

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 094**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**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)  
**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2005 E 14171739 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2801583**

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

30 Prioridad:

**10.07.2004 US 586581 P**

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

**08.08.2018**

73 Titular/es:

**FOX CHASE CANCER CENTER (100.0%)  
333 Cottman Avenue  
Philadelphia, PA 19111-2497, US**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, KERRY S.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 678 094 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).

## Líneas de células asesinas naturales genéticamente modificadas

### Descripción

#### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 [0001] Ciertas líneas de células asesinas naturales (NK) que han sido manipuladas genéticamente para expresar una proteína de receptor de superficie celular que participa en las respuestas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos se dan a conocer. Más específicamente, la presente descripción se refiere a una línea celular asesina natural NK-92 que, en una primera realización, se ha modificado para expresar una proteína receptora de la superficie celular Fc tal como CD16, y en una segunda realización, se ha modificado para expresar tanto una proteína receptora de superficie de células Fc tal como CD 16 como una o más de las proteínas de señalización accesorias asociadas tales como FcR- $\gamma$  o TCR- $\zeta$  y/o una citocina tal como IL-2,

#### 15 ANTECEDENTES

20 [0002] Un número de anticuerpos, más notablemente Rituximab (MabThera®; Hoffmann-LaRoche, Ltd; Basilea, Suiza) y Herceptin® (Genentech, Inc.; South San Francisco, CA), han demostrado valor terapéutico significativo como agentes antitumorales altamente selectivos y eficaces. Aunque estos anticuerpos se pueden unir 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, una tabla de abreviaturas si se proporciona en la Tabla Z, situada después de los Ejemplos) a 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).

25 [0003] Las células NK son una clase de linfocitos que típicamente comprenden aproximadamente 10% de los linfocitos en un ser humano. La función principal de las células NK es proporcionar una respuesta inmune celular innata contra el tumor y las células infectadas (diana). También se han demostrado y/o se consideran probables los roles en el cebado y la regulación de la respuesta inmune 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<sup>+</sup>, muestran una variedad de receptores de superficie celular activadores e inhibidores. La unión o ligación de un receptor de células NK activador al ligando correspondiente en una célula diana hace que la célula NK ejerza un efecto citotóxico directamente contra la célula diana y secrete una variedad de citoquinas que realizan funciones tales como la estimulación y el reclutamiento de otros elementos del sistema inmune para actuar contra el objetivo. Las células NK activadas lisan las células diana mediante la secreción de las enzimas perforina y granzima, la estimulación de los receptores iniciadores de la apoptosis y otros mecanismos menos bien caracterizados.

30 [0004] Los receptores inhibidores de células NK interactúan predominantemente con las proteínas del complejo de histocompatibilidad principal de clase I ("MHC-I") en la superficie de una célula normal. Cuando están tan comprometidos, estos receptores inhibidores impiden que las células NK se activen. Las moléculas MHC-I definen las células como "pertenecientes" a un individuo en particular. Ya que la expresión de estas moléculas de MHC-I puede evitar la activación de células NK hacia una célula diana, se cree que las células NK pueden activarse solo por células en las que estas moléculas "propias" de MHC-I faltan o son defectuosas, como suele ser el caso de células infectadas por tumores o virus. El fenotipo y el patrón de activación de las células NK son distintos de los exhibidos por los linfocitos T citotóxicos ("CTL", fenotipo CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) que se activan por células diana que muestran pequeños fragmentos de péptidos extraños derivados de virus o células tumorales unidas a las moléculas MHC-I superficiales. Los científicos han especulado que las células NK evolucionaron como respuesta al tumor y a las células infectadas que evitan la destrucción por CTL a través de la supresión o la interrupción de la presentación de moléculas de MHC-I presentadoras de péptidos.

35 [0005] Las células NK se han evaluado como un agente terapéutico en el tratamiento de ciertos cánceres. Las células NK usadas para este fin se aíslan de la fracción de sangre de linfocitos de sangre periférica ("PBL") del sujeto, se expanden en cultivo celular para obtener cantidades suficientes de células, y luego se vuelven a infundir en el sujeto. Aunque los resultados de esta terapia han sido prometedores, la preparación de las células NK autólogas es costosa, laboriosa y lleva mucho tiempo. Además, el control de calidad de estas células se complica debido a que 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 en el uso de células NK como agente terapéutico resulta de la presencia de antígenos de superficie en las células que pueden provocar una respuesta de rechazo inmune cuando las células se infunden en un sujeto distinto del que las aisló. Esto requiere un cuidadoso emparejamiento cruzado de MHC-I entre el donante y el receptor, así como la necesidad de inmunosuprimir al receptor.

