapéutico resulta de la presencia de antígenos superficiales en las células que pueden provocar una respuesta de rechazo inmunitario cuando las células se infunden en un sujeto distinto del que se aislaron. Esto requiere una cuidadosa compatibilidad cruzada del MHC-I entre el donante y el receptor, así como la necesidad de inmunosuprimir al receptor.

La línea de células similar a NK, NK-92, se descubrió en la sangre de un sujeto que padecía un linfoma no Hodgkin. Las células NK-92 carecen de los principales receptores inhibidores que muestran las células NK normales, pero retienen la mayoría de los receptores activadores. La caracterización de la línea de células NK-92 (Gong *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1998) reveló que las células NK-92 son citotóxicas para un espectro significativamente más amplio de tipos de células tumorales e infectadas que las células NK y, además, a menudo exhiben niveles más altos de citotoxicidad

hacia estos objetivos. Sin embargo, las células NK-92 no atacan a las células normales ni provocan una respuesta de rechazo inmunitario. Además, las células NK-92 se pueden cultivar y mantener de manera fácil y estable en cultivo celular continuo y, por lo tanto, se pueden preparar en grandes cantidades bajo un control de calidad compatible con las GMP actuales. Esta combinación de características ha dado como resultado que NK-92 se incorpore a ensayos clínicos actualmente en curso para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer.

Aunque las células NK-92 retienen casi todos los receptores de activación y las vías citolíticas asociadas con las células NK, no expresan el receptor CD16 y, por lo tanto, no pueden lisar las células objetivo a través del mecanismo de ADCC. Esto significa que, a pesar de sus otros beneficios, las células NK-92 no pueden potenciar los efectos antitumorales y antiinfecciosos de los anticuerpos endógenos o exógenos a la manera de las células NK. También se conocen otras líneas de células de tipo NK además de NK-92. Algunas de estas otras líneas de células similares a NK expresan CD16, pero esta expresión es inestable; las células son típicamente difíciles de cultivar en cultivo celular; y pocas exhiben actividad citotóxica robusta. Por estas razones, solo NK-92 de las líneas de células similares a NK actualmente conocidas es un candidato viable como agente terapéutico aunque carece de CD16 y, en consecuencia, de la capacidad de matar células objetivo a través del mecanismo de ADCC.

Por lo tanto, sería una ventaja restaurar la expresión de CD16 y la capacidad de actuar a través del mecanismo de ADCC en las células NK-92, permitiendo así que esas células se usen junto con anticuerpos para fines terapéuticos y relacionados. Sin embargo, se ha descubierto que las líneas de células NK son recalcitrantes a la transferencia de genes, una característica que ha obstaculizado el desarrollo de tales líneas de células con fines terapéuticos o de investigación. Para las células NK-92, se lograron eficiencias de transformación de solo 5-15 % y 10-20 % usando transferencia de genes mediada por partículas o transducción retroviral (Nagashima *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999). Las líneas de células NK-92 que expresan de forma estable el receptor de superficie celular CD16 no están disponibles actualmente.

Shahied et al. J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53907-14 describen que los minicuerpos biespecíficos dirigidos a HER2/neu y CD16 exhiben una lisis tumoral mejorada cuando se colocan en un formato de unión a antígeno tumoral divalente.

Resumen

La invención proporciona un método para la evaluación *in vitro* de la eficacia de un anticuerpo para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), como se define en las reivindicaciones.

El método de la invención utiliza una célula NK-92 modificada para expresar el receptor Fc CD16 (FcγRIII-A) en la superficie de la célula.

La divulgación está dirigida generalmente a células NK-92 modificadas para expresar un receptor Fc en una superficie de la célula; el receptor Fc puede ser un receptor Fcγ activador, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor Fc, tal como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32), FCγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden tener cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluidas las formas de baja y alta afinidad de unión. Las células NK-92 se pueden modificar introduciendo un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2; uno de tales polinucleótidos incluye la SEQ ID NO:3. Las células NK-92 pueden modificarse adicionalmente para expresar uno o más polipéptidos de señalización accesorios asociados, citocinas o fragmentos de los mismos; tal expresión puede correlacionarse con una mayor expresión superficial del receptor Fc. Los polipéptidos de señalización accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO: 5) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 7). La expresión de una citocina (tal como la interleucina 2) también se puede correlacionar con la viabilidad o la citotoxicidad de las células NK-92 modificadas.

También se describen métodos para la evaluación *in vitro* de la eficacia de un anticuerpo para inducir la muerte celular. Dichos métodos incluyen las etapas de exponer una célula objetivo a un anticuerpo (monoclonal (purificado o en sobrenadantes de hibridoma), policlonal, quimérico (como uno que tiene al menos dos dominios de unión a antígeno diferentes (donde un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor Fc), o cualquier otra forma de anticuerpo), exponiendo la célula objetivo a una NK-92 modificada que expresa un receptor Fc; y luego controlar la célula objetivo para detectar citotoxicidad, citólisis o apoptosis, o una combinación de los mismos. Se pueden usar pluralidades de células y anticuerpos. Las células objetivo utilizadas en los métodos pueden tener una tasa apoptótica o de lisis de aproximadamente 5 % - 30 % en presencia de las células NK-92 modificadas en ausencia de anticuerpo. Las relaciones efector:objetivo incluyen de 0.5:1 a 100:1, incluidos 1:1 y 20:1. Las células objetivo en los métodos incluyen SKOV-3, P815, THP-1, U373MG, T98G, AML193, SR91, ALL1 y REH; estas y otras células objetivo pueden modificarse para aumentar la expresión del antígeno al que se une el anticuerpo. Los controles negativos apropiados incluyen el uso de células NK-92 no modificadas.

Las células NK-92 utilizadas en el método de la invención se modifican para expresar un receptor Fc en una superficie de la célula; el receptor Fc es un receptor activador Fcγ, CD16 (FcγRIII-A). El receptor Fc puede tener cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluidas las formas de baja y alta afinidad de unión. Las células NK-92 se pueden modificar introduciendo un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos

un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; uno de tales polinucleótidos incluye la SEQ ID NO:3. Las células NK-92 pueden modificarse adicionalmente para expresar uno o más polipéptidos de señalización accesorios asociados, citocinas o fragmentos de los mismos; tal expresión puede correlacionarse con una mayor expresión superficial del receptor Fc. Los polipéptidos de señalización accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO: 5) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 7). La expresión de una citocina (tal como la interleucina 2) también se puede correlacionar con la viabilidad o la citotoxicidad de las células NK-92 modificadas. Las citocinas también se pueden agregar al ensayo de fuentes exógenas.

La divulgación también está dirigida a métodos para detectar actividad citolítica e inductora de apoptosis, incluyendo el método las etapas de exponer una célula objetivo en ausencia de anticuerpos a una célula NK-92 que expresa un receptor Fc, y luego controlar la célula objetivo para detectar citotoxicidad, citólisis o apoptosis. El control puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citocinas. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueadores, tales como anticuerpos o polipéptidos (o fragmentos de estos) que enmascaran receptores activadores para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

La divulgación también está dirigida a métodos para ensayar la eficacia de un anticuerpo para tratar un tumor, infección u otra lesión, incluyendo el método las etapas de administrar un anticuerpo (o una pluralidad de anticuerpos) a un sujeto, administrar células NK-92 modificadas que expresan un receptor Fc al sujeto; y luego controlar el tumor, infección o lesión. La eficacia del anticuerpo en el tratamiento se correlaciona con la supresión del tumor, infección o lesión en el sujeto. El control puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citocinas. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueadores, tales como anticuerpos o polipéptidos (o fragmentos de estos) que enmascaran receptores activadores para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

El anticuerpo puede ser monoclonal (purificado o en sobrenadantes de hibridoma), policlonal, quimérico (tal como uno que tiene al menos dos dominios de unión a antígeno diferentes (donde un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor Fc) o cualquier otra forma de anticuerpo. Las citocinas (tal como la interleucina 2), o fragmentos de las mismas, pueden expresarse a partir de células NK-92 modificadas o suministrarse de forma exógena. Los sujetos incluyen bovinos (por ejemplo, vacas), cerdos (por ejemplo, cerdos, puercos), conejos, alpacas, caballos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), hurones, ratas, ratones, aves (pollos, pavos) y búfalos. Los sujetos también pueden ser humanos.

Las células NK-92 en este aspecto de la divulgación pueden incluir aquellas modificadas para expresar un receptor Fc en una superficie de la célula; el receptor Fc puede ser un receptor Fcγ activador, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor Fc, tal como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32), FCγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden tener cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluidas las formas de baja y alta afinidad de unión. Las células NK-92 se pueden modificar introduciendo un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2; uno de tales polinucleótidos incluye la SEQ ID NO:3. Las células NK-92 pueden modificarse adicionalmente para expresar uno o más polipéptidos de señalización accesorios asociados, citocinas o fragmentos de los mismos; tal expresión puede correlacionarse con una mayor expresión superficial del receptor Fc. Los polipéptidos de señalización accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO: 5) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 7).

También se describe métodos para tratar a un sujeto, teniendo el sujeto un tumor, infección u otra lesión, incluyendo el método administrar a un sujeto anticuerpos que se unen específicamente al tumor, infección u otra lesión; y luego administrar al sujeto células NK-92 modificadas que expresan un receptor Fc. Una reducción del tumor, infección o lesión indica una respuesta terapéutica. El control puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citocinas. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueadores, tales como anticuerpos o polipéptidos (o fragmentos de estos) que enmascaran el receptor activador para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

El anticuerpo puede ser monoclonal (purificado o en sobrenadantes de hibridoma), policlonal, quimérico (tal como uno que tiene al menos dos dominios de unión a antígeno diferentes (donde un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor Fc) o cualquier otra forma de anticuerpo. Las citocinas (tal como la interleucina 2), o fragmentos de las mismas, pueden expresarse a partir de células NK-92 modificadas o suministrarse de forma exógena. Los sujetos incluyen bovinos (por ejemplo, vacas), cerdos (por ejemplo, cerdos, puercos), conejos, alpacas, caballos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), hurones, ratas, ratones, aves (pollos, pavos) y búfalos. Los sujetos también pueden ser humanos.

Las células NK-92 en este aspecto de la divulgación pueden incluir aquellas modificadas para expresar un receptor Fc en una superficie de la célula; el receptor Fc puede ser un receptor Fcγ activador, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor Fc, tal como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32), FCγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden tener cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluidas las formas de baja y alta afinidad de unión. Las células NK-92 se pueden modificar introduciendo un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 2; uno de tales polinucleótidos incluye la SEQ ID NO:3. Las

células NK-92 pueden modificarse adicionalmente para expresar uno o más polipéptidos de señalización accesorios asociados, citocinas o fragmentos de los mismos; tal expresión puede correlacionarse con una mayor expresión superficial del receptor Fc. Los polipéptidos de señalización accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO: 5) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 7).

- 5 Muchas otras ventajas y características de la presente invención se harán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y sus realizaciones, de las reivindicaciones y de los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Los objetivos, características y ventajas de la presente invención se apreciarán más fácilmente con referencia a la siguiente divulgación cuando se considere junto con los dibujos adjuntos.

- 10 La Figura 1 muestra diagramas de dispersión de citómetro de flujo de células NK-92 transducidas con ADNc con CD16 utilizando el vector pBMN-IRES-EGFP después de la tinción sin anticuerpo primario (Figura 1A) y con anticuerpo primario (anti-CD16) y anticuerpo secundario (Figura 1B). La expresión de EGFP se evalúa en el eje x, y la expresión de CD16 en la superficie está en el eje y.
- 15 La Figura 2 muestra diagramas de dispersión de citómetro de flujo que muestran la expresión de CD16 por células NK-92 transducidas con solo CD16 (Figura 2A), y el aumento en la expresión de CD16 cuando las células NK-92 se transducen con ADNc con CD16 en combinación con ADNc de FcεRI-γ (γ; en el vector pBMN-IRES-EGFP (Figura 2B), o ADNc con CD3 ζ (Figura 2C).
- 20 La Figura 3 es un diagrama gráfico que muestra la citotoxicidad células objetivo P815 con FcγRII/III* por células NK-92-CD16 inducidas por anticuerpo anti-CD16 (3G8), pero no anticuerpos contra CD56 (B159) o KIR (DX9). Las células se ensayaron usando liberación de ⁵¹Cr de las células objetivo P815 en las proporciones indicadas de efector a objetivo.
- 25 La Figura 4 es un diagrama gráfico que ilustra la citotoxicidad redirigida de células objetivo THP-1 con FcγRII/III* por células NK-92-CD16 (símbolos con relleno) inducida por anticuerpo anti-CD16 (3G8; cuadrados), pero no por anticuerpo anti-NKR-PI (B199; triángulos). La citotoxicidad redirigida no fue inducida por anti-CD16 en células NK-92 transducidas con ADNc de IgM de ratón (símbolos sin relleno).
- 30 La Figura 5 es un diagrama gráfico que ilustra la citotoxicidad redirigida de células objetivo SKOV-3 por células NK-92-CD16 (triángulos), pero no NK-92 transducidas con IgM de ratón (cuadrados), inducida por anticuerpo 2B1 biespecífico (símbolos con relleno). 2B1 contiene dominios F(ab) que reconocen tanto el antígeno Her2/neu en las células SKOV-3 como CD16 en NK-92-CD16.
- La Figura 6 es un diagrama gráfico que ilustra la citotoxicidad redirigida de células NoGFP NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ y NK-92-CD16-ζ contra células objetivo P815 en combinación con la concentración indicada de anticuerpo monoclonal biespecífico quimérico 2B1.

Descripción detallada de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

- 35 La presente divulgación está dirigida a líneas de células y métodos que potencian y amplían el alcance efectivo de la respuesta de ADCC. La presente divulgación proporciona una línea de células NK-92 que expresa de forma estable una proteína receptora de superficie celular Fc, tal como CD16. (Se han desarrollado varias nomenclaturas diferentes para referirse a ciertos receptores Fc; se usan indistintamente en el presente documento, incluidos CD16, FCγRIII-A y sus polimorfismos u otras formas que tienen niveles de afinidad variados).
- 40 Muchas empresas de biotecnología están desarrollando actualmente nuevos anticuerpos monoclonales para su uso en inmunoterapias contra el cáncer. La intención de este esfuerzo de desarrollo es preparar anticuerpos que se unan a antígenos proteicos particulares que se expresen de manera única en las superficies de tipos específicos de células tumorales. Las células NK citotóxicas pueden, a su vez, unirse a la región Fc (constante) de estos anticuerpos unidos al tumor a través de los receptores CD16 que se muestran en las células NK e iniciar la lisis de la célula tumoral a través del mecanismo de ADCC. La alta eficacia y especificidad de los agentes terapéuticos basados en este enfoque se ha demostrado clínicamente mediante el uso del anticuerpo monoclonal Herceptina (anti-ErbB2) para el tratamiento de carcinomas de mama que expresan ErbB2 y el uso del anticuerpo monoclonal Rituximab (anti-CD20) para el tratamiento de linfomas de células B. Se están desarrollando muchos otros anticuerpos terapéuticos que se dirigen a una amplia variedad de antígenos adicionales específicos de tumores.
- 50 Una parte esencial del desarrollo de terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos es la determinación *in vitro* de la eficacia y especificidad de la ADCC mediada por células NK que se imparte mediante la unión del anticuerpo a la célula tumoral objetivo. Estas pruebas generalmente se realizan utilizando linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de donantes humanos normales o células NK aisladas de la fracción de sangre de PBL como células efectoras. Además de la carga engorrosa inherente a la obtención y procesamiento rutinario de muestras de sangre humana, existe una variabilidad considerable en la actividad y cantidad de células efectoras obtenidas de diferentes donantes y una variabilidad similar entre muestras obtenidas del mismo donante. Parte de esta variabilidad es intrínseca y surge de la naturaleza policlonal de las células NK. En particular, las variaciones alélicas en la porción extracelular del gen de CD16 pueden resultar en diferencias significativas en la afinidad de CD16 por las porciones Fc
- 55

de los anticuerpos y las diferencias en el estado de activación de las células NK del donante pueden alterar el nivel de expresión de CD16 en la superficie de la célula. La concentración de células NK en la fracción PBL también varía, en parte por razones genéticas y en parte como reflejo del estado fisiológico del donante. Esta variabilidad de las células efectoras complica enormemente la evaluación de los anticuerpos monoclonales como posibles agentes terapéuticos. Además, aunque las células NK que expresan la forma de baja afinidad de unión de CD16 son las más comunes, el isotipo de alta afinidad es lo suficientemente común como para que las pruebas de anticuerpos se realicen utilizando células NK de ambas formas (Koene *et al.*, 1997). La identificación de donantes homocigotos para formas alélicas de CD16 de baja y alta afinidad es una tarea difícil. La disponibilidad de una población de células NK humanas clonales que exprese un nivel constante de actividad de CD16 proporcionaría un beneficio sustancial como efector estándar en la evaluación de anticuerpos para actividad y especificidad de ADCC.

