

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula asesina natural (NK) aislada diseñada para expresar (1) un receptor de antígeno quimérico (CAR) y (2) IL-15 humana (hIL-15) y para no tener expresión de CISH.
2. La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK está diseñada para expresar un CAR.
3. La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK está diseñada para expresar un CAR.
4. 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<sup>+</sup> o iPSC.
5. La célula NK de la reivindicación 1, en la que la célula NK se deriva de la sangre del cordón.
6. La célula NK de la reivindicación 5, en la que la sangre del cordón se ha congelado previamente.
7. La célula NK de la reivindicación 1, en la que el CAR 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.

5

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

9. La célula NK de la reivindicación 1, en el que la célula NK expresa además una segunda citoquina, en donde la citoquina es IL-21 o IL-12.

10

10. La célula NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la célula NK ha activado un objetivo mamífero de señalización de rapamicina (mTOR).

15

11. La célula NK de la reivindicación 10, en el que la célula NK tiene una señalización JAK/STAT aumentada.

20 12. Un método *in vitro* para producir células NK de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la célula NK es célula asesina natural (NK) aislada diseñada para expresar (1) un receptor de antígeno quimérico (CAR) y (2) IL-15 humana (hIL-15) y no tener expresión de CISH, en el que el método comprende:

25 (a) obtener una población inicial de células NK a partir de sangre de cordón umbilical;

(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

13. El método de la reivindicación 12, en el que interrumpir la expresión comprende utilizar silenciamiento génico mediado por CRISPR.

10 14. El método de la reivindicación 13, en el que el silenciamiento génico mediado por CRISPR comprende poner en contacto las células CAR NK con sgRNA y Cas9.

15. El método de la reivindicación 12, en el que el sgRNA se dirige al exón 4 de CISH.

15

16. El método de la reivindicación 15, en el que el sgRNA comprende las SEQ ID NO: 1-2.

20 17. El método de la reivindicación 12, en el que la población de partida de células NK se obtiene aislando células mononucleares usando un gradiente de densidad ficoll-paque.

18. El método de la reivindicación 12, en el que las APC son APC irradiadas con rayos gamma.

25

19. El método de la reivindicación 12, en el que las APC son APC universales (uAPC).

20. El método de la reivindicación 12, en el que las APC están diseñadas para expresar 41BB e IL-21.
21. El método de la reivindicación 19, 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)).
22. El método de la reivindicación 12, en el que las células NK y las APC están presentes en una proporción de 1:2.
23. El método de la reivindicación 12, en el que las células NK de las etapas (b) y (d) se expanden adicionalmente en presencia de IL-2.
24. El método de la reivindicación 23, en el que IL-2 está presente en una concentración de 100-300 U/ml.
25. El método de la reivindicación 23, en el que IL-2 está presente en una concentración de 200 U/mL.
26. El método de la reivindicación 12, en el que la introducción comprende la transducción.
27. El método de la reivindicación 12, en el que el constructo de expresión de CAR y/o TCR es un vector lentiviral o retroviral.
28. El método de la reivindicación 12, en el que las células NK son compatibles con GMP.

29. El método de la reivindicación 12, en el que las células NK son alogénicas.
30. El método de la reivindicación 12, en el que las células NK son autólogas.
31. El método de la reivindicación 12, 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 32. El método de la reivindicación 12, en el que el CAR tiene especificidad antigénica para CD19.
33. El método de la reivindicación 12, en el que el constructo de expresión de CAR y/o TCR expresa además una citoquina.  
20
34. El método de la reivindicación 33, en el que la citoquina es IL-15, IL-21 o IL-12.
35. El método de la reivindicación 12, que comprende además criopreservar la  
25 población de células NK expandidas.