40 [0006] La línea de tipo NK celular NK-92 fue descubierta en la sangre de un sujeto que padece un linfoma no Hodgkins. Las células NK-92 carecen de los principales receptores inhibidores que se muestran en las células NK normales, pero retienen la mayoría de los receptores activadores. La caracterización de la línea celular 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 que a menudo exhiben niveles más

altos de citotoxicidad hacia estos objetivos. Las células NK-92, sin embargo, no atacan a las células normales ni provocan una respuesta de rechazo inmune. Además, las células NK-92 pueden cultivarse rápida y establemente y mantenerse en cultivo celular continuo y, por lo tanto, se pueden preparar en grandes cantidades bajo un control de calidad compatible con c-GMP. Esta combinación de características ha dado lugar a que NK-92 ingrese en ensayos clínicos actualmente en curso para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer.

**[0007]** Aunque las células NK-92 conservan casi todos los receptores activadores y las vías citolíticas asociadas con las células NK, que no expresan el receptor CD16 y, por lo tanto, no pueden lisar células diana 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 celulares similares a NK además de NK-92. Algunas de estas otras líneas celulares 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 celulares de tipo NK actualmente conocidas es un candidato viable como agente terapéutico aunque carece de CD16 y, en consecuencia, la capacidad de matar células diana a través del mecanismo de ADCC.

**[0008]** Por lo tanto, sería una ventaja para restaurar la expresión CD16 y la capacidad de actuar a través del mecanismo de ADCC con las células NK-92, permitiendo de este modo que esas células se utilicen en concierto con anticuerpos para fines terapéuticos y relacionados. Sin embargo, se ha encontrado que las líneas celulares NK son recalcitrantes a la transferencia de genes, una característica que ha obstaculizado el desarrollo de dichas líneas celulares con fines de investigación o terapéuticos. Para las células NK-92, se han logrado eficiencias de transformación de solo 5-15% y 10-20% usando transferencia génica mediada por partículas o transducción retroviral (Nagashima *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999). Las líneas celulares NK-92 que expresan establemente el receptor de superficie celular CD16 no están actualmente disponibles.

## RESUMEN

**[0009]** Las diversas realizaciones de la descripción proporcionan o utilizan una célula NK-92 modificada para expresar un receptor de Fc, tales como CD16 (FcγRIII-A), o más en general, cualquier otro receptor de Fc, en la superficie de la célula.

**[0010]** Se dan a conocer las células NK-92 modificadas para expresar un receptor de Fc sobre la superficie de la célula; el receptor Fc es un receptor activador Fcγ, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor de Fc, tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden ser de cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluyendo formas de afinidad de unión baja y alta. Las células NK-92 pueden modificarse 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 SEQ ID NO:1 o 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; dicha expresión puede correlacionarse con una expresión superficial aumentada del receptor de Fc. Polipéptidos de señalización de accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO:5) o TCR-ζ (SEQ ID NO:7). La expresión de una citoquina (como la interleucina-2) también puede correlacionarse con la viabilidad o citotoxicidad de las células NK-92 modificadas.

**[0011]** En un segundo aspecto, la divulgación se refiere a procedimientos para la evaluación *in vitro* de la eficacia de un anticuerpo para inducir la muerte celular. Dichos métodos pueden incluir los pasos de exponer una célula diana a un anticuerpo (monoclonal (purificado o en supermatos de hibridoma), policlonal, quimérico (tal como uno que tiene al menos dos dominios de unión a antígenos diferentes (en el que un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor de Fc)), o cualquier otra forma de anticuerpo), exponiendo la célula diana a una célula NK-92 modificada que expresa un receptor de Fc; y luego monitorear la citotoxicidad, citolisis o apoptosis de la célula diana, o una combinación de las mismas. Se pueden usar pluralidades de células y anticuerpos. Las células diana utilizadas en los métodos pueden tener una tasa de lisis o aptótica de aproximadamente 5%-30% en presencia de las células NK-92 modificadas en ausencia de anticuerpo. Efectores: las proporciones diana incluyen 0,5:1 a 100:1, incluyendo 1:1 y 20:1. Las células diana en los métodos incluyen SKOV-3, P815, THP-1, U373MG, T98G, A ML193, SR91, ALL1 y REH; estas y cualesquiera otras células diana 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.