De manera similar, las terapias basadas en anticuerpos pueden beneficiarse de la presencia de células NK que tienen niveles altos conocidos de capacidad de unión a Fc y actividad citotóxica en el sujeto. Además de las variabilidades descritas previamente, a menudo se encuentra que las células NK aisladas de sujetos con cáncer se han vuelto defectuosas, deficientes o ineficaces por las acciones de las células tumorales. Algunos tipos de células tumorales, por ejemplo, pueden matar o desactivar las células NK de una manera específica del sujeto. Otros tipos de células tumorales pueden interferir de manera similar con la producción, actividad y/o especificidad de las células NK. Tal variabilidad hace que la confianza en las células NK del sujeto sea problemática en un entorno terapéutico y sugiere que la coadministración de cantidades conocidas de células NK exógenas que tienen un nivel conocido de actividad junto con un anticuerpo apropiado puede dar como resultado efectos terapéuticos más consistentes. Nuevamente, se espera que la disponibilidad de una población de células NK humanas clonales que exprese un nivel constante de actividad de CD16 proporcione un beneficio sustancial.

Una limitación importante de la utilidad de las células NK es que expresan un repertorio de receptores de la superficie celular que, cuando se unen al ligando del MHC-I correspondiente en una célula objetivo normal, previenen fuerte y específicamente la destrucción de la célula objetivo al inhibir la activación de las células NK, la citotoxicidad y la respuesta de citocinas. Esta inhibición puede anular la activación de las células NK provocada por la unión de los receptores activadores de células NK a sus ligandos conjugados en la célula objetivo. Por lo tanto, una célula NK destruirá una célula objetivo que muestre sólo ligandos activadores, pero no afectará a una célula objetivo que muestre ligandos inhibidores del MHC-I incluso si también hay presentes ligandos activadores.

Casi todas las células de los mamíferos muestran ciertas proteínas polimórficas de la superficie celular del MHC-I en sus superficies. Estas proteínas del MHC-I tienen la función principal de mostrar antígenos peptídicos que son fragmentos derivados de proteínas expresadas dentro de una célula y se clasifican como complejos del MHC-I. Los complejos del MHC que se muestran en las células normales son exclusivos de cada individuo y, a menudo, se los denomina marcadores "propios" para ese individuo. Las células exógenas introducidas por trasplante muestran moléculas del MHC y péptidos asociados que difieren de aquellos del individuo huésped y, por lo tanto, se denominan "no propias". Los complejos de MHC-péptido no propios también pueden aparecer en células aberrantes como resultado de procesos que alteran los péptidos presentados en las moléculas de MHC. En particular, muchas, pero no todas, las células tumorales y las células infectadas muestran péptidos no propios.

Los receptores inhibidores de células NK constan de varias familias de proteínas que reconocen, se unen y se activan para enviar "señales intracelulares negativas" al encontrar proteínas del MHC-I propias intactas en la superficie de una célula objetivo normal propia. Por lo tanto, se evita que las células NK ataquen y destruyan las células normales que muestran la constelación propia del MHC-I apropiada. Las células tumorales e infectadas que muestran esta constelación propia de MHC-I también son inmunes al ataque. Solo las células que no muestran MHC-I o no son propias están sujetas a destrucción por parte de las células NK. Sin embargo, algunos tipos de tumores y células infectadas que no muestran complejos MHC-I propios han desarrollado mecanismos que les permiten escapar de este destino. Los ejemplos de tales mecanismos de escape incluyen la expresión de ligandos de receptores inhibidores de células NK similares al MHC-I sustitutos y la secreción de ligandos solubles que suprimen las funciones de las células NK. Las células tumorales e infectadas que implementan tales mecanismos de escape son refractarias a la lisis mediada por células NK. Por lo tanto, la eficacia de las células NK como agente para la destrucción de células cancerosas está limitada por la presencia de ligandos apropiados del MHC-I para los receptores inhibidores de células NK. La disponibilidad de una población de células NK humanas que no exprese receptores inhibidores de células NK expandiría beneficiosamente la gama de cánceres e infecciones que pueden tratarse usando agentes terapéuticos basados en anticuerpos.

NK-92 es una línea de células similar a NK que inicialmente se aisló de la sangre de un sujeto que padecía un linfoma granular grande y posteriormente se propagó en un cultivo celular. Se ha descrito la línea de células NK-92 (Gong *et al.*, 1994; Klingemann, 2002). Las células NK-92 determinadas tienen un fenotipo CD3/CD56⁺ que es característico de las células NK. Expresan todos los receptores activadores de células NK conocidos excepto CD16, pero carecen de todos los receptores inhibidores de células NK conocidos excepto NKG2A/CD94 e ILT2/LIR1, que se expresan en niveles bajos. Además, NK-92 es una línea de células clonal que, a diferencia de las células NK policlonales aisladas de la sangre, expresa estos receptores de manera uniforme con respecto al tipo y la concentración en la superficie celular. De manera similar, las células NK-92 no son inmunogénicas y no provocan una respuesta de rechazo inmunitario cuando se administran terapéuticamente a un sujeto humano. De hecho, las células NK-92 son bien toleradas en humanos sin efectos perjudiciales conocidos en los tejidos normales. Mientras que las células NK-92, a

diferencia de las células NK y las células de la mayoría de las otras líneas de células similares a NK conocidas, han sido diseñadas para expresar nuevas proteínas por medio de la transducción usando vectores retrovirales (Campbell *et al.*, 2004; Kikuchi-Maki *et al.*, 2003; Klingemann, 2002; Yusa y Campbell, 2003; Yusa *et al.*, 2002; Yusa *et al.*, 2004), dicha modificación ha resultado difícil, como lo demuestran los numerosos fracasos en la modificación de células NK-92 para expresar un receptor Fc. Más particularmente, a pesar de los claros beneficios potenciales que podrían anticiparse a partir de una línea de células NK-92 modificada para expresar CD16, tal modificación genética no se había logrado de hecho hasta la presente divulgación.

Esta combinación única de características convierte a NK-92 en una plataforma adecuada sobre la que se puede construir la presente divulgación. En particular, la falta de receptores inhibidores significa que NK-92 no está restringido por MHC y puede actuar eficazmente contra cualquier célula que muestre un ligando de activación apropiado, independientemente de cualquier ligando inhibidor de MHC-I que también se pueda expresar. La falta de inmunogenicidad junto con la relativa facilidad con la que las células NK-92 pueden crecer en cultivo significa que pueden prepararse a granel y administrarse a cualquier sujeto cuando surja la necesidad. La estabilidad y consistencia de NK-92 lo hace adecuado para su uso como material de referencia y agente terapéutico. Además, la presente divulgación proporciona la capacidad de transducir NK-92 con genes para nuevas proteínas, tales como los receptores Fc, junto con la capacidad de NK-92 para expresar de forma estable estas proteínas, como se explica con más detalle a continuación.

El uso de células NK-92 como terapia para el cáncer se está evaluando actualmente con resultados prometedores en ensayos clínicos en humanos. Los beneficios de las células NK-92 se están explotando aún más a través del desarrollo de variantes de NK-92 genéticamente modificadas que expresan una construcción de proteína que une covalentemente un dominio de unión similar a un anticuerpo a un dominio de señalización tal como TCR- ζ (GenBank acceso No J04132; SEQ ID NO: 6) (TCR- ζ (GenBank acceso No. J04132; SEQ ID NO: 6)) (Klingemann, 2002; Maki *et al.*, 2001; Uherek *et al.*, 2001; Uherek *et al.*, 2002). En estas construcciones, el dominio similar a un anticuerpo está estructurado para unirse específicamente a un antígeno que se expresa en una célula objetivo, mientras que el dominio de señalización es uno que se sabe que desencadena la actividad de las células NK y NK-92 cuando se estimula. Hasta la fecha, se ha demostrado *in vitro* y en modelos animales que la unión del dominio similar a un anticuerpo de una construcción de este tipo a su antígeno en una célula objetivo activa la célula NK-92 de tal manera que rápidamente y de manera eficiente destruye la célula objetivo a través de conjugación directa. Sin embargo, la utilidad de estas construcciones como agentes terapéuticos está limitada por la necesidad de diseñar, preparar y validar una construcción única para cada tipo específico de cáncer o infección a tratar. La disponibilidad de una sola variante de NK-92 que se puede usar para tratar una amplia gama de cánceres e infecciones es de gran utilidad.

Un área en la que se pueden mejorar las células NK-92 se relaciona con el uso de células NK-92 en sujetos, ya que la citotoxicidad, la concentración del receptor en la superficie celular y la supervivencia de las células NK-92, así como la variedad de tipos de células tumorales e infectadas que son atacadas se ha demostrado que aumentan por la presencia de bajas concentraciones de la citocina interleucina 2 (IL-2). El costo de la IL-2 agregada exógenamente necesaria para mantener y expandir NK-92 en cultivo a escala comercial es significativo, mientras que también se sabe que la administración de IL-2 a sujetos humanos en cantidad suficiente para lograr los efectos deseados causa efectos secundarios adversos. Esta limitación ha sido abordada por el desarrollo de líneas de células secretoras de IL-2 NK-92mi y NK-92ci por transducción retroviral de NK-92 con el gen de IL-2 (Klingemann, 2002; Nagashima *et al.*, 1998). Los niveles de IL-2 secretados por estas líneas de células son suficientes para optimizar la supervivencia y la actividad de NK-92, pero están por debajo del nivel generalmente asociado con la aparición de efectos secundarios adversos.

Otra área en la que se pueden mejorar las células NK-92, y el enfoque de la presente divulgación, se refiere al hecho de que la NK-92 no modificada no expresa CD16 y, por lo tanto, es ineficaz para destruir células objetivo a través del mecanismo de ADCC. Aunque las células NK-92 se usan ampliamente como un sistema modelo para el estudio de la activación, acción e inhibición de las células NK, la falta de expresión de CD16 impide el uso de las células NK-92 para la evaluación de la eficacia de los anticuerpos como agentes terapéuticos y el uso de NK-92 como agente terapéutico que se administra conjuntamente con un anticuerpo. La presente divulgación aborda esta limitación haciendo que las células NK-92 expresen CD16. La utilidad y el beneficio adicionales de la presente divulgación se harán evidentes en las siguientes descripciones.

Modificación de las células NK-92

CD16 se encuentra más comúnmente en una forma que tiene una afinidad de unión relativamente baja por la porción Fc de las moléculas de IgG. En algunos individuos se encuentra una forma alternativa que muestra una mayor afinidad de unión. Las formas de baja y alta afinidad de CD16 se diferencian únicamente por la sustitución de valina (alta afinidad) por fenilalanina (baja afinidad) en la posición 157 de la cadena polipeptídica. Las secuencias completas de las formas de baja y alta afinidad se pueden encontrar en la base de datos SwissProt como las entradas P08637 (SEQ ID NO: 1) y VAR_008801 (SEQ ID NO: 2), respectivamente, y se presentan en las Tablas 1 y 2; el polinucleótido que codifica la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 3) se presenta en la Tabla 3.

CD16 se introdujo en células NK-92 por medio de transducción retroviral de la siguiente manera. El ADN complementario que codifica el gen para la forma de baja o alta afinidad de CD16 se subclonó en un vector de

expresión retroviral bicistrónico, pBMN-IRES-EGFP (obtenido de G. Nolan, Universidad de Stanford, Stanford, CA) usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I de acuerdo con métodos estándar (por ejemplo, (Ausubel, 2002; Sambrook y Russell, 2001)). Luego, este vector de expresión se transfectó en la línea de células de empaquetamiento retroviral Phoenix-Amphotropic y el sobrenadante que contenía el virus resultante se usó para transducir células NK-92, aunque se pueden usar los métodos alternativos que incluyen aquellos en los que los vectores incorporan EGFP u otras proteínas fluorescentes (amarillo, rojo, cian, etc.), y la línea de células de empaquetamiento retroviral Phoenix-Amphotropic se obtuvieron y están disponibles para el público en la Universidad Leland Stanford, Stanford, California, Estados Unidos; (Kinsella y Nolan, 1996; Nolan y Kinsella, 1998)). Como se indica a continuación, pueden utilizarse otros vectores y líneas de células de empaquetamiento, tanto los actualmente conocidos como los que puedan desarrollarse en el futuro. Las células NK-92 transducidas que expresan CD16 en su superficie (NK-92-CD16, también conocidas como CD16/Fc ϵ RI γ -NK-92) se separaron de las células NK-92 residuales no transducidas utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Cuando fue apropiado para el uso previsto, las células NK-92-CD16 se subclasificaron adicionalmente sobre la base del nivel de expresión de CD16 usando un FACS, basado en la expresión coordinada de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). Las células NK-92-CD16 resultantes expresan de manera estable CD16 en cultivo celular sin necesidad de una selección periódica de antibióticos.

Tabla 1

Secuencia polipeptídica para la SEQ ID NO:1 (receptor III-A de la región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad [Precursor])

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

ES 2 955 952 T3

Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln
195					200					205					
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly
210					215					220					
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp
225					230					235					240
Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys		
245					250										

Tabla 2
Secuencia polipeptídica para la SEQ ID NO:2 (receptor III-A de la región Fc de inmunoglobulina gamma de la variante 157 F -> V de baja afinidad [Precursor])

Met	Trp	Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala
1				5					10					15	
Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Glu	Pro
			20					25					30		
Gln	Trp	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln
		35					40					45			
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
	50					55					60				
Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr
65					70					75					80
Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu
				85					90					95	
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
			100					105					110		
Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
		115					120					125			
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
130						135					140				

Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Pro	145	150	155	160
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Phe	165	170	175	
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln	180	185	190	
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	195	200	205	
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	210	215	220	
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp	225	230	235	240
Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys			245	250		

Tabla 3

Secuencia de polinucleótidos (ARNm) para la SEQ ID NO:3 (receptor III-A de la región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad [Precursor])

atgtggcagc	tgctcctccc	aactgctctg	ctacttctag	tttcagctgg	catgcggact	60
gaagatctcc	caaaggctgt	ggtgttcctg	gagcctcaat	ggtacagggt	gctcgagaag	120
gacagtgtga	ctctgaagtg	ccaggagagcc	tactcccctg	aggacaattc	cacacagtgg	180
tttcacaatg	agagcctcat	ctcaagccag	gcctcgagct	acttcattga	cgctgccaca	240
gtcgagcaca	gtggagagta	caggtgccag	acaaacctct	ccaccctcag	tgaccgggtg	300
cagctagaag	tccatatcgg	ctggctgttg	ctccaggccc	ctcggtgggt	gttcaaggag	360
gaagacccta	ttcacctgag	gtgtcacagc	tggaagaaca	ctgctctgca	taaggtcaca	420
tatttacaga	atggcaaagg	caggaagtat	tttcatcata	attctgactt	ctacattcca	480
aaagccacac	tcaaagacag	cggctoctac	ttctgcaggg	ggcttttttg	gagtaaaaat	540
gtgtcttcag	agactgtgaa	catcaccatc	actcaaggtt	tggcagtgtc	aaccatctca	600
tcattctttc	cacctgggta	ccaagtctct	ttctgcttgg	tgatggtact	cctttttgca	660
gtggacacag	gactatatatt	ctctgtgaag	acaaacattc	gaagctcaac	aagagactgg	720
aaggaccata	aatttaaattg	gagaaaggac	cctcaagaca	aatga		765

5 Vectores de expresión recombinante y células huésped

Los vectores son herramientas que se utilizan para transportar el ADN entre las células huésped o como un medio para expresar una secuencia de polinucleótidos. Insertar el ADN de interés, tal como una secuencia de *CD16* o un fragmento, se logra mediante técnicas de ligamiento y/o protocolos de apareamiento bien conocidos por los expertos en la materia. Tal ADN se inserta de manera que su integración no rompa ningún componente necesario del vector. En el caso de los vectores que se usan para expresar el ADN insertado como un polipéptido, el ADN introducido se une operativamente a los elementos del vector que gobiernan su transcripción y traducción.

