

REIVINDICACIONES

1.
- Una célula asesina natural (NK) aislada diseñada para expresar (1) un receptor de antígeno quimérico (CAR) y/o un receptor de células T (TCR)
- 5
- y (2) IL-15 humana (hIL-15) y no tener esencialmente expresión de CISH.
2.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK está diseñada para expresar un CAR.
- 10
3.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK está diseñada para expresar un TCR.
4.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK está diseñada para expresar un CAR y TCR.
- 15
5.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK se deriva de sangre de cordón, sangre periférica, médula ósea, células CD34⁺ o iPSC.
6.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK se deriva de la
- 20
- sangre del cordón.
7.
- La célula NK de la reivindicación 6, en la que la sangre del cordón se ha congelado previamente.
- 25
8.
- La célula NK de la reivindicación 1, en la que el CAR y/o TCR tiene especificidad antigénica para ligandos CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, NKG2D, MICA/MICB, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, antígeno

tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, HER2/Neu, ERBB2, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura del HIV-1, glicoproteína gp41 de la envoltura del HIV-1, GD2, CD123, CD33, CD30, CD56, c-Met, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11Ralfa, cadena kappa, cadena lambda, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRVIII, TRAIL/DR4 y/o VEGFR2.

9. La célula NK de la reivindicación 1, en la que el CAR tiene especificidad antigénica para CD19.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la célula NK expresa además una segunda citoquina.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la citoquina es IL-21 o IL-12.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la célula NK ha activado un objetivo mamífero de señalización de rapamicina (mTOR).

13. El método de la reivindicación 12, en el que la célula NK tiene una señalización JAK/STAT aumentada.

14. Un método para producir células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que comprende:

- (a) obtener una población inicial de células NK;
- (b) cultivar la población inicial de células NK en presencia de células presentadoras artificiales (APC);
- (c) introducir un vector de expresión CAR y/o TCR en las células NK;

- (d) expandir las células NK en presencia de APC, obteniendo así células NK expandidas; y
- (e) interrumpir la expresión de CISH en las células NK expandidas.

- 5 15. El método de la reivindicación 14, en el que interrumpir la expresión comprende utilizar silenciamiento génico mediado por CRISPR.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el silenciamiento génico mediado por CRISPR comprende poner en contacto las células CAR NK
- 10 con sgRNA y Cas9.
17. El método de la reivindicación 11, en el que el sgRNA se dirige al exón 4 de CISH.
- 15 18. El método de la reivindicación 17, en el que el sgRNA comprende las SEQ ID NO: 1-2.
19. El método de la reivindicación 14, en el que la población de partida de células NK se obtiene aislando células mononucleares usando un
- 20 gradiente de densidad ficoll-paque.
20. El método de la reivindicación 14, en el que las APC son APC irradiadas con rayos gamma.
- 25 21. El método de la reivindicación 14, en el que las APC son APC universales (uAPC).

22. El método de la reivindicación 14, en el que las APC están diseñadas para expresar 41BB e IL-21.
23. El método de la reivindicación 21, en el que las uAPC están diseñadas para expresar (1) CD48 y/o CS1 (CD319), (2) interleuquina-21 unida a la membrana (mbIL-21) y (3) ligando 41BB (41BBL)).
24. El método de la reivindicación 14, en el que las células NK y las APC están presentes en una proporción de 1:2.
25. El método de la reivindicación 14, en el que las células NK de las etapas (b) y (d) se expanden adicionalmente en presencia de IL-2.
26. El método de la reivindicación 25, en el que IL-2 está presente en una concentración de 100-300 U/ml.
27. El método de la reivindicación 25, en el que IL-2 está presente en una concentración de 200 U/mL.
28. El método de la reivindicación 14, en el que la introducción comprende la transducción.
29. El método de la reivindicación 14, en el que el constructo de expresión de CAR y/o TCR es un vector lentiviral o retroviral.
30. El método de la reivindicación 14, en el que las células NK son compatibles con GMP.

31. El método de la reivindicación 14, en el que las células NK son alogénicas.
32. El método de la reivindicación 14, en el que las células NK son autólogas.
33. El método de la reivindicación 14, donde el CAR y/o TCR tienen
5 especificidad antigénica para ligandos CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, NKG2D, MICA/MICB, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, HER2/Neu, ERBB2, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la
10 envoltura del HIV-1, glicoproteína gp41 de la envoltura del HIV-1, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11Ralfa, cadena kappa, cadena lambda, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 y/o VEGFR2.
- 15 34. El método de la reivindicación 14, en el que el CAR tiene especificidad antigénica para CD19.
35. El método de la reivindicación 14, en el que el constructo de expresión de CAR y/o TCR expresa además una citoquina.
20
36. El método de la reivindicación 35, en el que la citoquina es IL-15, IL-21 o IL-12.
37. El método de la reivindicación 14, que comprende además criopreservar la
25 población de células NK expandidas.
38. Una composición farmacéutica que comprende una población de células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o células NK producidas

por el método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 37 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

39. Una composición que comprende una cantidad eficaz de células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o células NK producidas por el método de cualquiera de las reivindicaciones 14-37 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto.
40. El uso de una composición que comprende una cantidad eficaz de células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o células NK producidas mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 14-37 para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico en un sujeto.
41. Un método para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o células NK producidas mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 14-37 al sujeto.
42. El método de la reivindicación 41, en el que el trastorno relacionado con el sistema inmune es un cáncer, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad de injerto contra hospedero, rechazo de aloinjerto o afección inflamatoria.
43. El método de la reivindicación 41, en el que el trastorno relacionado con el sistema inmune es una afección inflamatoria y las células del sistema inmune no tienen esencialmente expresión del receptor de glucocorticoides.

44. El método de la reivindicación 43, en el que al sujeto se le ha administrado o se le está administrando una terapia con esteroides.

45. El método de la reivindicación 41, en el que las células NK son autólogas.

5

46. El método de la reivindicación 41, en el que las células NK son alogénicas.

47. El método de la reivindicación 41, en el que el trastorno relacionado con el sistema inmune es un cáncer.

10

48. El método de la reivindicación 47, en el que el cáncer es un cáncer sólido o una neoplasia maligna hematológica.

49. El método de la reivindicación 41, que comprende además administrar al menos un segundo agente terapéutico.

15

50. El método de la reivindicación 49, en el que al menos un segundo agente terapéutico comprende quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radioterapia o bioterapia.

20

51. El método de la reivindicación 49, en el que las células NK y/o el al menos un segundo agente terapéutico se administran por vía intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal, intratumoral, intramuscular, endoscópica, intralesional, percutánea, subcutánea, regional o mediante inyección directa o perfusión.

25

52. El método de la reivindicación 49, en el que las células NK sin esencialmente expresión de CISH tienen una función mejorada en comparación con las células NK con expresión de CISH.
- 5 53. El método de la reivindicación 52, en el que la función mejorada se mide mediante tinción intracelular para IFN- γ y TNF- α , desgranulación de CD107a y destrucción de tumores mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr .
- 10 54. El método de la reivindicación 52, en el que la función mejorada se mide mediante el aumento de la expresión de granzima-b, perforina, TRAIL, CD3z, Eomes, T-bet, DAP12, DNAM, CD25 y/o Ki67.