**[0012]** Las células NK-92 en este aspecto pueden incluir aquellas modificadas para expresar un receptor de Fc en una superficie de la célula; el receptor Fc puede ser una activación de receptor Fcγ, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor de Fc, tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden ser de cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluyendo formas de afinidad de unión baja y alta. Las células NK-92 pueden modificarse 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 SEQ ID NO:1 o 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, citoquinas o fragmentos de los mismos; dicha expresión puede correlacionarse con una expresión

superficial aumentada del receptor de Fc. Polipéptidos de señalización asociados accesorios incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO:5) o TCR-ζ (SEQ ID NO:7). La expresión de una citoquina (como la interleucina-2) también puede correlacionarse con la viabilidad o citotoxicidad de las células NK-92 modificadas. Las citocinas también se pueden agregar al ataque de fuentes exógenas.

5  
[0013] En un tercer aspecto, la descripción se refiere a métodos para detectar citolítica y la actividad inductora de la apoptosis, incluyendo el método las etapas de exponer una célula diana en ausencia de anticuerpos a una célula NK-92 que expresa un receptor Fc, y luego, se monitorea la célula diana para detectar citotoxicidad, citólisis o apoptosis. La monitorización puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citoquina. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueantes, tales como la activación de anticuerpos o polipéptidos enmascaradores del receptor (o fragmentos de estos) para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

10  
15  
[0014] En un cuarto aspecto, la descripción está dirigida a métodos de ensayo de 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, administrando células modificadas NK-92 que expresan un receptor de Fc al sujeto; y luego monitorear 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. La monitorización puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citoquina. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueantes, tales como la activación de anticuerpos o polipéptidos enmascaradores del receptor (o fragmentos de estos) para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

20  
25  
[0015] El anticuerpo puede ser monoclonal (purificado o en sobrenadantes de hibridoma), policlonal, quimérico (tal como uno que tiene al menos dos dominios diferentes de unión a antígeno (en donde un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor Fc)), o cualquier otra forma de anticuerpo. Las citocinas (tales como la interleucina-2), o fragmentos de las mismas, se pueden expresar a partir de células NK-92 modificadas o se pueden administrar exógenamente. Los sujetos incluyen bovinos (por ejemplo, vacas), cerdos (por ejemplo, chanchos, puercos), conejos, alpacas, caballos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), hurones, ratas, ratones, aves de corral (pollos, pavos) y búfalo. Los sujetos también pueden ser humanos.

30  
35  
[0016] Las células NK-92 en este aspecto pueden incluir aquellas modificadas para expresar un receptor de Fc sobre la superficie de la célula; el receptor Fc puede ser una activación de receptor Fcγ, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor de Fc, tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores Fc pueden ser de cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluyendo formas de afinidad de unión baja y alta. Las células NK-92 pueden modificarse 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 SEQ ID NO:1 o 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, citoquinas o fragmentos de los mismos; dicha expresión puede correlacionarse con una expresión superficial aumentada del receptor de Fc. Polipéptidos de señalización asociados accesorios incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO:5) o TCR-ζ (SEQ ID NO:7).

40  
45  
[0017] En aún otro quinto aspecto, la descripción se refiere a métodos de tratamiento de un sujeto, teniendo el sujeto un tumor, infección u otra lesión, incluyendo el método la administración a un sujeto de anticuerpos que se unen específicamente al tumor, infección u otra lesión; y luego administrar al sujeto células NK-92 modificadas que expresan un receptor de Fc. Una reducción en el tumor, infección o lesión indica una respuesta terapéutica. La monitorización puede incluir la determinación de los niveles de expresión de IFN-γ o de citoquina. El método puede incluir además la aplicación de agentes bloqueadores, tales como la activación de anticuerpos o polipéptidos enmascaradores del receptor (o fragmentos de estos) para suprimir uno o más receptores activadores en la célula NK-92.

50  
55  
[0018] El anticuerpo puede ser monoclonal (purificado o en sobrenadantes de hibridoma), policlonal, quimérico (tal como uno que tiene al menos dos dominios diferentes de unión a antígeno (en la que un dominio de unión puede adaptarse para unirse al receptor Fc)), o cualquier otra forma de anticuerpo. Las citocinas (tales como la interleucina-2), o fragmentos de las mismas, se pueden expresar a partir de células NK-92 modificadas o se pueden administrar exógenamente. Los sujetos incluyen bovinos (por ejemplo, vacas), cerdos (por ejemplo, chanchos, puercos), conejos, alpacas, caballos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), hurones, ratas, ratones, aves de corral (pollos, pavos) y búfalo. Los sujetos también pueden ser humanos.