Los vectores se pueden dividir en dos clases generales: Los vectores de clonación son plásmidos o fagos replicantes con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula huésped adecuada y en las que se puede insertar ADN extraño; el ADN extraño se replica y propaga como si fuera un componente del vector. Se usa un vector de expresión (tal como un genoma de virus de plásmido, levadura o animal) para introducir material genético extraño en una célula o tejido huésped para transcribir y traducir el ADN extraño. En los vectores de expresión, el ADN introducido se une operativamente a elementos, tales como promotores, que envían una señal a la célula huésped para que transcriba el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, tal como los promotores inducibles que controlan la transcripción de genes en respuesta a factores específicos. La unión operativa de un polinucleótido de *CD16* a un promotor inducible puede controlar la expresión de un gen o fragmentos de *CD16*. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen aquellos que son específicos de tejido, que relegan la expresión a ciertos tipos de células, que responden a esteroides (por ejemplo, glucocorticoides (Kaufman, 1990) y tetraciclina), o reactivo de choque térmico. Algunos sistemas de represión bacteriana, tal como el operón *lac*, han sido explotados en células de mamíferos y animales transgénicos (Fieck *et al.*, 1992; Wyborski *et al.*, 1996; Wyborski y Short, 1991). Otros promotores inducibles deseables incluyen aquellos que no son endógenos a las células en las que se está introduciendo la construcción, pero que, sin embargo, responden en aquellas células cuando el agente de inducción se suministra de forma exógena.

Los vectores tienen muchas manifestaciones. Un "plásmido" es una molécula circular de ADN de doble cadena que puede aceptar fragmentos de ADN adicionales. Los vectores virales también pueden aceptar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped y se replican como parte del genoma huésped. En general, los vectores de expresión útiles son plásmidos y vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con defectos de replicación); también se pueden usar otros vectores de expresión.

La elección del vector está dictada por los organismos o células que se utilizan y el destino deseado del vector. Los vectores pueden replicarse una vez en las células objetivo o pueden ser vectores "suicidas". En general, los vectores comprenden secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores, promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Los vectores suelen utilizar un marcador seleccionable para facilitar la identificación de aquellas células que han incorporado el vector. La Tabla F resume muchos de los marcadores disponibles.

"Célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente. Dichos términos se refieren no sólo a una célula objetivo particular sino también a la progenie o progenie potencial de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún así se incluye dentro del alcance del término.

Los métodos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son bien conocidos en la técnica (véanse los ejemplos en la Tabla B). La elección de la célula huésped dicta la técnica preferida para introducir el polinucleótido de interés. La introducción de polinucleótidos en un organismo también se puede hacer con técnicas *ex vivo* que utilizan un método de transfección *in vitro*, así como técnicas genéticas establecidas, si las hubiere, para ese organismo en particular. Dichos procedimientos pueden emplearse de manera similar para la transducción de células NK-92 genéticamente modificadas, incluidas NK-92-CD16-γ, NK-92-CD16-ζ, NK-92mi y NK-92ci. Las líneas de células NK-92, NK-92mi y NK-92ci están depositadas en la American Type Culture Collection con los números de depósito CRL-2407, CRL-2408 y CRL-2409, respectivamente. NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ, NK-92-CD16-ζ y NK-92-CD16(F157V) se están enviando a la American Type Culture Collection.

Tabla A
Métodos para introducir polinucleótidos en las células

Células	Métodos	Referencias	Notas
Células de mamífero	Transfección con fosfato de calcio	Solución salina tamponada con ácido <i>N</i> -(2-Hidroxietil)piperazin- <i>N'</i> -(2-etanosulfónico) (HEPES) (Chen y Okayama, 1988; Graham y van der Eb, 1973; Wigler <i>et al.</i> , 1978) Solución tamponada con BES (ácido <i>N,N</i> -bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) (Ishiura <i>et al.</i> , 1982)	Las células pueden recibir un "choque" con glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar la eficacia de la transfección (Ausubel, 2002).
	Transfección con dietil-aminoetilo (DEAE)-dextrano	(Fujita <i>et al.</i> , 1986; Lopata <i>et al.</i> , 1984; Selden <i>et al.</i> , 1986)	Más útil para transfecciones transitorias, pero no estables. La cloroquina se puede utilizar para aumentar la eficiencia.
	Electroporación	(Neumann <i>et al.</i> , 1982; Potter, 1988; Potter <i>et al.</i> , 1984; Wong y Neumann, 1982)	Especialmente útil para linfocitos difíciles de transfectar.

Células	Métodos	Referencias	Notas
	Transfección de reactivo de lípido catiónico	(Elroy-Stein y Moss, 1990; Felgner <i>et al.</i> , 1987; Rosa <i>et al.</i> , 1991; Whitt <i>et al.</i> , 1990)	Aplicable a la transfección tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .

Tabla A

Métodos para introducir polinucleótidos en las células			
Células	Métodos	Referencias	Notas
	Retroviral	Producción ejemplificada por (Cepko <i>et al.</i> , 1984; Miller and Buttimore, 1986; Pear <i>et al.</i> , 1993). Infection <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> : (Austin and Cepko, 1990; Bodine <i>et al.</i> , 1991; Fekete and Cepko, 1993; Koehne <i>et al.</i> , 2003; Lemischka <i>et al.</i> , 1986; Turner <i>et al.</i> , 1990)	Proceso largo, muchas líneas de empaque disponibles en ATCC. Aplicable a ambos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> transfección.
	Polibreno	(Chaney <i>et al.</i> , 1986; Kawai y Nishizawa, 1984)	Se puede utilizar para establecer líneas de células que portan copias integradas de secuencias de ADN de DFF. PCT/US2005/024229
	Microinyección	(Capecchi, 1980)	
	Fusión de protoplastos	(Rassoul Zadegan <i>et al.</i> , 1982; Sandri Goldin <i>et al.</i> , 1981; Schaffner, 1980)	

Se han utilizado otros vectores y líneas de células de empaquetamiento en la preparación de variantes genéticamente modificadas de células NK-92 (Klingemann, 2002; Nagashima *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999; Uherek *et al.*, 2002) y pueden usarse de manera equivalente en este documento. Los sistemas de transducción retroviral distintos de los de los Ejemplos discutidos a continuación también se han utilizado con éxito para transducir una variedad de genes en células NK-92. A modo de ejemplo, estos métodos alternativos incluyen, entre otros, el vector p-JET junto con células de empaquetamiento FLYA13 (Gerstmayer *et al.*, 1999), el sistema de transducción retroviral *kat* basado en plásmidos y DFG-hIL-2-neo/CRIP (Nagashima *et al.*, 1998). También se practica la electroporación y la introducción de "pistola de genes" del vector en las células de empaquetamiento. El uso del vector pBMN-IRES-EGFP en combinación con la línea de células de empaquetamiento Phoenix-Amphotropic es conveniente para el propósito de este y los siguientes ejemplos porque proporciona altas eficiencias de transfección de células Phoenix-Amphotropic; el uso de promotores Moloney LTR da como resultado un alto nivel de expresión de CD16; el virus se produce en títulos elevados; la eficiencia de la transducción de NK-92 se mejora con respecto a otros vectores que se han usado para transducir NK-92; y el vector proporciona espacio adecuado para acomodar el ADNc con CD16 o insertos alternativos. El vector pBMN-IRES-EGFP incorpora además genes para la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), que se puede utilizar como marcador sustituto endógeno para la expresión génica. La línea de células Phoenix expresa de manera estable este vector en forma episomal junto con la producción de otros componentes virales, lo que permite que las células produzcan virus de manera estable durante un período de tiempo prolongado. Es importante destacar que las publicaciones descritas anteriormente (Klingemann, 2002; Nagashima *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999; Uherek *et al.*, 2002) han establecido que se pueden usar sistemas retrovirales alternativos para introducir ADNc en NK-92.

Una "secuencia homóloga de polinucleótidos" o "secuencia homóloga de aminoácidos", o variaciones de las mismas, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de polinucleótidos o de aminoácidos. Las secuencias de polinucleótidos homólogas codifican aquellas secuencias que codifican isoformas de CD16. Diferentes genes pueden codificar isoformas tales como secuencias de polinucleótidos de CD16 homólogas de especies distintas a los ratones, incluidos otros vertebrados, tales como seres humanos, ranas, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos y otros organismos. Las secuencias de polinucleótidos homólogas también incluyen variaciones alélicas naturales y mutaciones de las SEQ ID NOS: 1 o 2. Las secuencias de polinucleótidos homólogas pueden codificar sustituciones de aminoácidos conservadoras en las SEQ ID NOS: 1 o 2.

También se pueden utilizar las moléculas de polinucleótidos de CD16 que difieren de la secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:3, debido a la degeneración del código genético y, por lo tanto, codifican el mismo CD16 que el codificado por la secuencia de polinucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Cualquier molécula de polinucleótido que codifique un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NOS: 1 o 2 es útil para modificar las células NK-92.

Además de la secuencia de polinucleótidos de CD16 que se muestra en la SEQ ID NO:3, los polimorfismos de la secuencia de ADN que cambian las secuencias de aminoácidos de CD16 también pueden ser útiles para modificar las células NK-92. Por ejemplo, las variaciones alélicas entre individuos presentan polimorfismos genéticos en los genes de CD16.

Además, los genes de CD16 de otras especies que tienen una secuencia de polinucleótidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO:3 se contemplan como útiles en los métodos de la invención.

"Polinucleótido variante de CD16" o "secuencia de polinucleótido variante de CD16" se refiere a una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido CD16 que (1) tiene al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia de polinucleótidos con una secuencia de ácido de polinucleótido que codifica un CD16 nativo de longitud completa, (2) un CD16 nativo de longitud completa que carece del péptido señal, (3) un dominio extracelular de un CD16, con o sin el péptido señal, o (4) cualquier otro fragmento de un CD16 de longitud completa. Normalmente, un polinucleótido variante de CD16 tendrá al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia de polinucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 71 % - 99 % de identidad de secuencia de polinucleótidos y aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % e incluso más preferiblemente, 99 % de identidad de secuencia de polinucleótidos con la secuencia de polinucleótidos que codifica un CD16 nativo de longitud completa. Un polinucleótido variante de CD16 puede codificar CD16 nativo de longitud completa que carece del péptido señal, un dominio extracelular de CD16, con o sin la secuencia señal, o cualquier otro fragmento de un CD16 de longitud completa.

Ordinariamente, las variantes de *CD16* tienen al menos aproximadamente 30 polinucleótidos, a menudo al menos aproximadamente 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600 polinucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 900 polinucleótidos de longitud, o más.

El "porcentaje (%)" de identidad de secuencia de polinucleótidos" con respecto a las secuencias de polinucleótidos que codifican CD16 se define como el porcentaje de polinucleótidos en la secuencia de polinucleótidos de CD16 de interés que son idénticos a los polinucleótidos en una secuencia candidata, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento se puede lograr de varias formas bien conocidas en la técnica; por ejemplo, utilizando software disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Cuando las secuencias de polinucleótidos están alineadas, el % de identidad de secuencia de polinucleótidos de una secuencia de polinucleótidos dada C para, con o contra una secuencia de polinucleótidos D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de polinucleótidos C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de polinucleótidos para, con o contra una secuencia de polinucleótidos dada D) se puede calcular como:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de polinucleótidos} = W/Z * 100$$

dónde

W es el número de polinucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por la alineación de C y D del programa de alineación de secuencias o del algoritmo y
Z es el número total de polinucleótidos en D.

Cuando la longitud de la secuencia de polinucleótidos C no es igual a la longitud de la secuencia de polinucleótidos D, el % de identidad de secuencias de polinucleótidos de C a D no será igual al % de identidad de secuencias de polinucleótidos de D a C.

Homólogos u otras secuencias relacionadas (por ejemplo, parálogos) pueden obtenerse mediante hibridación de baja, moderada o alta rigurosidad con la totalidad o una parte de la secuencia particular utilizada como sonda utilizando métodos de hibridación y clonación de polinucleótidos bien conocidos en la técnica.

Además de las variantes alélicas naturales de los polinucleótidos de CD16, se pueden introducir cambios por mutación en la SEQ ID NO: 3 que incurrir en alteraciones en la secuencia de aminoácidos de CD16 pero no alteran la función de CD16 para los fines de la invención. Por ejemplo, las sustituciones de polinucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" se pueden realizar en la SEQ ID NOS: 1 o 2. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar de la secuencia de tipo silvestre de CD16 sin alterar la función de CD16 en los métodos y composiciones de la invención, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que se conservan entre los aminoácidos de CD16 de la divulgación son particularmente no susceptibles de alteración (Tabla 9).

Las sustituciones conservadoras útiles se muestran en la Tabla B, "sustituciones preferidas". Las sustituciones conservadoras en las que un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo caen dentro del alcance de la presente invención siempre que la sustitución no altere materialmente la actividad del compuesto en los métodos de la invención. Si tales sustituciones dan como resultado tal cambio, entonces se introducen cambios más sustanciales, indicados en la Tabla C como ejemplo, y se examinan los productos para la actividad de CD16 para los métodos de la invención.

Tabla B
Sustituciones preferidas

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
áspid (D)	Glu	Glu
Cis (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones no conservadoras que afectan (1) la estructura de la cadena principal del polipéptido, tal como una lámina β o una conformación helicoidal α , (2) la carga o (3) la hidrofobicidad, o (4) la mayor parte de la cadena lateral del sitio objetivo puede modificar la función del polipéptido CD16 o la identidad inmunológica. Los residuos se dividen en grupos de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral, como se indica en la Tabla A. Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones pueden introducirse en sitios de sustitución conservadores o más preferiblemente en sitios no conservados.

Tabla C

Clases de aminoácidos

Clase	Aminoácidos
hidrófobo	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
hidrófilo neutro	Cys, Ser, Thr
ácido	Asp, Glu
básico	Asn, Gln, His, Lys, Arg
conformación de la cadena alterada	Gly, Pro
aromático	Trp, Tyr, Phe

Los polipéptidos variantes pueden prepararse utilizando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), exploración de alanina y mutagénesis por PCR. Mutagénesis dirigida al sitio (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción (Wells et al., 1985) u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para producir variantes de CD16 (Ausubel, 2002; Sambrook y Russell, 2001).

