

REIVINDICACIONES

1. Una población de células asesinas naturales (NK) modificadas, en donde las células NK expresan al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consta de antígeno de leucocitos humanos E (HLA-E), antígeno de leucocitos humanos F (HLA-F), y antígeno de leucocitos humanos G (HLA-G);

en donde las células NK comprenden una interrupción genéticamente modificada de una o más copias de β -2 microglobulina endógena (B2M); y

en donde las células NK comprenden una interrupción genéticamente modificada de una o más copias de un gen relacionado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II seleccionado del grupo que consta de proteína que contiene anquirina asociada al factor X regulador (RFXANK), factor 5 regulador (RFX5), proteína asociada al factor X regulador (RFXAP), y transactivador de clase II (CIITA).

2. La población de células NK modificadas de la reivindicación 1, en donde las células NK comprenden además una molécula de ácido nucleico que codifica para un producto génico suicida.

3. La población de células NK modificadas de la reivindicación 2, en donde las células NK comprenden un gen suicida de timidina cinasa (TK) de virus de herpes simple.

4. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las células NK se derivan

de células madre pluripotentes.

5. La población de células NK modificadas de la reivindicación 4, en donde las células madre pluripotentes son células madre embrionarias.

6. La población de células NK modificadas de la reivindicación 4, en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas.

7. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las células NK expresan uno o más marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consta de CD56, CD45, CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y NKp44.

8. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la población de células NK modificadas es capaz de injertarse en un sujeto después de la administración.

9. La población de células NK modificadas de la reivindicación 8, en donde al menos el 50% de la población de células NK modificadas es capaz de injertarse en un tejido diana del sujeto.

10. La población de células NK modificadas de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la población de células NK modificadas es capaz de permanecer injertada en el tejido diana del sujeto durante al menos 20 días después de la administración.

11. La población de células NK modificadas de cualquiera

de las reivindicaciones 8-10, en donde el tejido diana es sangre o médula ósea.

12. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde las células NK son capaces de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula de cáncer.

13. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde las células NK son capaces de inducir citotoxicidad de células naturales (NCC) de una célula de cáncer.

14. La población de células NK modificadas de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde las células NK disminuyen la carga tumoral en al menos 10%.

15. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde las células NK tienen al menos aproximadamente un incremento de 5% en el volumen celular en comparación a las células NK de sangre periférica.

16. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde las células expresan un receptor de antígeno quimérico o un receptor Fc.

17. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde las células NK comprenden una interrupción modificada genéticamente de todas las copias de B2M endógena.

18. La población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde las células NK

comprenden una interrupción modificada genéticamente de todas las copias de un gen relacionado con HLA de clase II seleccionado del grupo que consta de RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA.

19. Un método para producir células asesinas naturales (NK) modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas en condiciones libres de alimentador, el método que comprende

(a) cultivar células madre pluripotentes humanas genéticamente modificadas para interrumpir una o más copias de β -2 microglobulina endógena (B2M) y una o más copias de un gen relacionado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II seleccionado del grupo que consta de proteína que contiene anquirina asociada al factor regulador X (RFXANK), factor regulador 5 (RFX5), proteína asociada al factor regulador X (RFXAP), y transactivador de clase II (CIITA);

(b) diferenciar las células madre pluripotentes humanas en células precursoras capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos;

(c) diferenciar las células precursoras a células NK en condiciones libres de alimentación en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L; y

(d) cultivar las células NK en un medio de cultivo que comprende IL-15 e IL-18, y en la presencia de un anticuerpo o ligando que se une a un receptor en células NK para promover

la activación de las células NK,

generando de esta manera células NK modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas.

20. Un método para producir células asesinas naturales (NK) modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas en condiciones libres de alimentador, el método que comprende

(a) cultivar células madre pluripotentes humanas genéticamente modificadas para interrumpir una o más copias de β -2 microglobulina endógena (B2M) y una o más copias de un gen relacionado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II seleccionado del grupo que consta de proteína que contiene anquirina asociada al factor regulador X (RFXANK), factor regulador 5 (RFX5), proteína asociada al factor regulador X (RFXAP), y transactivador de clase II (CIITA);

(b) diferenciar las células madre pluripotentes humanas usando cuerpos embrioides en células precursoras capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos; y

(c) diferenciar las células precursoras a células NK en condiciones libres de alimentación en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L;

generando de esta manera células NK modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas.

21. El método de la reivindicación 20, que comprende además (d) cultivar las células NK en un medio de cultivo que

comprende IL-15 e IL-18, y en la presencia de un anticuerpo o ligando que se une a un receptor en una célula NK para promover la activación de las células NK.