60  
65  
[0019] Las células NK-92 en este aspecto pueden incluir aquellas modificadas para expresar un receptor de Fc sobre la superficie de la célula; el receptor Fc puede ser una activación de receptor Fcγ, CD16 (FcγRIII-A), o cualquier miembro de una clase de receptor de Fc, tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII, FcRn, Fcα y Fcε. Los receptores de Fc pueden ser de cualquier afinidad de unión por sus ligandos, o fragmentos de sus ligandos, incluyendo formas de afinidad de unión baja y alta. Las células NK-92 pueden modificarse 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 SEQ ID NO:1 o 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, citoquinas o fragmentos de los mismos; dicha expresión puede correlacionarse con una expresión superficial aumentada del receptor de Fc. Polipéptidos de señalización accesorios asociados incluyen FcεRI-γ (SEQ ID NO:5) o TCR-ζ (SEQ ID NO:7).

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Los objetos, características y ventajas de la presente invención se apreciarán más fácilmente por referencia a la siguiente descripción cuando se considera en conjunción con los dibujos adjuntos.

10 La Figura 1 muestra diagramas de dispersión de citómetro de flujo de células NK-92 transducidas con ADNc de CD16 usando el vector pBMN-IRES-EGFP después de la tinción sin anticuerpo primario (Figura 1A) y con anticuerpo primario (anti-CD 16) y 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 CD16 solo (Figura 2A) y el aumento en la expresión de CD16 cuando las células NK-92 se transducen con ADNc de CD16 en combinación con FcεRI-γ ADNc (γ; en vector pBMN-IRES-EGFP (Figura 2B), o CD3 ζ ADNc (Figura 2C).

20 La Figura 3 es un diagrama gráfico que muestra la citotoxicidad redirigida de células diana FcγRII/III<sup>+</sup> P815 por las células NK-92-CD16 inducidas por anticuerpo anti-CD16 (3G8), pero no los anticuerpos hacia CD56 (B159) o KIR (DX9). Las células fueron analizadas usando liberación <sup>51</sup>Cr de las células diana P815 en el efector indicado a relaciones diana.

25 La Figura 4 es un diagrama gráfico que ilustra la citotoxicidad redirigida de células diana FcγRII/III<sup>+</sup> THP-1 por células NK-92-CD16 (símbolos rellenos) inducidos por anticuerpo anti-CD 16 (3G8; cuadros), pero no anticuerpo anti-NKR-P1 (B199, triángulos). La citotoxicidad redirigida no fue inducida por anti-CD16 en células NK-92 transducidas con ADNc de IgM de ratón (símbolos abiertos).

30 La Figura 5 es un diagrama gráfico que ilustra la citotoxicidad redirigida de células diana SKOV-3 por células NK-92-CD16 (triángulos), pero no NK-92 transducida por IgM de ratón (cuadrados), inducida por anticuerpo 2B1 bispecífico (símbolos rellenos). 2B1 contiene dominios F(ab) que reconocen el antígeno Her2/neu en células SKOV-3 y CD16 en NK-92-CD16.

35 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 las células diana P815 en combinación con la concentración indicada de anticuerpo monoclonal bi-específico quimérico 2B1.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0021] Aunque la presente invención es susceptible de realización en muchas formas diferentes, se muestran en los dibujos, y se describirán aquí en detalle, realizaciones y ejemplos específicos de la misma, en el entendimiento de que la presente descripción ha de ser considerada como una ejemplificación de los principios de la invención y no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas ilustradas.

[0022] Se dan a conocer líneas celulares y métodos que potencian y amplían el alcance efectivo de la respuesta de ADCC. Se describe una línea celular NK-92 que expresa de forma estable una proteína receptora de superficie de células Fc, tal como CD16. (Varios nomenclaturas diferentes han evolucionado para referirse a ciertos receptores de Fc, que se usan indistintamente en el presente documento, incluyendo CD16, FcγRIII-A, y sus polimorfismos u otras formas que tienen niveles de afinidad variados). La invención proporciona una composición que comprende:

una célula NK-92 modificada para expresar un receptor de Fc en una superficie de la célula; y

55 un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno que se expresa mediante una célula tumoral o una célula infectada;

en donde el receptor de Fc comprende CD16 (FcγRIII-A).