Variantes del polipéptido CD16

"Variante del polipéptido CD16" significa un polipéptido CD16 que tiene al menos: (1) aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de CD16 nativa de longitud completa, (2) una secuencia de CD16 que carece de un péptido señal, (3) un dominio extracelular de un CD16, con o sin un péptido señal, o (4) cualquier otro fragmento de una secuencia de CD16 de longitud completa. Por ejemplo, las variantes de CD16 incluyen aquellas en las que se añaden o suprimen uno o más residuos de aminoácidos en el extremo terminal N o C de la

- secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Una variante del polipéptido CD16 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia nativa de longitud completa de la secuencia de CD16. Normalmente, los polipéptidos variantes de CD16 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos unos 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o 300 aminoácidos de longitud, o más.
- El "porcentaje (%)" de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia de CD16 en una secuencia candidata cuando las dos secuencias están alineadas. Para determinar el % de identidad de aminoácidos, las secuencias se alinean y, si es necesario, se introducen huecos para conseguir el % máximo de identidad de secuencia; las sustituciones conservadoras no se consideran parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineación de secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se puede usar software disponible públicamente tal como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear secuencias de polipéptidos. Los expertos en la técnica determinarán los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan.
- Cuando las secuencias de aminoácidos están alineadas, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia dada A de aminoácidos para, con o contra una secuencia dada B de aminoácidos (que alternativamente puede expresarse como una secuencia dada A de aminoácidos que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia dada B de aminoácidos) se puede calcular como:
- $$\% \text{ identidad de secuencia de polinucleótido} = X/Y * 100$$
- dónde
- X es el número de residuos de aminoácidos clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias o la alineación del algoritmo de A y B
y
Y es el número total de residuos de aminoácidos en B.
- Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.
- Un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" CD16 comprende CD16 fusionado con un polipéptido que no es CD16. Un polipéptido que no es CD16 no es sustancialmente homólogo a CD16 (SEQ ID NOS: 1 o 2). Un polipéptido de fusión CD16 puede incluir cualquier porción de un CD16 completo, incluyendo cualquier cantidad de porciones biológicamente activas.
- Los polipéptidos de fusión se pueden crear fácilmente usando métodos recombinantes. Un polinucleótido que codifica CD16 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 3) se puede fusionar en marco con un polinucleótido que no codifica CD16, al extremo terminal N o C de CD16, o internamente. Los genes de fusión también se pueden sintetizar mediante técnicas convencionales, incluidos los sintetizadores de ADN automatizados y la amplificación por PCR utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y amplificarse nuevamente para generar una secuencia quimérica de genes (Ausubel, 2002). Muchos vectores están disponibles comercialmente que facilitan la subclonación de CD16 en marco a una fracción de fusión.
- ### Medición de la citotoxicidad
- A continuación se presentan algunos ejemplos de medición de la citotoxicidad, pero se puede usar cualquier ensayo de citotoxicidad.
- Las células NK-92-CD16 se pueden utilizar en ensayos de ADCC como una población pura de células "efectoras" que tiene características definidas y consistentes. En algunos casos, puede ser deseable seleccionar y usar células que muestren niveles intermedios de expresión de CD16. En particular, dichas células intermedias pueden ser útiles para generar curvas de respuesta a la dosis y como calibradores de tipo "escalera" para la actividad de CD16. Las células NK-92 transducidas con las formas de CD16 de baja y alta afinidad también podrían usarse para estos fines.
- Dichos ensayos *in vitro* se emplean comúnmente para fines tales como la determinación de la eficacia de los anticuerpos que se están desarrollando como posibles agentes terapéuticos. Los ensayos de ADCC normalmente se realizan cargando las células objetivo con un material indicador tal como [⁵¹Cr] o un quelato de europio; tratar las células objetivo cargadas con indicador con el anticuerpo a evaluar; y exponer estas células a células efectoras NK-

92-CD16. La lisis de las células objetivo se indica mediante la liberación del material indicador en el sobrenadante del ensayo, donde su concentración puede medirse mediante un método adecuado, tal como el recuento por centelleo (^{51}Cr) o intensidad de fluorescencia o determinación del tiempo de vida (quelato de europio). La eficacia también puede evaluarse mediante la medición de indicadores sustitutos tales como la liberación de citocinas por parte de las células NK-92-CD16; la sobreexpresión de marcadores de activación de células NK, tales como CD25, CD69 y/o CD95L; activación de factores de transcripción de células NK-92, tales como NF-AT o NF- κB ; o la activación de caspasas u otros marcadores de apoptosis en las células objetivo. Las células NK-92 parentales deficientes en CD16 sirven como control único y valioso en dichos ensayos, ya que permiten diferenciar entre la citotoxicidad mediada por ADCC y otros efectos citolíticos que las células NK-92 ejercen sobre las células objetivo. Las células objetivo preferidas en los ensayos de ADCC son aquellas que expresan un antígeno que es apropiado para el anticuerpo que se está evaluando y que tienen baja susceptibilidad a la lisis por parte de la línea de células NK-92 parental. Si tal línea de células objetivo no está convenientemente disponible, otras líneas de células adecuadas, tales como la línea de carcinoma de ovario SKOV-3 (por ejemplo, ATCC depósito HTB-77) (Tam *et al.*, 1999), a veces pueden usarse como un sustituto viable, particularmente si se transducen/transfectan de manera que expresen el antígeno específico requerido. Entre las líneas de células que han demostrado ser adecuadas para su uso en ensayos de citotoxicidad mediada por ADCC se encuentran U373MG y T98G (por ejemplo, ATCC depósito CRL-1690) (Komatsu y Kajiwara, 1998); AML-193 (mielóide; por ejemplo, ATCC depósito CRL-9589) y SR-91 (progenitor linfóide) (Gong *et al.*, 1994); y ALL1 y REH (leucemia linfocítica aguda de células B) (Reid *et al.*, 2002). Otros tipos de células objetivo tales como la línea de células de mastocitoma murino Fc γ RII/III $^{+}$ P815 (por ejemplo, ATCC depósito No. TIB-64); y la línea de leucemia mielocítica Fc γ RII/III $^{+}$ THP-1 (por ejemplo, ATCC depósito No. TIB-202) que tiene una susceptibilidad limitada (entre 5 y 30 %) a la lisis por células NK-92 no modificadas se utilizan preferiblemente cuando se va a determinar la citotoxicidad redirigida o ADCC para garantizar un intervalo dinámico de ensayo suficiente para la detección de efectos significativos a través de CD16. También pueden emplearse como objetivos otros tipos de células con un potencial citolítico limitado que expresan o se modifican para expresar marcadores de superficie celular específicos de interés. Además, la capacidad citolítica de referencia de NK-92 puede reducirse disminuyendo la concentración de IL-2 en los cultivos y/o analizando cuatro días después de pasar las células a medio fresco que contiene IL-2. La funcionalidad de CD16 introducido en las células NK-92-CD16, NK-92-CD16-y o NK-92-CD16- ζ se puede determinar usando el ensayo de citotoxicidad del Ejemplo 4 en formato ADCC o de "citotoxicidad redirigida". Los anticuerpos monoclonales que se unen a CD16 se pueden usar para evaluar la función del receptor en las células NK-92 en un ensayo de citotoxicidad redirigida, en el que la porción F(ab) del anticuerpo se une al receptor en la célula NK y la porción Fc se une a los receptores Fc en células objetivo apropiadas (Fc γ RII/III en células objetivo P815 o THP-1). Se puede probar otra forma de citotoxicidad redirigida utilizando un anticuerpo biespecífico quimérico, tal como 2B1 (Clark *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1995a; Weiner *et al.*, 1995b), que expresa dos regiones F(ab), una que se une a CD16 en la célula NK-92 y otra que se une al antígeno Her2/neu en una línea de células objetivo apropiada, tal como SKOV-3. Además, los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a antígenos que se expresan de forma única en las células objetivo pueden analizar directamente la ADCC. En este formato, la porción F(ab) del anticuerpo se une al ligando correspondiente en la célula objetivo mientras que el receptor de CD16 en las células NK-92-CD16 se une a la porción Fc del anticuerpo. El entrecruzamiento resultante entre el antígeno en la célula objetivo y el receptor de CD16 da como resultado la lisis de la célula objetivo a través de la ruta de ADCC.

Para algunos propósitos, particularmente en relación con la evaluación de anticuerpos bifuncionales o polifuncionales o en el estudio de los mecanismos de activación y otras características de las células NK-92, puede ser útil reestructurar el ensayo de ADCC descrito anteriormente como un ensayo de "citotoxicidad redirigida". Por ejemplo, un anticuerpo bifuncional que tiene un dominio que se une específicamente a un antígeno de interés en las células objetivo y un segundo dominio que se une específicamente a CD16 en las células NK-92-CD16 puede evaluarse de la manera descrita anteriormente. En este caso, el anticuerpo bifuncional entrecruza el antígeno de la célula objetivo con CD16 en la célula NK-92-CD16 y desencadena una respuesta de ADCC. El mismo ensayo con fines de investigación puede, por ejemplo, tratar una célula objetivo que expresa CD16 u otro receptor de Fc con un anticuerpo tal como anti-CD16 que se dirige contra este receptor. La exposición de las células objetivo marcadas con anti-CD16 a células NK-92-CD16 da como resultado el entrecruzamiento de los receptores en ambas células con la consiguiente activación de ADCC. La diferenciación entre los formatos de citotoxicidad de ADCC y redirigidos se basa en si el receptor de CD16 de la célula efectora se une a la porción Fc de un anticuerpo (ADCC) o si este mismo receptor se une a la porción F(ab) de un anticuerpo anti-CD16 (citotoxicidad redirigida). Dado que ambos arreglos de unión pueden desencadenar respuestas de citotoxicidad similares en la célula objetivo, la elección entre los formatos de ADCC y redirigido es en gran medida una cuestión de conveniencia.

En algunos casos, puede ser ventajoso bloquear los receptores de activación conocidos en las células NK-92; dichos métodos y agentes son bien conocidos; véase por ejemplo (Pende *et al.*, 1999; Pesino *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1998). Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos de enmascaramiento (Pessino *et al.*, 1998).

En presencia de un anticuerpo apropiado, las células NK-92-CD16 pueden lisar de forma eficaz y eficiente las células objetivo. CD16 en células NK está asociado de forma no covalente en la membrana plasmática con homodímeros o heterodímeros de las proteínas de señalización accesorias Fc ϵ RI- γ (GenBank número de acceso M33195; SEQ ID NO: 4 (polinucleótido) y la SEQ ID NO: 5 (polipéptido)) o TCR- ζ (GenBank número de acceso J04132; SEQ ID NO: 6 (polinucleótido); SEQ ID NO: 7 (polipéptido)); estas secuencias se presentan en las Tablas 4-7. La discusión sobre la identidad de la secuencia también se aplica a las SEQ ID NOS: 4-7; por lo tanto, aquellos polinucleótidos o polipéptidos

- de las SEQ ID NOS: 4-7 que tienen aproximadamente al menos 70 % -100 % de identidad de secuencia, así como 80 % -90 % y 81 % , 82 % , 83 % , 84 % , 85 % , 86 % , 87 % , 88 % , 89 % , 90 % , 91 % , 92 % , 93 % , 94 % , 95 % , 96 % , 97 % , 98 % y 99 % de identidad de secuencia son útiles para los métodos de la invención. Cuando son estimuladas por la unión de Fc a CD16, estas proteínas de señalización accesorias pueden transducir señales intracelulares que activan la citotoxicidad de las células NK y las actividades de liberación de citocinas. Además, apoyan la expresión superficial de CD16. La actividad de señalización iniciada a través de ζ y γ sirve para desencadenar respuestas de ADCC. Fc ϵ RI- γ y/o TCR- ζ pueden introducirse conjuntamente convenientemente en células NK-92 mediante transducción secuencial con ADNc con CD16 y Fc ϵ RI- γ y/o TCR- ζ de la manera descrita anteriormente. En este proceso, generalmente es deseable eliminar el gen de EGFP del vector que contiene el ADNc con CD16. El proceso de transducción secuencial consiste en transducir las células NK-92 parentales con el vector de CD16; inmunotinción de las células transducidas con un anticuerpo anti-CD16 marcado con fluorescencia; clasificar las células para la expresión de CD16; transducir las células NK-92-CD16 con un vector que contiene ADNc tanto para la proteína accesorio como para EGFP; y clasificar las células doblemente transducidas sobre la base de la expresión de EGFP. Las células NK-92 doblemente transducidas resultantes (NK-92-CD16/ γ o NK-92-CD16/ ζ , respectivamente) generalmente exhiben niveles más altos de expresión de CD16 en la superficie y mayor citotoxicidad y actividades de liberación de citocinas que las células NK-92-CD16.

Tabla 4

Secuencia de polinucleótidos de Fc ϵ RI- γ (SEQ ID NO: 4)

cagaacggcc gatctccagc ccaagatgat tccagcagtg gtcttgctct tactctcttt	60
ggttgaaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc tatatcctgg atgccatcct	120
gtttctgtat ggaattgtcc tcacctctct ctactgtcga ctgaagatcc aagtgcgaaa	180
ggcagctata accagctatg agaaatcaga tgggtgtttac acgggcctga gcaccaggaa	240
ccaggagact tacgagactc tgaagcatga gaaaccacca cagtagcttt agaatagatg	300
cggtcataatt cttctttggc ttctggttct tccagccctc atggttgga tcacatatgc	360
ctgcatgcca ttaacaccag ctggccctac ccctataatg atcctgtgtc cttaaattaat	420
atacaccagt ggttcctcct ccctgttaaa gactaatgct cagatgctgt ttacggatat	480
ttatatctta gtctcactct cttgtccac cttctctctc tccccattc ccaactccag	540
ctaaaaatatg ggaagggaga accccaata aaactgccat ggactggact c	591

Tabla 5

Secuencia del polipéptido Fc ϵ RI- γ (SEQ ID NO: 5)

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

Tabla 6

Secuencia del polinucleótido TCR-ζ (SEQ ID NO: 6)

cttttctcct aaccgtcccg gccaccgctg cctcagcctc tgcctcccag cctctttctg	60
agggaaagga caagatgaag tggaaaggcg ttttcaccgc ggccatcctg caggcacagt	120
tgccgattac agaggcacag agctttggcc tgctggatcc caaactctgc tacctgctgg	180
atggaatcct cttcatctat ggtgtcattc tcaactgcctt gttcctgaga gtgaagtcca	240
gcaggagcgc agagcccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca	300
atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga	360
tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag	420
ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg	480
ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc	540
acatgcaggc cctgccccct cgctaacagc caggggattt caccactcaa aggccagacc	600
tgcagacgcc cagattatga gacacaggat gaagcattta caaccgggt cactcttctc	660
agccactgaa gtattcccct ttatgtacag gatgctttgg ttatatattag ctccaaacct	720
tcacacacag actgttgtcc ctgcactctt taaggagtg tactcccagg gcttacggcc	780
ctgccttggg ccctctggtt tgccggtggt gcaggtagac ctgtctcctg gcggttcctc	840
gttctccctg ggaggcgggc gcaactgcctc tcacagctga gttgttgagt ctgttttgta	900
aagtccccag agaaagcgca gatgctagca catgccctaa tgtctgtatc actctgtgtc	960
tgagtggcct cactcctgct gtaaatttgg cttctgttgt caccttcacc tcctttcaag	1020
gtaactgtac tgggccatgt tgtgcctccc tggtagagag gccgggcaga ggggcagatg	1080
gaaaggagcc taggccaggt gcaaccaggg agctgcaggg gcatgggaag gtgggcgggc	1140
aggggagggg cagccagggc ctgcgagggc agcgggagcc tccctgcctc aggcctctgt	1200
gccgcaccat tgaactgtac catgtgctac agggggcaga agatgaacag actgaccttg	1260
atgagctgtg cacaaagtgg cataaaaaac agtgtggtta cacagtgtga ataaagtgtc	1320
gcggagcaag aggaggccgt tgattcactt cacgctttca gcgaatgaca aaatcatctt	1380
tgtgaaggcc tcgcaggaag acgcaacaca tgggacctat aactgcccag cggacagtgg	1440
caggacagga aaaaccgctc aatgtactag gg	1472

Tabla 7

Secuencia del polipéptido TCR- ζ (SEQ ID NO: 7)															
Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu
1			5					10				15			
Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys
			20					25				30			
Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala
			35				40					45			
Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro	Ala	Tyr
	50					55					60				
Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
65					70				75					80	
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
				85					90					95	
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu
			100					105					110		
Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys
			115				120					125			
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu
	130					135					140				
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu
145					150					155					160
5	Pro	Pro	Arg												

Las células NK-92 se usan ampliamente como un sistema modelo para el estudio de la activación, acción e inhibición de las células NK, ya que expresan de manera estable un conjunto definido de receptores activadores de células NK conocidos, incluidos NKp46, NKp44, 2B4 y NKG2D, pero que carecen de CD16, activando KIR y NKG2C. Más importante aún, también carecen de casi todos los receptores inhibidores de células NK conocidos, excepto los niveles bajos de NKG2A/CD94 e ILT2/LIR1. Esta es una gran ventaja de la presente invención ya que las moléculas del MHC de clase I, que se expresan en la mayoría de las células y sirven como ligandos para los receptores inhibidores de células NK, no inhiben eficazmente la activación de las células NK-92. Además, la presente invención restablece el receptor activador de CD16 en las células NK-92, aumentando así la gama de ligandos activadores a los que responden estas células. Tanto los receptores activadores como los receptores inhibidores residuales pueden bloquearse selectivamente mediante el tratamiento de las células efectoras con los anticuerpos monoclonales apropiados o los fragmentos F(ab')₂ correspondientes, tales como 3.43.13 (anti-NKp44), 9E2 (anti-NKp46), 158 (anti-2B4) y 3G8 (anti-CD16). La capacidad de bloquear de forma selectiva receptores individuales o grupos de receptores junto con células objetivo que difieren en la susceptibilidad a la lisis por parte de las células NK-92 (y sus derivados) facilita el estudio de los muchos mecanismos implicados en la activación e inhibición de las células NK.

Anticuerpos (Ab)

La invención hace uso de Ab y fragmentos de anticuerpos, tales como F_{ab} o (F_{ab})₂, que se unen inmunoespecíficamente a sus epítopos.

"Anticuerpo" (Ab) comprende Ab individuales dirigidos contra un epítipo, composiciones anti-Ab con especificidad de poliepitopo, anti-Ab de cadena sencilla y fragmentos de Ab. Un "anticuerpo monoclonal" se obtiene de una población de Ab sustancialmente homogéneos, es decir, los Ab individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los ejemplos de Ab incluyen

Ab policlonales (pAb), monoclonales (mAb), humanizados, biespecíficos (bsAb), quiméricos y heteroconjugados. Los anticuerpos pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica u obtenerse comercialmente.