22. El método de la reivindicación 19 o la reivindicación 21, en donde el paso (d) comprende cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo que se une a DNAM-1, un anticuerpo que se une a OX40, un anticuerpo que se une a NKG2D, un anticuerpo que se une a 2B4, un anticuerpo que se une a NKp30, o un anticuerpo que se une a NKp46, o una combinación de estos.

23. El método de la reivindicación 22, en donde el paso (d) comprende cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo que se une a NKp30 y un anticuerpo que se une a DNAM-1.

24. El método de la reivindicación 19 o reivindicación 21, en donde el paso (d) comprende cultivar las células NK en la presencia de un ligando que se une a DNAM-1, un ligando que se une a OX40, un ligando que se une a NKG2D, un ligando que se une a 2B4, un ligando que se une a NKp30, o un ligando que se une a NKp46, o una combinación de estos.

25. El método de la reivindicación 24, en donde el paso (d) comprende cultivar las células NK en la presencia de un ligando que se une a NKp30 y un ligando que se une a DNAM-1.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19 o 21-25, en donde el medio de cultivo en el paso (d) comprende además IL-21.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-

26, en donde las células madre pluripotentes humanas del paso (a) comprenden además una molécula de ácido nucleico que codifica para un producto génico suicida.

28. El método de la reivindicación 27, en donde las células NK comprenden un gen suicida de timidina cinasa (TK) de virus de herpes simple.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-28, en donde las células madre pluripotentes humanas son células madre embrionarias humanas.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-28, en donde las células madre pluripotentes humanas son células madre pluripotentes inducidas por humanos

31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-30, en donde el medio de cultivo del paso (c) comprende además UM171.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-31, en donde las células NK expresan uno o más marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consta de CD56, CD45, CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y NKp44.

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-32, en donde las células NK expresan al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consta de antígeno de leucocitos humanos E (HLA-E), antígeno de leucocitos humanos F (HLA-F), y antígeno de leucocitos humanos G (HLA-G).

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-33, en donde las células NK son capaces de injertarse en un

sujeto después de la administración.

35. El método de la reivindicación 34, en donde al menos el 50% de las células NK son capaces de injertarse en el sujeto.

36. El método de la reivindicación 34 o la reivindicación 35, en donde las células NK son capaces de permanecer injertadas en el sujeto durante al menos 20 días después de la administración.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 34-36, en donde las células NK son capaces de injertarse en la sangre y la médula ósea.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-37, en donde las células NK son capaces de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula de cáncer.

39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19-38, en donde las células NK son capaces de inducir citotoxicidad de células naturales (NCC) de una célula de cáncer.

40. El método de la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en donde las células NK disminuyen la carga tumoral en al menos 10%.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 19 y 21-40, en donde el paso (d) se repite hasta cinco veces.

42. Un método para incrementar la pureza de una población de células NK derivadas de células madre pluripotentes, en donde el método comprende diferenciar cuerpos embrioides a

células NK en condiciones libres de alimentación en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L y en la presencia de UM171.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el medio de cultivo comprende además IL-3.

44. El método de la reivindicación 42 o la reivindicación 43, en donde el método se realiza en un recipiente recubierto con un fragmento de fibronectina humana recombinante y DLL4.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 42-44, en donde el método se realiza durante aproximadamente un día a aproximadamente 21 días.

46. Una composición farmacéutica que comprende la población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, y un portador farmacéuticamente aceptable.

47. Un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto en necesidad de esto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK modificadas de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, o la composición farmacéutica de la reivindicación 46, tratando de esta manera la enfermedad o trastorno en el sujeto.

48. El método de la reivindicación 47, en donde la enfermedad o el trastorno es cáncer.

49. El método de la reivindicación 47 o la reivindicación 48, en donde el método comprende además administrar una o más citocinas al sujeto.

50. El método de la reivindicación 49, en donde la una o más citocinas son IL-15 e/o IL-2.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 47-50, en donde la administración incrementa el tiempo de supervivencia del sujeto en al menos 20 días con respecto al tiempo de supervivencia del sujeto en la ausencia de administración de la población de células NK modificadas.

52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 47-50, en donde la administración disminuye la carga tumoral en el sujeto.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 47-52, en donde el método comprende además administrar uno o más anticuerpos al sujeto.

54. El método de la reivindicación 47, en donde la enfermedad o trastorno es un trastorno autoinmunitario.

55. El método de la reivindicación 54, en donde el método comprende además administrar uno o más anticuerpos al sujeto.