60 [0023] Muchas empresas de biotecnología están desarrollando actualmente nuevos anticuerpos monoclonales para uso en inmuno-terapias para el cáncer. La intención de este esfuerzo de desarrollo es la de preparar anticuerpos que se unan a antígenos proteicos particulares que se expresan de forma 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 mostrados en las células NK e iniciar la lisis de la célula tumoral a través del mecanismo ADCC. La alta eficacia y especificidad de los agentes terapéuticos basados en este enfoque se ha demostrado clínicamente mediante el uso del anticuerpo monoclonal Herceptin (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. Numerosos otros anticuerpos terapéuticos que se dirigen a una amplia variedad de antígenos específicos de tumores adicionales están en desarrollo.

5 **[0024]** Una parte esencial del desarrollo de terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos es la determinación in-vitro de la eficacia y la especificidad de NK ADCC mediada por células que se imparte por la unión del anticuerpo a la célula tumoral diana. Estas pruebas se realizan típicamente usando linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de donantes humanos normales o células NK aisladas de la fracción de sangre PBL como células efectoras. Además de la engorrosa carga inherente a la obtención y el procesamiento rutinario de muestras de sangre humana, existe una considerable variabilidad en la actividad y cantidad de células efectoras obtenidas de diferentes donantes y una variabilidad similar entre las 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 CD 16 pueden dar lugar a diferencias significativas en la afinidad CD 16 por las porciones Fc de anticuerpos y las diferencias en el estado de activación de las células donantes NK pueden alterar el nivel de expresión CD 16 en la célula superficie. La concentración de células NK en la fracción de PBL también varía, en parte por razones genéticas y en parte como un reflejo del estado fisiológico del donante. Esta variabilidad de células efectoras complica en gran medida la evaluación de anticuerpos monoclonales como posibles agentes terapéuticos. Además, aunque las células NK que expresan la baja afinidad de unión de CD16 son las más comunes, el isotipo de alta afinidad es 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 bajas y altas de CD16 es una tarea difícil. La disponibilidad de una población clonal de células NK humanas que exprese un nivel constante de actividad de CD16 proporcionaría un beneficio sustancial como efector estándar en la evaluación de anticuerpos para la actividad y especificidad de ADCC.

25 **[0025]** De la misma manera, las terapias basadas en anticuerpos pueden beneficiarse de la presencia de células NK que tienen altos niveles conocidos de la actividad citotóxica de la capacidad y dentro del sujeto Fc vinculante. Además de las variabilidades descritas anteriormente, 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, son capaces de matar o desactivar las células NK de un modo específico. De forma similar, otros tipos de células tumorales pueden interferir con la producción, la actividad y/o la especificidad de las células NK. Dicha variabilidad hace que la dependencia de las células NK sujeto sea problemática en un entorno terapéutico y sugiere que la administración conjunta 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. De nuevo, se espera que la disponibilidad de una población clonal de células NK humanas que exprese un nivel constante de actividad de CD16 proporcione un beneficio sustancial.

40 **[0026]** Una limitación importante en la utilidad de las células NK es que expresan un repertorio de receptores de superficie celular que, cuando se une al correspondiente ligando MHC-I sobre una célula diana normal, fuerte y específicamente prevenir la destrucción de la célula diana mediante la inhibición de la activación de células NK, citotoxicidad y respuesta de citocinas. Esta inhibición puede derogar la activación de las células NK causada por la unión de los receptores activadores de las células NK a sus ligandos conjugados en la célula diana. Por tanto, una célula NK destruirá una célula diana que muestra solo ligandos activadores, pero ahorrará una célula diana que muestra ligandos inhibidores de MHC-I incluso si también están presentes ligandos activadores.

45 **[0027]** Casi todas las células de los mamíferos presentan ciertas proteínas de superficie celular polimórficas de los MHC-I en sus superficies. Estas proteínas 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 MHC-I. Los complejos de MHC que se muestran en las células normales son únicos para cada individuo y, a menudo, se los denomina marcadores de "auto" para ese individuo. Las células exógenas introducidas por trasplante muestran moléculas MHC y péptidos asociados que difieren de los del individuo huésped y, por lo tanto, se denominan "no propios". Los complejos MHC-peptídicos no propios también pueden aparecer en células aberrantes como resultado de procesos que alteran los péptidos presentados en las moléculas MHC. En particular, muchas, pero no todas, las células tumorales y células infectadas muestran péptidos que no son propios.