Ab monovalentes

Los Ab pueden ser Ab monovalentes que, en consecuencia, no se entrecruzan entre sí. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina (Ig) y cadenas pesadas modificadas. Truncamientos de cadenas pesadas generalmente en cualquier punto de la región F_C evitará el entrecruzamiento de cadenas pesadas. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo de aminoácido o se eliminan, evitando el entrecruzamiento. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar Ab monovalentes. Los Ab se pueden digerir para producir fragmentos, tales como fragmentos F_{ab} (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999).

Ab humanizados y humanos

Los Ab pueden comprender además As humanizados o humanos. Las formas humanizadas de Ab no humanos son Ig quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (tales como F_v , F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab')_2}$ u otras subsecuencias de Ab que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de Ig no humana.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se logra mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeyen *et al.*, 1988). Dichos Ab "humanizados" son Ab quiméricos (1989), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los Ab humanizados son típicamente Ab humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en Ab de roedores. Los Ab humanizados incluyen Ig humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes reemplazan a los residuos en el marco de F_v de la Ig humana. Los Ab humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o del marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la mayoría, si no todas, las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana y la mayoría, si no todas, las regiones FR son los de una secuencia de consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado también comprende óptimamente al menos una porción de una región constante de Ig (F_C), típicamente la de una Ig humana (Jones *et al.*, 1986; Presta, 1992; Riechmann *et al.*, 1988).

Los Ab humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas, incluidas las bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991; Marcas *et al.*, 1991) y la preparación de mAb humanos (Boerner *et al.*, 1991; Reisfeld y Sell, 1985). De manera similar, la introducción de genes de Ig humanos en animales transgénicos en los que los genes de Ig endógenos han sido parcial o completamente inactivados puede aprovecharse para sintetizar Ab humanos. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en los humanos en todos los aspectos, incluido **reordenamiento de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos (1997a; 1997b; 1997c; 1997d; 1997; 1997; Fishwild *et al.*, 1996; 1997; 1997; 2001; 1996; 1997; 1997; 1997; Lonberg y Huszar, 1995; Lonberg *et al.*, 1994; Marcas *et al.*, 1992; 1997; 1997; 1997).

mAb biespecíficos

Los Ab biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes.

Tradicionalmente, la producción recombinante de Ab biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de Ig, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, 1983). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de Ig, los hibridomas (cuadromas) resultantes producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica deseada. El anticuerpo deseado se puede purificar mediante cromatografía de afinidad u otras técnicas (Trautnecker *et al.*, 1991; 1993).

Para fabricar un anticuerpo biespecífico (Suresh *et al.*, 1986), los dominios variables con los sitios de combinación anticuerpo-antígeno deseados se fusionan con secuencias de dominio constante de Ig. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Preferiblemente, la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de Ig y, si se desea, la cadena ligera de Ig, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado.

La interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes (1996). La interfase preferida comprende al menos parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Este mecanismo aumenta el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados, tales como los homodímeros.

Los Ab biespecíficos se pueden preparar como Ab de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo Ab biespecíficos de $F_{(ab')_2}$). Una técnica para generar anticuerpos biespecíficos aprovecha el enlace químico. Los Ab intactos se pueden escindir proteolíticamente para generar fragmentos $F_{(ab')_2}$ (Brennan *et al.*, 1985). Los fragmentos se reducen con un agente complejante de ditiol, tal como arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos $F_{ab'}$ generados luego se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de $F_{ab'}$ -TNB se reconvierten luego en el $F_{ab'}$ -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de $F_{ab'}$ -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los Ab biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos $F_{ab'}$ se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar Ab biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir Ab de $F_{(ab')_2}$ biespecíficos humanizados (Shalaby *et al.*, 1992). Cada fragmento $F_{ab'}$ es secretado por separado de *E. coli* y acoplado directamente químicamente *in vitro*, formando el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se pueden aprovechar los motivos de cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, 1992). Los péptidos de las proteínas *Fos* y *Jun* están unidas a las porciones $F_{ab'}$ de dos Ab diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se reducen en la región bisagra para formar monómeros y luego se oxidan nuevamente para formar heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede producir homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" (Holliger *et al.*, 1993) proporciona un método alternativo para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos es el uso de dímeros de F_v monocatenario (sF_v) (Gruber *et al.*, 1994). También se contemplan Ab con más de dos valencias, tales como los Ab trispecíficos (Tutt *et al.*, 1991).

Ab heteroconjugados

Se han propuesto Ab heteroconjugados, que consisten en dos Ab unidos covalentemente, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (1987) y para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1991; 1992). Se contemplan los Ab preparados *in vitro* utilizando métodos químicos de proteínas sintéticas, incluidos los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato (1987).

Composiciones farmacéuticas para Ab

Los Ab se pueden administrar en composiciones farmacéuticas. Se pueden encontrar en (de Boer, 1994; Gennaro, 2000; Lee, 1990) los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como orientación en la elección de los componentes.

Los liposomas también se pueden usar como vehículo de suministro para la introducción intracelular. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al epítipo. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que se unan a un epítipo preferido basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo útil. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (Marasco *et al.*, 1993). Las formulaciones también pueden contener más de un compuesto activo para un tratamiento particular, preferiblemente aquellos con actividades que no se afectan negativamente entre sí. La composición puede comprender un agente que potencie la función, tal como un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. La composición también puede contener células, tales como las células NK-92.

Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial; por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por

ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones a utilizar para administración *in vivo* son altamente preferidas para que el proceso sea estéril. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles o cualquiera de varias técnicas.

- 5 También se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Boswell y Scribner, 1973), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos y pueden ser preferibles.

- 15 De manera similar, el uso de múltiples anticuerpos o fragmentos F(ab')₂ para bloquear específicamente los receptores de activación seleccionados, permite refinar la identificación de los receptores que están involucrados en cualquier caso particular. A este respecto, la presencia de lisis mediada por células NK de una objetivo para la que están bloqueados todos los receptores de activación conocidos sugiere la presencia de ligandos o receptores de activación previamente desconocidos. El experimento inverso de observar la actividad citolítica de células NK-92 nativas y transducidas frente a células objetivo que se han modificado para expresar ligandos putativos para estos receptores puede proporcionar información adicional y una posible confirmación. La respuesta de citocinas de las células efectoras en estos experimentos también puede proporcionar información adicional. Por lo tanto, la invención ofrece una miríada de opciones para refinar las condiciones del ensayo para satisfacer las necesidades del usuario, además de proporcionar una herramienta valiosa para las investigaciones de los mecanismos fisiológicos básicos de la función de las células NK.

- 25 Además, el uso de anticuerpos para el tratamiento terapéutico de enfermedades es un campo en rápido crecimiento y evolución. Aunque los mecanismos involucrados en los efectos terapéuticos de los tratamientos con anticuerpos aún se están dilucidando, existe evidencia de que estos efectos están mediados por la interacción ad-hoc de la porción de Fc del anticuerpo administrado con los receptores de Fc correspondientes en células efectoras citolíticas como los neutrófilos, fagocitos mononucleares, células transformadas, células T y células NK. Por lo tanto, la actividad citolítica de las células efectoras se dirige contra aquellas células objetivo que muestran antígenos de superficie que están unidos por el anticuerpo. Este mecanismo propuesto no pretende limitar la invención de ninguna manera.

- 35 El principal impulso actual de este campo implica el uso de anticuerpos monoclonales humanizados de longitud completa (que por lo tanto contienen dominios Fc) que se dirigen hacia los antígenos de la superficie celular en las células tumorales. Por ejemplo, se han demostrado beneficios clínicos sustanciales para el tratamiento de ciertos cánceres de mama con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptina, y el tratamiento de leucemias de células B con el anticuerpo anti-CD20, Rituximab. Las células efectoras CD16⁺ tales como las células NK nativas y las células NK-92-CD16 y las células NK-92-CD16 γ / ζ de esta divulgación se unen a las porciones Fc de los anticuerpos Herceptina o Rituximab que, a su vez, se unen a través de sus porciones F(ab) al antígeno de superficie celular correspondiente en una célula cancerosa. Esta unión del antígeno de la célula cancerosa a CD16 activa la célula efectora y dirige su actividad citolítica contra la célula cancerosa, lo que da como resultado su destrucción.

- 45 Otro aspecto del desarrollo en esta área está dirigido hacia la creación de anticuerpos quiméricos que incorporan dos o más dominios de unión a antígeno [F(ab)] que tienen diferentes especificidades. Un "anticuerpo biespecífico" quimérico puede, a modo de ejemplo, incorporar un dominio de unión F(ab) que se une específicamente a un marcador de superficie celular que se expresa de forma única o característica en el tumor objetivo o en las células infectadas y un segundo dominio F(ab) que se involucra específicamente en la activación de receptores tales como CD16 en NK u otras células efectoras. Dichos anticuerpos quiméricos se ejemplifican con el anticuerpo monoclonal 2B1 (Clark *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1995a; Weiner *et al.*, 1995b) que incorpora un dominio F(ab) que se une específicamente al antígeno ErbB2 (HER2/neu) y un segundo dominio F(ab) que se une específicamente a CD16. Las células de la línea de cáncer de ovario ErbB², SKOV-3, son sólo ligeramente susceptibles a la citólisis por células NK o células NK-92-CD16. Sin embargo, las células SKOV-3 se vuelven muy susceptibles a la citólisis mediada por células NK-92-CD16 en presencia del anticuerpo 2B1 que liga el antígeno ErbB2 en una célula SKOV-3 al receptor activador CD16 en una célula NK-92-CD16 (Figura 5).

- 55 Groner y Moritz (Groner y Moritz, 1997) describen otro medio más de usar anticuerpos para dirigir la actividad de una célula efectora contra un objetivo específico. En este enfoque, la célula efectora se modifica genéticamente para expresar una única cadena polipeptídica que consta de un dominio de unión F(ab) monovalente específico de antígeno que está unido covalentemente a un dominio de señalización, tal como TCR- ζ (GenBank acceso número J04132; SEQ ID NO: 6).

Como se ilustra con mayor detalle a continuación en el Ejemplo 6, los ensayos de ADCC y de citotoxicidad redirigidos pueden usarse para identificar anticuerpos y construcciones de anticuerpos que son útiles como agentes terapéuticos

para el tratamiento de cánceres e infecciones. Las células NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ o NK-92-CD16- ζ se utilizan como células efectoras en estos ensayos. Las células objetivo y las características del anticuerpo o la construcción del anticuerpo que se va a evaluar determinan en gran medida si el formato de ensayo de la ADCC o la citotoxicidad redirigida es más apropiado. Una célula objetivo que expresa el ligando de interés, pero que no expresa ningún receptor Fc, es apropiada para la evaluación de anticuerpos en el formato de ADCC. Este mismo tipo de célula objetivo también es adecuado para la evaluación por ADCC de construcciones de anticuerpos que incluyen un dominio Fc. Por el contrario, una construcción de anticuerpo que incorpora dominios de unión F(ab) separados que son específicos para el antígeno de interés y para CD16 se evalúa más apropiadamente a través de la citotoxicidad redirigida utilizando células objetivo que expresan el antígeno de interés, pero que no expresan CD16. Otras disposiciones de este tipo son igualmente posibles y se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Para garantizar el máximo intervalo dinámico del ensayo, es deseable seleccionar la célula objetivo entre aquellas que son mínimamente susceptibles a la lisis por parte de la línea de células NK-92 parental. Por esta razón, la célula objetivo normalmente se selecciona para exhibir una lisis mediada por NK-92 de entre 0 % y 30 %, preferiblemente entre 0 % y 20 %, más preferiblemente entre 0 % y 10 % y más preferiblemente entre 0 % y 5 %. Las líneas de células objetivo como SKOV-3 son útiles porque presentan una susceptibilidad mínima (5 % - 30 %) a la lisis por parte de las células NK-92 y expresan constitutivamente ciertos antígenos de superficie celular que son de particular interés como objetivos para anticuerpos terapéuticos. Estas células también se pueden transducir o transfectar para expresar otros antígenos de interés y utilidad.

Una aplicación significativa de la presente invención es en la selección de sobrenadantes de hibridomas para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales inductores de ADCC. Las fusiones de células de bazo empleadas para la generación inicial de anticuerpos monoclonales dan como resultado una población heterogénea de células, algunas de las cuales producen anticuerpos. Cada célula productora de anticuerpos individual en esta mezcla normalmente produce un anticuerpo único que tiene al menos cierta afinidad por el antígeno objetivo. Las células de esta mezcla heterogénea original se subclonan, normalmente mediante dilución limitada, hasta el punto en que cada subclon se origina a partir de una única célula madre. A continuación, cada subclon normalmente se analiza para eliminar aquellos que no secretan inmunoglobulinas. Los subclones restantes, que pueden contarse entre decenas y cientos, secretan cada uno un anticuerpo único, algunos de los cuales pueden tener especificidades, afinidades y otras características que los hacen adecuados para una mayor evaluación y desarrollo como posibles agentes terapéuticos. Los ensayos de ADCC y de citotoxicidad redirigidos del Ejemplo 6 encuentran utilidad en la selección de clones para identificar aquellos subclones que secretan anticuerpos potencialmente útiles de los isotipos de IgG.

Estos mismos ensayos se pueden utilizar posteriormente para respaldar la evaluación, caracterización y mayor desarrollo de estos anticuerpos.

La presente divulgación proporciona construcciones de células NK-92 que han sido diseñadas para expresar de forma estable la forma de afinidad alta o baja totalmente activa del receptor Fc γ RIII (CD16). El CD16 está presente de forma natural en las células NK, pero no se expresa en las células NK-92 parentales ni con ninguna estabilidad por ninguna de las otras líneas de células similares a NK conocidas. Las líneas de células NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ transducidas son, por lo tanto, únicas entre las líneas de células de tipo NK actualmente disponibles. Además, NK-92 y sus derivados modificados genéticamente exhiben niveles de capacidad de respuesta funcional en ensayos de citotoxicidad y citocinas que son superiores a las células NK primarias y a la mayoría de las otras líneas de células similares a NK humanas disponibles y parecen tolerarse de manera segura en sujetos humanos. Por estas razones, las construcciones de la presente divulgación, cuando se usan en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie celular que se expresa de forma única o característica en la célula objetivo deseada, proporciona un nivel sustancialmente mayor de actividad citolítica y especificidad hacia la tipo de célula objetivo que el proporcionado por las células NK-92 originales o el anticuerpo solo cuando se usa de la misma manera. Además, a diferencia de las células NK nativas, las construcciones de NK-92 de esta divulgación expresan receptores inhibidores mínimos, lo que las hace reactivas frente a una amplia variedad de tumores. La especificidad de la célula objetivo de estas construcciones está determinada por el anticuerpo o los anticuerpos coadministrados, lo que permite que estas construcciones se utilicen sin cambios para cualquier indicación clínica para la que se pueda preparar un anticuerpo adecuado. Los anticuerpos policlonales, los cócteles que consisten en múltiples anticuerpos monoclonales y las construcciones de anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos biespecíficos, minicuerpos y anticuerpos TriBi (triméricos, biespecíficos) pueden usarse beneficiosamente junto con esta célula modificada divulgada.

La célula modificada puede administrarse a animales o a sujetos humanos. Al evaluar la eficacia clínica, los modelos animales más beneficiosos incluyen ratones con deficiencia de RAG/cadena γ común (que carecen de células T, B y NK) o ratones SCID (que carecen de células T y B); estas cepas están disponibles a través de The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME. La supresión del sistema inmunitario nativo en dichos animales inmunocomprometidos facilita la diferenciación entre las respuestas inducidas por el tratamiento y las respuestas inmunitarias normales. Además, los derivados de líneas de células se pueden usar para tratar sujetos animales, tales como bovinos, cerdos, conejos, alpacas, caballos, caninos, felinos, hurones, ratas, ratones, aves y búfalos, que padecen tumores en combinación con anticuerpos específicos de tumores. El uso terapéutico de las células NK-92 se puede mejorar preparando a los sujetos que van a recibir células NK-92 transducidas con CD16 para la terapia mediante infusión a los sujetos con una dosis baja de IL-2 durante varios días antes de administrar las células NK-92-CD16 y anticuerpos dirigidos, y continuar esta infusión durante varios días después. Alternativamente, las células NK-92 transducidas con CD16 se pueden preparar

a partir de células de las líneas de células NK-92mi o NK-92ci que se han modificado para expresar constitutivamente IL-2. En cualquier caso, el tratamiento simultáneo con IL-2 puede aumentar la supervivencia de las células NK-92 administradas.