55 **[0028]** Los receptores inhibidores de células NK consisten en varias familias de proteínas que reconocen, se unen y se disparan para enviar "señales intracelulares negativas" al encontrar proteínas MHC-I propias en la superficie de una célula diana normal. Por lo tanto, se impide que las células NK ataquen y destruyan las células normales que muestran la constelación de MHC-I propia. El tumor y las células infectadas que muestran esta autocontención del MHC-I también son inmunes al ataque. Solo las células que muestran MHC-I no propia o sin MHC-I están sujetas a destrucción por las células NK. Sin embargo, algunos tipos de células tumorales y 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 del receptor inhibidor de células NK similares a MHC-I, y la secreción de ligandos solubles que suprimen las funciones de las células NK. El tumor y las células infectadas que implementan tales mecanismos de escape son refractarios a la lisis mediada por células NK. La eficacia de las células NK como un agente para la destrucción de las células cancerosas está por lo tanto limitada por la presencia de ligandos de MHC-I apropiados para los receptores inhibidores de las células NK. La disponibilidad de una

población de células NK humanas que no exprese receptores inhibidores de células NK expandiría de manera beneficiosa el rango de cánceres e infecciones que pueden tratarse usando agentes terapéuticos basados en anticuerpos.

5 **[0029]** NK-92 es una línea celular de tipo NK que inicialmente fue aislada de la sangre de un sujeto que sufre de un gran linfoma granular y posteriormente se propaga en cultivo celular. Se ha descrito la línea celular 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 celular clonal que, a diferencia de las células policlonales NK aisladas de la sangre, expresa estos receptores de manera consistente con respecto al tipo y la concentración de la superficie celular. De forma similar, las células NK-92 no son inmunogénicas y no provocan una respuesta de rechazo inmune cuando se administran terapéuticamente a un sujeto humano. De hecho, las células NK-92 son bien toleradas en humanos sin efectos perjudiciales conocidos en tejidos normales. Mientras que las células NK-92, a diferencia de las células NK y las células de la mayoría de las otras líneas celulares conocidas como NK, se han diseñado para expresar nuevas proteínas mediante 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), tal ingeniería ha demostrado ser difícil, como lo demuestran numerosos fallos en el diseño 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 celular NK-92 modificada para expresar CD16, tal modificación genética no se había logrado de hecho hasta la presente invención.

25 **[0030]** Esta combinación única de características hace que NK-92 sea una plataforma adecuada sobre la cual la presente invención puede ser construida. 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 activante apropiado independiente de cualquier ligando inhibidor de MHC-I que también pueda expresarse. La falta de inmunogenicidad junto con la relativa facilidad con la que las células NK-92 pueden cultivarse en cultivo significa que pueden prepararse a granel y administrarse a cualquier sujeto a medida que surja la necesidad. La estabilidad y consistencia de NK-92 lo hace adecuado para uso como material de referencia y agente terapéutico. Además, la presente descripción proporciona la capacidad de transducir NK-92 con genes para nuevas proteínas, tales como receptores Fc, junto con la capacidad de NK-92 para expresar de forma estable estas proteínas, como se explica con mayor detalle a continuación.

35 **[0031]** El uso de células NK-92 como una terapia para el cáncer está siendo evaluado actualmente con resultados prometedores en ensayos clínicos humanos. Los beneficios de las células NK-92 se explotan aún más mediante el desarrollo de variantes genéticamente modificadas de NK-92 que expresan una construcción proteica que une covalentemente un dominio de unión similar a un anticuerpo a un dominio de señalización como TCR- $\zeta$  (Genbank N° de acceso J04132; SEQ ID NO:6) (TCR- $\zeta$  (N° de acceso Genbank 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 anticuerpo está estructurado para unirse específicamente a un antígeno que se expresa mediante una célula diana, 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. Se ha demostrado, hasta la fecha, en modelos *in vitro* y en animales que la unión del dominio similar a anticuerpo de dicha construcción a su antígeno en una célula diana activa la célula NK-92 de tal forma que destruye rápida y eficientemente la célula diana a través de la conjugación directa. La utilidad de estos constructos como agentes terapéuticos está, sin embargo, 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 única variante NK-92 que se puede usar para tratar una amplia gama de cánceres e infecciones es de utilidad beneficiosa.

50 **[0032]** Una de las áreas en las que las células NK-92 pueden ser mejoradas se refiere al uso de las células NK-92 en sujetos, en que se ha demostrado que se aumenta la citotoxicidad, la concentración de receptor de superficie celular y la supervivencia de las células NK-92, así como la gama de tumor y tipos de células infectadas que son atacadas por la presencia de bajas concentraciones de la interleucina-2 de citoquina (IL-2). El costo de la IL-2 añadida exógenamente necesaria para mantener y expandir NK-92 en cultivo a escala comercial es significativo, mientras que la administración de IL-2 a sujetos humanos en cantidad suficiente para lograr los efectos deseados también es conocida por causar efectos secundarios adversos. Esta limitación se ha abordado mediante el desarrollo de las líneas celulares NK-92mi y NK-92ci secretoras de IL-2 mediante la transducción retroviral de NK-92 con el gen para IL-2 (Klingemann, 2002; Nagashima *et al.*, 1998). Los niveles de IL-2 secretados por estas líneas celulares son suficientes para optimizar la supervivencia y actividad de NK-92, pero están por debajo del nivel generalmente asociado con la aparición de efectos secundarios adversos.

60 **[0033]** Otra área en la que las células NK-92 se pueden mejorar, y el foco de la presente descripción, se refiere al hecho de que NK-92 no modificada no expresa CD16 y por lo tanto es ineficaz en matar células diana mediante el mecanismo de ADCC. Aunque las células NK-92 son ampliamente utilizadas como un sistema modelo para el estudio de la activación, acción e inhibición de células NK, la falta de expresión de CD16 impide el uso de células NK-92 para la evaluación de la eficacia de anticuerpos como agentes terapéuticos y el uso de NK-92 como un agente terapéutico que se coadministra con un anticuerpo. Esta limitación se ha abordado haciendo que las células

NK-92 expresen CD16. La utilidad adicional y los beneficios de esto serán evidentes en las siguientes descripciones.

*Modificación de células NK-92*

5 **[0034]** CD16 se encuentra más comúnmente en una forma que tiene una afinidad de unión relativamente baja para la porción Fc de las moléculas de IgG. En algunos individuos se encuentra una forma alternativa que exhibe una mayor afinidad de unión. Las formas de baja y alta afinidad de CD16 difieren solo por la sustitución de valina (alta afinidad) por fenilalanina (baja afinidad) en la posición 157 en la cadena polipeptídica. Las secuencias completas de las formas de baja y alta afinidad se pueden encontrar en la base de datos SwissProt como 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.

15 **[0035]** CD16 se introdujo en células NK-92 por medio de la 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, Stanford University, 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)}. Este vector de expresión se transfectó luego en la línea celular de empaquetado retroviral Phoenix-Amphotropic y el sobrenadante que contiene el virus resultante se usó para transducir células NK-92, aunque los métodos alternativos incluyen aquellos en los que los vectores incorporan EGFP u otras proteínas fluorescentes (amarillo, rojo, cian, etc.) y la línea celular de empaquetado retroviral Phoenix-Amphotropic se obtuvieron y están disponibles para el público de la Universidad Leland Stanford, Stanford, California, EE.UU.; (Kinsella y Nolan, 1996; Nolan y Kinsella, 1998)). Como se indica a continuación, se pueden usar otros vectores y líneas celulares de empaquetamiento, tanto las actualmente conocidas como las que pueden desarrollarse en el futuro. Las células NK-92 transducidas que expresan CD16 en su superficie (NK-92-CD16, también conocido como CD16/FcεRIγ-NK-92) se separaron de las células NK-92 no transducidas residuales utilizando un clasificador de células activado 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 proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). Las células NK-92-CD16 resultantes expresan establemente CD16 en cultivo celular sin la necesidad de selección antibiótica periódica.

Tabla 1

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 678 094 T3

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 2 678 094 T3

(continúa)

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

---

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 SEQ ID NO:2 (receptor de región Fc de variante de baja afinidad 157 F ->V inmunoglobulina gamma III-A [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	

---

# ES 2 678 094 T3

(continúa)

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

---

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	<u>Val</u>	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 de la región Fc de la inmunoglobulina gamma de baja afinidad III-A [Precursor])

---

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact	60
gaagatctcc caaaggctgt ggtgttctct gagcctcaat ggtacagggt gctcgagaag	120
gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactccctg aggacaattc cacacagtgg	180
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca	240
gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccacctcag tgacctcgtg	300
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag	360
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca	420
tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca	480
aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttttttg gagtaaaaat	540
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aacctctca	600
tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatgggtact cctttttgca	660
gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg	720
aaggaccata aatttaaagt gagaaaggac cctcaagaca aatga	765

---

*Vectores de expresión recombinante y células anfitrionas*

5 **[0036]** Los vectores son herramientas usadas para transferir ADN entre células hospedadoras o como un medio para expresar una secuencia de polinucleótidos. La inserción del ADN de interés, tal como una secuencia *CD16* o un fragmento, se lleva a cabo mediante técnicas de ligamiento y/o protocolos de apareamiento bien conocidos por los expertos en la técnica. Dicho ADN se inserta de manera tal que su integración no interrumpe 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 está operativamente unido a los elementos del vector que gobiernan su transcripción y traducción.