5 Dado que la línea de células NK-92 se aisló de un sujeto con linfoma granular grande, las células tienen el potencial de establecer tumores en los sujetos receptores. Aunque esta tumorigenicidad no se ha observado en ningún sujeto (humano o animal), la práctica aceptada incorpora células NK-92 irradiadas con radiación y antes de la administración a niveles de dosis que suprimen la proliferación de células NK-92 mientras mantienen sustancialmente la citotoxicidad y la supervivencia celular. La irradiación gamma de células NK-92 a dosis de entre aproximadamente 750 y 1000 Grays, por ejemplo, 750, 800, 850, 900 y 950 Grays, se considera suficiente para este propósito.

10 El tratamiento *in vivo* de un sujeto se inicia mediante la administración del anticuerpo dirigido antes o al mismo tiempo que la administración de células NK-92 transducidas con CD16. La administración es típicamente a través de infusión intravenosa o intraperitoneal, aunque también se puede usar la inyección directa en tumores sólidos u otras lesiones focales similares. Puede ser preferible un régimen de dosis fraccionada, particularmente cuando no se administra IL-2 de manera conjunta, para mantener un alto nivel de células NK-92 transducidas activas en el sujeto. En algunos
15 casos, puede ser ventajoso administrar el anticuerpo por infusión y las células transducidas por inyección directa. La eficacia del tratamiento generalmente se evalúa mediante la reducción/eliminación de la lesión, el perfil de citocinas u otros parámetros fisiológicos.

Las células NK-92-CD16, NK-92-CD16/γ y NK-92-CD16/ζ de la presente divulgación representan poblaciones estables y reproducibles de células efectoras que son de particular utilidad en la evaluación *in vitro* de anticuerpos que se están desarrollando como agentes terapéuticos potenciales. Estas mismas líneas de células son componentes eficaces de las terapias *in vivo* para el tratamiento de enfermedades, incluidos cánceres e infecciones. La administración conjunta de una de estas líneas de células junto con un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno expresado por el tumor o la célula infectada puede potenciar los efectos terapéuticos del anticuerpo, tratando así la enfermedad. Puede observarse un efecto beneficioso similar en aquellos casos en los que la línea de células se administra como
25 terapia única a un sujeto que ha desarrollado anticuerpos endógenos contra un tumor o una infección.

Además, aunque se ha ejemplificado el receptor Fc CD16, la presente divulgación no se limita a la expresión de FCγRIII-A, y la expresión de otros receptores Fc para IgG y otros tipos de anticuerpos también están dentro del alcance de la divulgación, incluidas las clases de receptores Fcγ (por ejemplo, FCγRI (CD64), FCγRII (CD32), FCγRIII y FcRn, Fcα (alfa), Fcε (épsilon), y sus diversas subclases. Líneas de células variantes de NK-92 adicionales también caen dentro del alcance de esta divulgación. NK-92 puede, a modo de ejemplo, transducirse conjuntamente con genes que conducen a la creación de líneas de células tales como NK-92ci-CD16 y NK-92mi-CD16 que expresan tanto IL-2 como CD16, y que por lo tanto pueden ser utilizadas sin necesidad de IL-2 exógena. Otros beneficios y usos de la presente divulgación se harán evidentes en los ejemplos específicos que se describen a continuación.

Composiciones farmacéuticas

35 Células (por ejemplo, NK-92 modificadas y no modificadas), polipéptidos y Ab, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones normalmente comprenden la célula, el polipéptido y/o el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles
40 con la administración farmacéutica (Gennaro, 2000). Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Finger, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Formulaciones inyectables

45 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una célula NK-92 y/o un anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes según sea necesario, seguido de esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos, como se explicó. Polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de
50 preparación incluyen secado al vacío y liofilización que producen un polvo que contiene el ingrediente activo y cualquier ingrediente deseado de soluciones estériles.

Ejemplos

El siguiente ejemplo es solo para fines ilustrativos y no debe interpretarse como una limitación de la invención reivindicada.

55 Ejemplo 1: Preparación de retrovirus recombinante CD16

CD16 ADNc X52645.1 que codifica la forma de baja afinidad del receptor III-A de la región Fc de inmunoglobulina gama transmembrana (FcγRIII-A o CD16) [fenilalanina 157 (F157), secuencia completa: SwissProt P08637 (SEQ ID NO: 1)] o una variante polimórfica que codifica una forma de mayor afinidad del receptor CD16 [Valina 157 (F157V), secuencia completa: SwissProt VAR_008801 (SEQ ID NO:2)] se subclonó en el vector de expresión retroviral bicistónico, pBMN-IRES-EGFP (obtenido a través de G. Nolan, Universidad de Stanford, Stanford, CA) usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I de acuerdo con los métodos estándar.

El vector recombinante se mezcló con 10 µL del reactivo PLUS^{MC} (Invitrogen; Carlsbad, CA); diluido a 100 µL con Opti-MEM[®] sin suero precalentado (Invitrogen; MEM, medio esencial mínimo); diluido adicionalmente mediante la adición de 8 µL de lipofectamina^{MC} (Invitrogen) en 100 µL de Opti-MEM[®] sin suero precalentado; y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, esta mezcla se llevó a un volumen total de 1 mL mediante la adición de Opti-MEM[®] sin suero precalentado. Se cultivaron células de empaquetamiento Phoenix-Amphotropic (obtenidas a través de G. Nolan, Universidad de Stanford, Stanford, CA; (Kinsella y Nolan, 1996)) hasta una confluencia del 70-80 % en una placa de 6 pocillos y se lavaron con 6 mL de medio Opti-MEM[®] sin suero precalentado (Invitrogen). Después de la eliminación del medio, se añadió 1 mL de la solución de vector recombinante en el reactivo Lipofectamina^{MC} PLUS^{MC} a cada pocillo y las células se incubaron durante al menos tres horas a 37 °C bajo una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar. Se añadieron a cada pocillo cuatro mL de medio RPMI precalentado que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % y las células se incubaron durante la noche a 37 °C, en una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar. Luego se retiró el medio; las células se lavaron con 6 mL de Opti-MEM[®] sin suero precalentado; se añadieron 2 mL de Opti-MEM[®] sin suero adicional; y las células se incubaron a 37 °C, bajo una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar durante 48 horas adicionales.

El sobrenadante que contenía el virus se recogió en un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL; se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos para eliminar células y fragmentos de células; y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifuga de plástico de 15 mL. Inmediatamente antes de usar, se añadieron 20 µL del reactivo PLUS^{MC} a la suspensión de virus; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos; se añadieron 8 µL de lipofectamina^{MC} a la mezcla; y la mezcla se incubó durante 15 minutos más a temperatura ambiente.

Ejemplo 2: Transducción retroviral de CD16 en células NK-92

Las células NK-92 cultivadas en α-MEM (Sigma; St. Louis, MO) complementadas con FBS al 12.5 %, suero fetal de caballo (FHS) al 12.5 % y 500 UI de rIL-2/mL (Chiron; Emeryville, CA) se recolectaron por centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos y el sedimento celular se resuspendió en 10 mL de medio Opti-MEM[®] sin suero. Una alícuota de suspensión celular que contenía 5 x 10⁴ células se sedimentó a 1300 rpm durante 5 minutos; el sedimento celular se resuspendió en 2 mL de la suspensión de retrovirus descrita en el ejemplo 1 y las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos. Las placas se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 minutos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar durante 3 horas. Este ciclo de centrifugación e incubación se repitió luego por segunda vez. Las células se diluyeron con 8 mL de α-MEM, se transfirieron a un matraz T-25 y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar hasta que las células fueran confluentes.

Las células transducidas se recogieron, se resuspendieron en medio Opti-MEM[®] sin suero y se clasificaron en función de su nivel de expresión de EGFP utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), siendo EGFP expresado conjuntamente con, y un marcador sustituto para, CD16. La expresión de CD16 en la superficie celular se confirmó mediante inmunotinción de las células transducidas con un anticuerpo anti-CD16. Las células transducidas, que se denominan NK-92-CD16, se pasaron con IL-2 fresca cada 4 días y se analizaron para determinar la expresión de CD16 en la superficie celular antes de su uso.

Las Figuras 1A y 1B (Figura 1) son diagramas de dispersión de citómetro de flujo que muestran células NK-92 transducidas con ADNc con CD16 utilizando el vector pBMN-IRES-EGFP después de la tinción con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) solo (Figura 1A) o anticuerpo anti-CD16 (3G8 (Fleit *et al.*, 1982; Perusia y Trinchieri, 1984); IgG de ratón) + anti-IgG de ratón PE (Figura 1B) y análisis usando un citómetro de flujo FACS (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ). La expresión de EGFP se evalúa en el eje x y la expresión de CD16 en la superficie está en el eje y. La Figura 1 ilustra que la línea de células NK-92-CD16 expresa CD16 en la superficie celular cuando se tiñe con un anticuerpo monoclonal anti-CD16.

Ejemplo 3: Células NK-92-CD16 que expresan conjuntamente CD16 y una proteína de señalización accesoria FcεRI-γ o TCR-ζ

Los retrovirus recombinantes que incorporan genes insertados para la expresión de proteínas de señalización accesorias, FcεRI-γ (SEQ ID NO: 5) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 7), se prepararon utilizando métodos estándar para ligar el ADNc correspondiente en el vector pBMN-IRES-EGFP y transfección de esta construcción en la línea de células de empaquetamiento Phoenix-Amphotropic en presencia de Lipofectamina^{MC} Plus como se describe en el Ejemplo 1. Los retrovirus recombinantes γ o ζ resultantes se usaron para transducir células NK-92 como se describe en el Ejemplo 2 con las siguientes modificaciones adicionales.

Se recolectaron células NK-92 transducidas con polinucleótido FcεRI-γ (SEQ ID NO: 4) o TCR-ζ (SEQ ID NO: 6), se resuspendieron en medio Opti-MEM[®] sin suero y se clasificaron en función de su nivel de EGFP expresado

conjuntamente usando una FACS, se ligó el ADNc con CD16 en una versión del vector pBMN que carece de las secuencias IRES y EGFP, denominado pBMN-NoGFP (Yusa *et al.*, 2002). Las células NK-92 transducidas con γ o ζ se transdujeron conjuntamente en forma secundaria con CD16-pBMN-NoGFP usando el mismo método de transducción retroviral que se describe en el Ejemplo 2. Las células transducidas conjuntamente se suspendieron en α -MEM, se transfirieron a un matraz T-25 y se cultivaron hasta confluencia a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO₂ /aire para equilibrar. Después de alcanzar la confluencia, las células transducidas conjuntamente se inmunotñieron con un anticuerpo anti-CD16 y se clasificaron mediante FACS para determinar la expresión de CD16 en la superficie celular. Las células seleccionadas se subcultivaron con IL-2 fresca cada cuatro días y se ensayaron para determinar la expresión de CD16 en la superficie celular antes de su uso.

En este ejemplo, solo uno de los dos vectores contenía el gen para EGFP. Esta disposición facilita la determinación de los niveles en los que se expresan tanto la proteína de señalización accesoria como el CD16. En este caso, la proteína de señalización accesoria se expresó conjuntamente con EGFP. Por lo tanto, la fluorescencia de EGFP es un indicador sustituto del nivel de expresión de la proteína de señalización accesoria. Se empleó un anticuerpo anti-CD16 conjugado con un fluoróforo que tenía un espectro de emisión diferente al de EGFP para determinar el nivel de expresión de CD16.

La Figura 2 muestra diagramas de dispersión de citómetro de flujo que muestran la expresión de CD16 por células NK-92 transducidas con CD16 solo (Figura 2A) y el aumento en la expresión de CD16 cuando las células NK-92 se transducen con ADNc con CD16 en combinación con ADNc de Fc ϵ RI- γ (γ , Figura 2B); o ADNc con CD3 ζ (ζ , Figura 2C). La Figura 2 muestra que cuando CD16 se expresa conjuntamente con Fc ϵ RI- γ o CD3 ζ en la línea de células NK-92, la expresión de CD16 en la superficie celular aumenta con respecto a la obtenida cuando las células NK-92 se transducen con CD16 solo.

Ejemplo 4: Ensayos de citotoxicidad

Las células efectoras (NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16 ζ , NK-92-CD16 γ) se lavaron mediante suspensión en α -MEM (sin IL-2) y se sedimentaron a 1300 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se suspendió en α -MEM, se contaron las células y se prepararon alícuotas a concentraciones celulares de 1 x 10⁵/mL (proporción de células efectoras a objetivo (E:T = 1:1), 5 x 10⁵/mL (E:T = 5:1), 1 x 10⁶/mL (E:T = 10:1), 2 x 10⁶/mL (E:T = 20:1) o según corresponda a la determinación que se está realizando. Las células NK-92 transducidas utilizadas en estos ensayos se seleccionaron

El tipo de célula objetivo utilizada en estos ensayos se seleccionó sobre la base de los requisitos de la determinación concreta que se estaba realizando. Células Raji (por ejemplo, ATCC depósito No. CCL-86), que se sabe que son moderadamente susceptibles (lisis de aproximadamente 50 % de en estas condiciones) a la lisis por células NK-92, se usaron para la mayoría de los propósitos, incluida la verificación de la citotoxicidad de las células efectoras.

Aproximadamente 2 x 10⁶ de las células objetivo seleccionadas se lavaron por suspensión en medio RPMI y sedimentación a 1300 rpm durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, se añadieron 20 μ L de FBS y 100 μ Ci de Cromato[⁵¹Cr] de Na y las células se incubaron a 37 °C durante 60-90 minutos con mezcla cada 30 minutos. Las células objetivo marcadas se lavaron tres veces mediante suspensión en 10 mL de medio RPMI y sedimentación a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular final se volvió a suspender en α -MEM y se diluyó a una concentración de 1 x 10⁵/mL. Las células objetivo para su uso en ensayos de citotoxicidad redirigida o ADCC se incubaron adicionalmente con el anticuerpo apropiado a una concentración final de 0.01-5 μ g/mL durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 μ L del tipo seleccionado de células objetivo y 100 μ L de la concentración apropiada de células efectoras a cada pocillo de una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se prepararon de tres a seis pocillos repetidos en cada relación E:T. Se asignaron al menos 6 pocillos a cada uno de los controles de lisis espontánea (células efectoras reemplazadas con 100 μ L de α -MEM) y control de liberación total (células efectoras reemplazadas con 100 μ L de detergente t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100®) al 2 % en α -MEM). Deseablemente, se asignan seis o más pocillos adicionales al uso de células efectoras NK-92 no modificadas que no expresan CD16 como control de procedimiento y estándar interno. A continuación, la placa se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO₂/aire para equilibrar. Al final del periodo de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos y se recogieron 100 μ L del sobrenadante de cada pocillo para recuento en un contador y para medir la liberación de ⁵¹Cr. El porcentaje de lisis de células objetivo específicas se calculó como:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{(\text{media de la liberación experimental de cpm} - \text{media de la lisis espontánea de cpm}) * 100}{(\text{media de la liberación total de cpm} - \text{media de la liberación espontánea de cpm})}$$

Ejemplo 5: Lisis celular mediada por CD16

Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para CD16 en ensayos de citotoxicidad redirigidos en aquellos casos en los que se disponía de una línea de células objetivo que expresaba un receptor Fc distinto de CD16. En particular, la línea de células de mastocitoma P815 de ratón Fc γ R⁺ y la línea de células mielocíticas Fc γ R⁺ THP-1 se utilizaron como objetivos en combinación con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD16 3G8 (Fleit *et al.*, 1982; Perussia y Trinchieri, 1984) para evaluar las células NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ (Figuras 3 y 4). En este

formato, se cree que el receptor de la célula objetivo se une a la porción Fc del anticuerpo, mientras que la porción F(ab) del anticuerpo se une a CD16 en la célula efectora. Como alternativa, los ensayos de citotoxicidad redirigidos se pueden realizar utilizando células objetivo que expresan un antígeno único, pero que no expresan un receptor Fc, junto con una construcción de anticuerpo biespecífico. En este formato, un dominio de unión F(ab) del anticuerpo biespecífico se une específicamente al antígeno de la célula objetivo mientras que otro dominio F(ab) se une específicamente a CD16. La evaluación de las células NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ o NK-92-CD16- ζ en este formato se llevó a cabo utilizando SKOV-3 como células objetivo y el anticuerpo quimérico 2B1 como agente de entrecruzamiento. El anticuerpo biespecífico quimérico 2B1 tiene un dominio de unión que es específico para HER2/neu y un segundo dominio de unión que es específico para CD16 (Clark *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1995a; Weiner *et al.*, 1995b) (Figura 5). La Figura 6 ilustra la citotoxicidad de las células NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ frente a las células objetivo P815 en un ensayo de citotoxicidad redirigido utilizando el anticuerpo quimérico 2B1 después de formar un ensayo de liberación de ^{51}Cr durante cuatro horas. Esta figura muestra que a concentraciones de anticuerpos inferiores a la saturación, la citotoxicidad es una función tanto de la concentración de anticuerpos como del nivel de expresión de CD16 en las células efectoras NK-92.

Se utilizó el siguiente procedimiento para realizar ensayos de citotoxicidad ADCC y redirigidos, estando determinado el tipo de ensayo por las características de la célula objetivo y el anticuerpo seleccionado. Las células objetivo seleccionadas se marcaron con cromato[^{51}Cr] de Na como se describe en el Ejemplo 4. Las alícuotas de las células objetivo marcadas con [^{51}Cr] se incubaron adicionalmente con el anticuerpo seleccionado a múltiples concentraciones entre 0.01 μg y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con α -MEM y se ajustaron a una concentración de 1×10^5 células/mL antes de su uso. Se añadieron 100 μL del tipo seleccionado de células objetivo y 100 μL de células efectoras a concentraciones celulares de $1 \times 10^5/\text{mL}$ (E:T = 1:1), $5 \times 10^5/\text{mL}$ (E:T = 5:1), $1 \times 10^6/\text{mL}$ (E:T = 10:1), $2 \times 10^6/\text{mL}$ (E:T = 20:1) o según sea apropiado para la determinación que se está realizando, a cada pocillo de una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se prepararon de tres a seis pocillos repetidos en cada relación E:T a evaluar. Se asignaron al menos 6 pocillos a cada uno de los controles de lisis espontánea (células efectoras reemplazadas con 100 μL de α -MEM) y control de liberación total (células efectoras reemplazadas con 100 μL de detergente Triton X-100 al 2 % en α -MEM). Se asignaron tres pocillos adicionales en cada relación E:T a controles "no ADCC" en los que las células objetivo no se expusieron al anticuerpo. Deseablemente, se asignan 6 o más pocillos adicionales para el uso de células efectoras NK-92 no modificadas que no expresan CD16 como control de procedimiento y patrón interno. A continuación, la placa se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO_2 /aire para equilibrar. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos y se recogieron 100 μL del sobrenadante de cada pozo para contar en un contador y como medida de la liberación de [^{51}Cr] por citotoxicidad. El porcentaje de lisis específica se calculó como se describe en el Ejemplo 4.

Estos ensayos también pueden emplear células NK-92-CD16 que expresen niveles variables de CD16 en la superficie (a través de la clasificación celular o a través de la transducción conjunta de γ o ζ), así como NK-92 transducidas con el alelo polimórfico de alta afinidad del gen de CD16 (F157V). Estas variantes de la invención proporcionan un amplio intervalo dinámico de sensibilidades de ensayo. Aunque este Ejemplo se describe con referencia a anticuerpos monoclonales y construcciones de anticuerpos biespecíficos, en la práctica de esta invención también pueden usarse anticuerpos policlonales y otros tipos de construcciones de anticuerpos que tengan las características apropiadas.

Ejemplo 6: Detección y evaluación de anticuerpos terapéuticos

Las células objetivo seleccionadas se marcaron con cromato[^{51}Cr] de Na como se describe en el Ejemplo 4 y ajustado a una concentración de 1×10^5 células/mL antes de su uso. A continuación, se transfirió una alícuota de 100 μL de células objetivo marcadas a cada pocillo del número necesario de placas de 96 pocillos. Las concentraciones de inmunoglobulina en los sobrenadantes de hibridoma a explorar se ajustaron opcionalmente, pero preferiblemente, a una concentración nominal conveniente de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se añadieron al menos de alícuotas de 100 μL de cada sobrenadante de hibridoma a cada uno de los tres pocillos que contenían células objetivo; se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó con α -MEM y se resuspendió en 100 μL de α -MEM. La concentración de células efectoras se ajustó según correspondiera para lograr la relación E:T deseada en el ensayo. Por ejemplo, si se deseaba una relación E:T de 10:1, la concentración de células efectoras se ajustó a 1×10^6 células/mL. El ensayo se inició añadiendo 100 μL de células efectoras a cada pocillo. A continuación, las placas se centrifugaron a 500 RPM durante 3 minutos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO_2 /aire para equilibrar. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos y se recogieron 100 μL del sobrenadante de cada pozo para contar en un contador y como medida de la liberación de [^{51}Cr] debido a la citotoxicidad. El porcentaje de lisis específica se calculó como se describe en el Ejemplo 4. Se asignaron al menos seis pocillos a cada uno de los controles de lisis espontánea (células efectoras reemplazadas con 100 μL de α -MEM) y un control de liberación total (células efectoras reemplazadas con 100 μL de detergente Triton X-100 al 2 % en α -MEM) en cada plato. Se asignaron seis pocillos adicionales en cada conjunto de placas a cada uno de los controles "sin anticuerpos" (células objetivo no tratadas con anticuerpos) y un control de citólisis de NK-92. La lisis específica se informó como el promedio de tres pocillos repetidos después de la corrección para los controles apropiados. La eficacia también puede evaluarse mediante la medición de indicadores indirectos, tales como la liberación de citocinas por parte de las células NK-92-CD16, la sobreexpresión de los marcadores de activación de células NK como CD25, CD69 y/o CD95L, la activación de factores de transcripción, como NF-AT o NF- κB dentro de las células NK-92, o la activación de caspasas u otros marcadores de apoptosis en las células objetivo.

En la mayoría de los casos, se prepararon cantidades relativamente pequeñas (a menudo sólo una) de construcciones de anticuerpos. En tales casos, no fue necesario seleccionar, y la construcción se evaluó más convenientemente usando un ensayo directo, tal como se describe en el Ejemplo 5. De manera similar, los relativamente pocos anticuerpos potencialmente útiles detectados durante la detección se caracterizaron posteriormente con más detalle utilizando ensayos como los descritos en el Ejemplo 5. Se pueden analizar concentraciones variables de anticuerpos purificados para comparar las eficacias para inducir ADCC. Además, las pruebas comparativas del potencial ADCC de los anticuerpos en las células NK-92 que tienen formas de CD16 de baja afinidad (F157) frente a las de mayor afinidad (F157V) ofrecieron un ensayo conveniente y reproducible para abordar las eficacias terapéuticas de los anticuerpos individuales en el contexto de ambos alelos humanos conocidos de CD16. Esto también eludió la necesidad para el usuario de identificar donantes específicos que sean homocigotos para cada uno de los dos alelos para dichos ensayos.

Ejemplo 7: Producción de citocinas mediada por CD16

Tras la activación, se sabe que las células NK-92 producen y secretan citocinas, que incluyen interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF α y otros), interleucinas (IL-5, -10 y -13, factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico y otros tras la activación. La producción de estas citocinas se puede determinar mediante métodos estándar, incluidos los kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específicos de citocinas que están disponibles de múltiples fuentes comerciales (por ejemplo, BD Pharmingen; San Diego, CA). La producción de citocinas por las células NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ en respuesta a la estimulación mediada por CD16 se puede determinar de manera análoga a la ADCC y ensayos de citotoxicidad redirigidos descritos en los Ejemplos 4 y 5.

Las células efectoras (NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ) se lavaron mediante suspensión en α -MEM (sin IL-2) y sedimentación a 1300 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se suspendió en α -MEM, se contaron las células y se prepararon alícuotas a concentraciones celulares de 1×10^5 /mL (E:T = 1:1), 5×10^5 /mL (E:T = 5:1), 1×10^6 /mL (E:T = 10:1), 2×10^6 /mL (E:T = 20:1), o según corresponda a la determinación que se está realizando.

El tipo de célula objetivo utilizada en estos ensayos se seleccionó sobre la base de los requisitos de la determinación concreta que se estaba realizando. Las células Raji, que se sabe que son moderadamente susceptibles (aproximadamente el 50 % de lisis bajo estas condiciones) a la lisis por células NK-92, se usaron para la mayoría de los propósitos, incluida la verificación de la citotoxicidad de las células efectoras.

Se combinaron 100 μ L de concentraciones variables de células efectoras con una concentración constante de células objetivo tratadas con anticuerpos (no marcadas con ^{51}Cr) en pocillos de una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se prepararon de tres a seis pocillos repetidos en cada relación E:T a evaluar. Se asignaron al menos 6 pocillos cada uno como controles para la activación de células efectoras específicas no CD16 en las que las células objetivo se reemplazaron con 100 mL de α -MEM (liberación espontánea) o con 100 μ L de Triton X-100 al 2 % (liberación total). Controles adicionales que utilizan células objetivo que no han sido tratadas con anticuerpos y células objetivo o efectoras que han sido tratadas con fragmentos F(ab') $_2$ también se incluyeron para suprimir la activación de células efectoras no específicas de CD16 según fuera apropiado. Las células NK-92 transducidas que expresan diferentes niveles o afinidades de CD16 podrían haberse utilizado como controles adicionales de la manera descrita anteriormente. La placa se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 7 % de CO $_2$ /aire para equilibrar. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos y se recolectaron alícuotas del sobrenadante de cada pocillo para cuantificar las concentraciones de citocinas, utilizando kits de ELISA de citocinas disponibles en el mercado (por ejemplo, BD Pharmingen; San Diego, CA). La producción de citocinas de células efectoras generalmente se determinó para rastrear la citotoxicidad de las células efectoras y, por lo tanto, podría tomarse como un indicador alternativo de la activación de las células efectoras.

Ejemplo 8: Estimulación de células NK-92 por IL-2

Se sabe que ciertas citocinas, particularmente IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, promueven el crecimiento, la supervivencia, la citotoxicidad y las actividades de liberación de citocinas de NK, NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- γ y NK-92-CD16- ζ , y otras células variantes de NK-92 tanto *in vitro* como *in vivo*. A modo de ejemplo, las células transducidas en los Ejemplos 2 y 3 proliferaron y mostraron niveles estables de expresión de CD16, citotoxicidad y respuesta de citocinas durante varios meses sin necesidad de selección de antibióticos cuando se subcultivaron con medio fresco que contenía IL-2 cada 4 días. Por el contrario, cuando estas mismas células pasaron sin la adición de IL-2, exhibieron niveles de citotoxicidad y producción de citocinas que disminuyeron con el tiempo durante el período de cultivo de 4 días y volvieron a niveles más altos el primer día después de la adición de IL-2 fresca. Además, las células mantenidas en ausencia de IL-2 lisaron específicamente una gama más estrecha de tipos de células que las células mantenidas en presencia de IL-2. Este comportamiento de las células NK-92 transducidas y sus derivados refleja fielmente el de las células NK primarias no modificadas. Por estas razones, es deseable analizar las células y los derivados transducidos a intervalos constantes después del paso con concentraciones definidas de IL-2. De manera similar, es deseable coadministrar IL-2 cuando estas células se usan con fines terapéuticos *in vivo*. En aquellos casos en los que la provisión de IL-2 exógena es inconveniente o no es deseable, la línea de células NK-92mi o NK-92ci que ha sido modificada para expresar IL-2 endógena a niveles que promueven la proliferación, supervivencia y actividad de NK-

92 puede también ser empleado. Las líneas de células NK-92mi, NK-92ci y otras derivadas de NK-92 se pueden transducir de la misma manera que se describe para la línea de células original NK-92 en los Ejemplos 2 y 3.

Tabla Z
Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Definición
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD	Agrupación de determinación
CTL	Linfocitos T citotóxicos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ErbB2	Protooncogén que codifica un receptor de tirosina quinasa unido a la membrana de la familia del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR); también conocido como HER-2/neu
FBS	Suero fetal bovino
FC	Indica región constante de un anticuerpo.
FHS	Suero fetal de caballo
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MCH-I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MEM	Medio esencial mínimo
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear-κ B
NK	Asesina natural
PBL	Linfocito de sangre periférica
RAG	Gen activador de la recombinasa
RhIL	Interleucina humana recombinante
ARN	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotaciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
TNF	Factor de necrosis tumoral
TriBi	trimérico, biespecífico

5

Referencias

- Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980. 1987. Target specific cross-linked heteroantibodies USA.
 Patente de los Estados Unidos No. 4816567. 1989. Recombinant immunoglobulin preparations.
 WO 91/00360. 1991. Bispecific reagents for AIDS therapy.
 10 WO 92/20373. 1992. Heteroconjugate antibodies for treatment of HIV infection.
 WO 97/33551. 1997a. Compositions and methods for the diagnosis, prevention, and treatment of neoplastic cell growth and proliferation.
 Patente de los Estados Unidos No. 5633425. 1997b. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies USA.
 15 Patente de los Estados Unidos No. 5661016. 1997c. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes USA.
 Patente de los Estados Unidos No. 5625126. 1997d. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies USA.
 20 Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-402.

- Austin, C.P., y C.L. Cepko. 1990. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development*. 110: 713-732.
- Ausubel, F.M. 2002. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Wiley, Nueva York. 2 v. (varias páginas) pp.
- 5 Bodine, D.M., K.T. McDonagh, N.E. Seidel, y A.W. Nienhuis. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol.* 19: 206-212.
- Boerner, P., R. Lafond, W.Z. Lu, P. Brams, y I. Royston. 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol.* 147: 86-95.
- Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919. Boswell, G.A., y R. M. Scribner. 1973. Polylactide-drug mixtures USA.
- 10 Brennan, M., P.F. Davison, y H. Paulus. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 229: 81-3.
- Campbell, K.S., S. Yusa, A. Kikuchi-Maki, y T.L. Catina. 2004. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol.* 172: 899-906.
- Capeocchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22: 479.
- 15 Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 237: 1-7.
- Cepko, C.L., B.E. Roberts, y R.E. Mulligan. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. 37: 1053 -1062.
- Chaney, W.G., D.R. Howard, J.W. Pollard, S. Sallustio, y P. Stanley. 1986. High-frequency transfection of CHO cells using Polybrene. *Somatic Cell Mol. Genet.* 12: 237.
- 20 Chen, C., y H. Okayama. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*. 6: 632-638.
- Clark, J.I., R.K. Alpaugh, M. von Mehren, J. Schultz, J.R. Gralow, M.A. Cheever, D.B. Ring, y L.M. Weiner. 1997. Induction of multiple anti-c-erbB-2 specificities accompanies a classical idiotypic cascade following 2B1 bispecific monoclonal antibody treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 44: 265-72.
- 25 de Boer, A.G. 1994. Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends. Harwood Academic Publishers, Langhorne, PA.
- Elroy-Stein, O., y B. Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6743-6747.
- 30 Escudero, J., y B. Hohn. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell*. 9: 2135-2142.
- Fekete, D.M., y C.L. Cepko. 1993. Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2350-2354.
- 35 Feigner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, y M. Danielson. 1987. Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7413-7417.
- Fieck, A., D.L. Wyborski, y J.M. Short. 1992. Modifications of the E. coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res.* 20: 1785-91.
- 40 Fishwild, D.M., S.L. O'Donnell, T. Bengoechea, D.V. Hudson, F. Harding, S.L. Bernhard, D. Jones, R.M. Kay, K.M. Higgins, S.R. Schramm, y N. Lonberg. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice [véanse los comentarios]. *Nat Biotechnol.* 14: 845-51.
- Fleit, H.B., S.D. Wright, y J.C. Unkeless. 1982. Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79: 3275-9.
- 45 Fujita, T., H. Shubiya, T. Ohashi, K. Yamanishi, y T. Taniguchi. 1986. Regulation of human interleukin-2 gene: Functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell*. 46: 401-407.
- Gennaro, A.R. 2000. Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.
- Gerstmayer, B., B. Groner, W. Wels, y B.S. Schnierle. 1999. Stable expression of the ecotropic retrovirus receptor in amphotropic packaging cells facilitates the transfer of recombinant vectors and enhances the yield of retroviral particles. *J Virol Methods*. 81: 71-5.
- 50 Gong, J.H., G. Maki, y H.G. Klingemann. 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*. 8: 652-8.
- Graham, F.L., y A.J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52: 456-.
- 55 Patente europea No. EP0758394. Groner, B., y D. Moritz. 1997. Bifunctional protein, preparation and use. Oficina Europea de Patentes.
- Gruber, M., B.A. Schodin, E.R. Wilson, y D.M. Kranz. 1994. Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli. *J Immunol.* 152: 5368-74.
- 60 Harlow, E., y D. Lane. 1989. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp.
- Harlow, E., y D. Lane. 1999. Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Holliger, P., T. Prospero, y G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 6444-8.
- 65

- Hoogenboom, H.R., A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, P. Hudson, y G. Winter. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-7.
- 5 Houdebine, L.M. 1997. Transgenic animals: Generation and use. Harwood Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. 576 pp.
- Huang, J.Y., y D.L. Brutlag. 2001. The EMOTIF database. *Nucleic Acids Res.* 29: 202-4.
- Ishiura, M., S. Hirose, T. Uchida, Y. Hamada, Y. Suzuki, y Y. Okada. 1982. Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology.* 2: 607-616.
- 10 Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, y G. Winter. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321: 522-5.
- Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185: 487-511.
- Kawai, S., y M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1172.
- 15 Kikuchi-Maki, A., S. Yusa, T.L. Catina, y K.S. Campbell. 2003. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol.* 171: 3415-25.
- Kinsella, T.M., y G.P. Nolan. 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther.* 7: 1405-13.
- 20020068044 (publicación). Klingemann, H.G. 2002. Natural killer cell lines and methods of use USA.
- 20 Koehne, G., H.F. Guo, D. Trivedi, R.Y. Williams, R.J. O'Reilly, y N.-K.V. Cheung. 2003. Redirection NK-cell cytolytic activity to solid tumors using chemieric scFv receptor gene-modified adoptive immunotherapy. In *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* Vol. 22. 175 (Resumen 703).
- Koene, H.R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A.E. von dem Borne, y M. de Haas. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 90: 1109-14.
- 25 Komatsu, F., y M. Kajiwara. 1998. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells. *Oncol Res.* 10: 483-9.
- Kostelny, S.A., M.S. Cole, y J.Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148: 1547-53.
- 30 Lam, K.S. 1997. Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Design.* 12: 145-167.
- Lee, V.H.L. 1990. Peptide and protein drug delivery. Marcel Dekker, Nueva York, NY.
- Lemischka, I.R., D.H. Raulet, y R.C. Mulligan. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell.* 45: 917-927.
- 35 Linder, M.W., R.A. Prough, y R. Valdes. 1997. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem.* 43: 254-66.
- Lonberg, N., y D. Huszar. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol.* 13: 65-93.
- Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstein, K.M. Higgins, S.R. Schramm, C.C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J.G. McCabe, y et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [véanse los comentarios]. *Nature.* 368: 856-9.
- 40 Lopata, M.A., D.W. Cleveland, y B. Sollner-Webb. 1984. High-level expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethylsulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research.* 12: 5707.
- Maki, G., H.G. Klingemann, J.A. Martinson, y Y.K. Tam. 2001. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res.* 10: 369-83.
- 45 Marasco, W.A., W.A. Haseltine, y S.Y. Chen. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human antihuman immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 7889-93.
- Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malmqvist, T.P. Clackson, J.M. Bye, y G. Winter. 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (NY).* 10: 779-83.
- 50 Marks, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, y G. Winter. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol. Biol.* 222: 581-97.
- Miller, A.D., y C. Buttimore. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol.* 6: 2895-2902.
- Milstein, C., y A.C. Cuello. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature.* 305: 537-40.
- 55 Nagashima, S., R. Mailliard, Y. Kashii, T.E. Reichert, R.B. Herberman, P. Robbins, y T.L. Whiteside. 1998. Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo. *Blood.* 91: 3850-61.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, y P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845.
- 60 Patente de los Estados Unidos No. 5,830,725. Nolan, G.P., y T. Kinsella. 1998. Rapid, stable high-titre production of recombining retrovirus USA.
- Pear, W., G. Nolan, M. Scott, y D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8392-8396.
- Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, y A. Moretta. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 190: 1505-16.

- Perussia, B., y G. Trinchieri. 1984. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells. *J Immunol.* 132: 1410-5.
- Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, y A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med.* 188: 953-60.
- Potter, H. 1988. Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry.* 174: 361-373.
- Potter, H., L. Weir, y P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 7161-7165.
- Presta, L.G. 1992. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 3: 394-8.
- Rassoulzadegan, M., B. Binetruy, y F. Cuzin. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature.* 295: 257.
- Reid, G.S., S. Bharya, H.G. Klingemann, y K.R. Schultz. 2002. Differential killing of pre-B acute lymphoblastic leukaemia cells by activated NK cells and the NK-92ci cell line. *Clin Exp Immunol.* 129: 265-71.
- Reisfeld, R.A., y S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, 26 de enero - 2 de febrero, 1985. Alan R. Liss, Nueva York. 609 pp.
- Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, y G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* 332: 323-7.
- Rose, J.K., L. Buonocore, y M. Whitt. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques.* 10: 520-525.
- Sambrook, J., y D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandri-Goldin, R.M., A.L. Goldin, J.C. Glorioso, y M. Levine. 1981. High-frequency transfer of cloned herpes simplex virus type I sequences to mammalian cells by protoplast fusion. *Mol. Cell. Biol.* 1: 7453-752.
- Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2163.
- Selden, R.F., K. Burke-Howie, M.E. Rowe, H.M. Goodman, y D.D. Morre. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biology.* 6: 3173-3179.
- Shalaby, M.R., H.M. Shepard, L. Presta, M.L. Rodrigues, P.C. Beverley, M. Feldmann, y P. Carter. 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 175: 217-25.
- Suresh, M.R., A.C. Cuello, y C. Milstein. 1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* 121: 210-28.
- Tam, Y.K., G. Maki, B. Miyagawa, B. Hennemann, T. Tonn, y H.G. Klingemann. 1999. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther.* 10: 1359-73.
- Touraev, A., y et. al. 1997. Plant male germ line transformation. *Plant J.* 12: 949-956.
- Traunecker, A., F. Oliveri, y K. Karjalainen. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9: 109-13.
- Trick, H.N., y et. al. 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3: 9-26.
- Turner, D.L., E.Y. Snyder, y C.L. Cepko. 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron.* 4: 833-845.
- Tutt, A., G.T. Stevenson, y M.J. Glennie. 1991. Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol.* 147: 60-9.
- Uherek, C., B. Groner, y W. Wels. 2001. Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 10: 523-34.
- Uherek, C., T. Tonn, B. Uherek, S. Becker, B. Schnierle, H.G. Klingemann, y W. Wels. 2002. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood.* 100: 1265-73.
- Verhoeven, M., C. Milstein, y G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science.* 239: 1534-6.
- Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, y A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 187: 2065-72.
- Weiner, L.M., J.I. Clark, M. Davey, W.S. Li, I. Garcia de Palazzo, D.B. Ring, y R.K. Alpaugh. 1995a. Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII. *Cancer Res.* 55: 4586-93.
- Weiner, L.M., J.I. Clark, D.B. Ring, y R.K. Alpaugh. 1995b. Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII. *J Hematother.* 4: 453-6.
- Weiner, L.M., M. Holmes, A. Richeson, A. Godwin, G.P. Adams, S.T. Hsieh-Ma, D.B. Ring, y R.K. Alpaugh. 1993. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. *J Immunol.* 151: 2877-86.
- Wells, J.A., M. Vasser, y D.B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene.* 34: 315-23.
- Whitt, M.A., L. Buonocore, J.K. Rose, V. Ciccione, y G. Gebeyehu. 1990. TransfectACE reagent promotes transient transfection frequencies greater than 90%. *Focus.* 13: 8-12.
- Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, y R. Axel. 1978. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell.* 14: 725.

- Wilmot, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, y K.H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-3.
- Wong, T.K., y E. Neumann. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 107: 584-587.
- 5 Wyborski, D.L., L.C. DuCoeur, y J.M. Short. 1996. Parameters affecting the use of the lac repressor system in eukaryotic cells and transgenic animals. *Environ Mol Mutagen*. 28: 447-58.
- Wyborski, D.L., y J.M. Short. 1991. Analysis of inducers of the E. coli lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res*. 19: 4647-53.
- 10 Yan, Y., P. Steinherz, H.G. Klingemann, D. Dennig, B.H. Childs, J. McGuirk, y R.J. O'Reilly. 1998. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res*. 4: 2859-68.
- Yusa, S., y K.S. Campbell. 2003. Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells. *J Immunol*. 170: 4539-47.
- Yusa, S., T.L. Catina, y K.S. Campbell. 2002. SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol*. 168: 5047-57.
- 15 Yusa, S., T.L. Catina, y K.S. Campbell. 2004. KIR2DL5 can inhibit human NK cell activation via recruitment of Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2). *J Immunol*. 172: 7385-92.
- Zoller, M.J., y M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol*. 154: 329-50.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la evaluación in vitro de la eficacia de un anticuerpo para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), comprendiendo el método:
 - (a) exponer una pluralidad de células objetivo al anticuerpo;
 - 5 (b) exponer las células objetivo a una pluralidad de células NK-92 modificadas para expresar CD16;
 - (c) controlar la pluralidad de células objetivo para determinar citólisis o apoptosis; y
 - (d) usar una pluralidad de células NK-92 no modificadas como control negativo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de células NK-92 modificadas comprende una secuencia de polinucleótidos introducida que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de Swiss-Prot P08637 o
10 Var_008801.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de células objetivo se expone al anticuerpo y luego se expone a la pluralidad de células NK-92.
4. El método de la reivindicación 3, en el que aproximadamente del 5 % al 30 % de las células objetivo se lisan o se inducen a entrar en apoptosis en presencia de células NK-92 en ausencia del anticuerpo.
- 15 5. El método de la reivindicación 3, en el que una relación efector:objetivo está entre 0,5:1 y 100:1.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la relación efector:objetivo está entre 1:1 y 20:1.
7. El método de la reivindicación 1, en el que las células objetivo se seleccionan del grupo que consiste en SKOV-3, P815, THP-I, U373MG, T98G, AML 193, SR91, ALL 1 y REI-I.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal.
- 20 9. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo quimérico comprende al menos dos dominios de unión a antígeno diferentes.
11. El método de la reivindicación 10, en el que al menos un dominio de unión a antígeno está adaptado para unirse a CD16.
- 25 12. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de células NK-92 modificadas expresan simultáneamente un polipéptido de señalización accesorio asociado.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el polipéptido de señalización accesorio asociado comprende FcεRI-γ (SEQ ID NO:5) o TCR-ζ (SEQ ID NO:7).
14. El método de la reivindicación 1, que comprende además exponer las células a una citocina, en el que la
30 citoquina comprende interleucina-2.

Figura 1

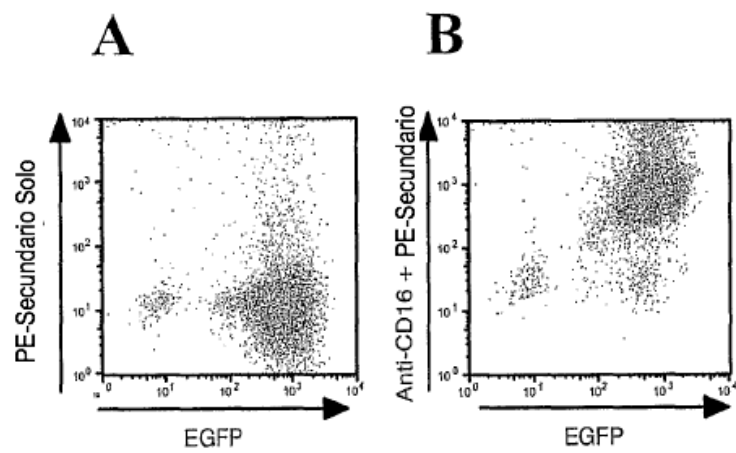


Figura 2

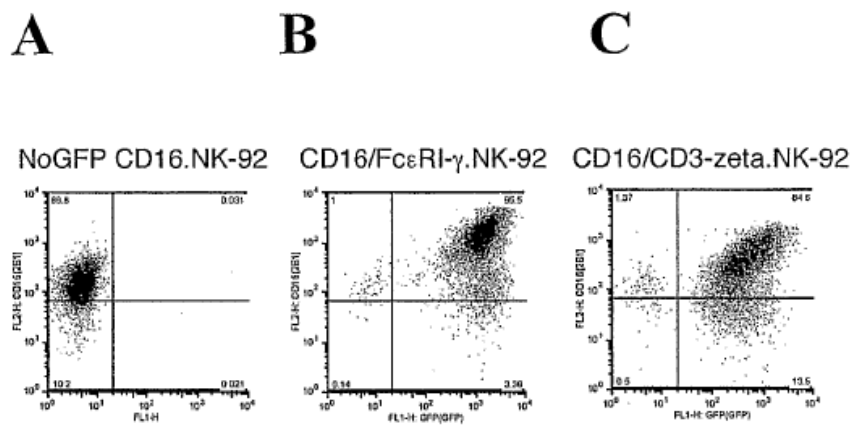


Figura 3

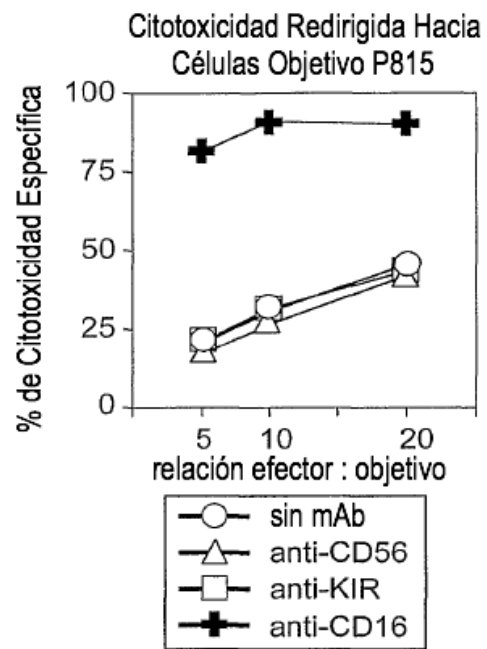


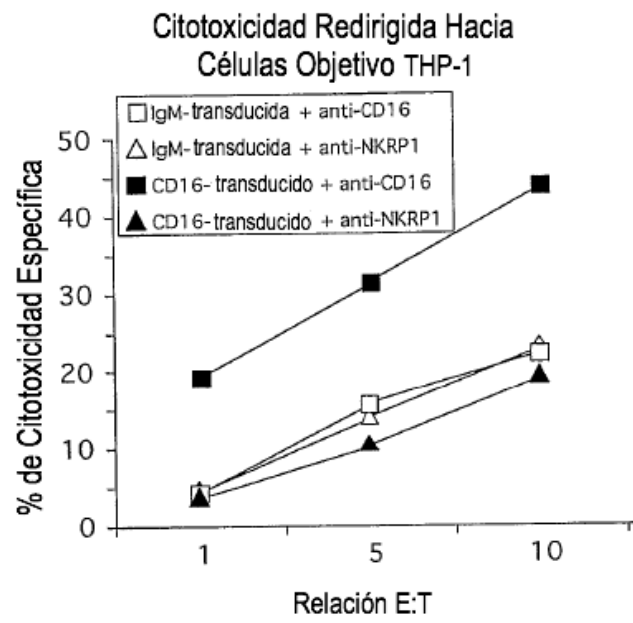
Figura 4

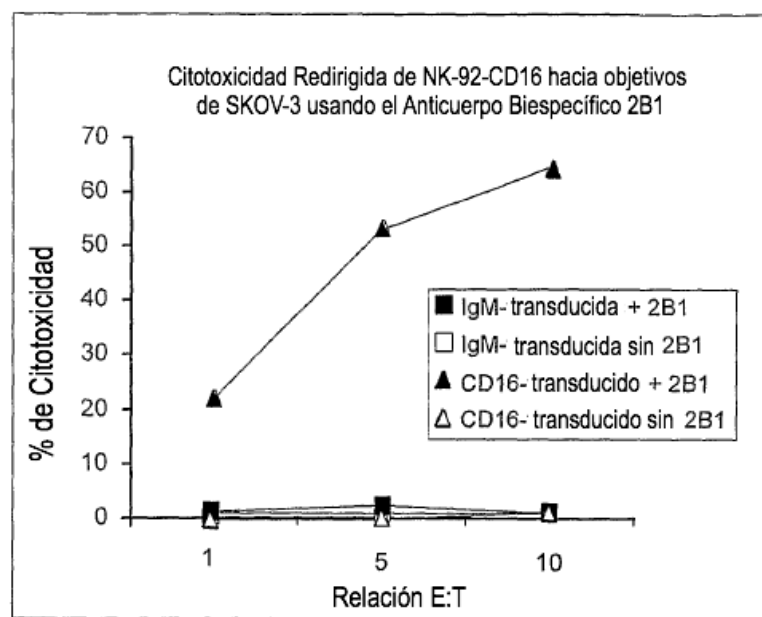
Figura 5

Figura 6