10 **[0037]** Los vectores se pueden dividir en dos clases generales: los vectores de clonación replican el plásmido o el fago con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula hospedadora apropiada, y en las que puede insertarse 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 con el fin de transcribir y traducir el ADN extraño. En los vectores de expresión, el ADN introducido se une operativamente a elementos, tales como promotores, que le indican a la célula huésped que transcriba el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, como los promotores inducibles que controlan la transcripción de genes en respuesta a factores específicos. La unión operativa de un polinucleótido *CD16* a un promotor inducible puede controlar la expresión de un gen o fragmentos de *CD16*. Ejemplos de promotores inducibles incluyen los que son específicos de tejido, que relegan la expresión a determinados tipos de células, sensible a esteroides (*p. ej.*, glucocorticoides (Kaufman, 1990) y tetraciclina), o de choque térmico reactivo. Algunos sistemas de represión bacteriana, tales como el operón *lac*, se han explotado 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, sin embargo, responden en esas células cuando el agente de inducción se suministra exógenamente.

30 **[0038]** Los vectores tienen muchas manifestaciones. Un "plásmido" es una molécula circular de ADN bicatenario 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 (*p. ej.*, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (*p. ej.*, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped y se replican como parte del genoma del huésped. En general, los vectores de expresión útiles son plásmidos y vectores virales (*p. ej.*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados); otros vectores de expresión también se pueden usar.

40 **[0039]** La opción de vector está dictada por los organismos o células utilizadas y el destino deseado del vector. Los vectores pueden replicarse una vez en las células diana, 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 a menudo usan un marcador seleccionable para facilitar la identificación de las células que han incorporado el vector. La Tabla F resume muchos de los marcadores disponibles.

45 **[0040]** "Célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan indistintamente. Dichos términos se refieren no solo a una célula diana particular sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término.

50 **[0041]** Los métodos de transfección de células eucarióticas y transformación de células procariotas son bien conocidos en la técnica (véanse los ejemplos en la Tabla A). La elección de la célula huésped dicta la técnica preferida para introducir el polinucleótido de interés. La introducción de polinucleótidos en un organismo también puede realizarse con técnicas *ex vivo* que utilizan un método de transfección *in vitro*, así como con técnicas genéticas establecidas, si las hay, para esos organismos particulares. Dichos procedimientos se pueden emplear de manera similar para la transducción de células NK-92 engarzadas genéticamente, incluidas NK-92-CD16- $\gamma$ , NK-92-CD16- $\zeta$ , NK-92mi y NK-92ci. Las líneas celulares NK-92, NK-92mi y NK-92ci se depositan 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- $\gamma$ , NK-92-CD16- $\zeta$  y NK-92-CD16 (F157V) están siendo enviados a la American Type Culture Collection.

60

65

Table A  
Métodos para introducir polinucleótidos en células

Células	Métodos	Referencias	Notas
5 Células de mamífero	Transfección de fosfato de calcio	Solución salina tamponada de ácido N-(2-Hidroxietilo)piperazina-N'-(2-etanosulfónico (HEPES) (Chen y Okayama, 1988;	Células pueden ser "chocadas" con glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar la eficiencia de transfección (Ausubel, 2002).
10			
15	Transfección de dietilaminoetilo (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. Cloroquina puede ser utilizada para aumentar la eficiencia
20			
25	Electroporación	(Neumann <i>et al.</i> , Potter, 1988; Potter <i>et al.</i> , Wong y Neumann, 1982)	Especialmente útil para limfocitos difíciles de transfectar
30	Transfección de reactivo lipídico catiónico	(Elroy-Stein y Moss, 1990; Felgner <i>et al.</i> , 1987; Rose <i>et al.</i> , 1991; Whitt <i>et al.</i> , 1990)	Aplicable a transfección tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>
35	Retroviral	Producción ejemplificada por (Cepko <i>et al.</i> , 1984; Miller y Buttimore, 1986; Pear <i>et al.</i> , 1993)	Proceso largo, muchas líneas de envasado disponibles en ATCC. Aplicable a transfección tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>
40	Polibreno	(Chaney <i>et al.</i> , 1986; Kawai y Nichizawa, 1984)	
45	Microinyección	(Capecchi, 1980)	Puede ser utilizada para establecer líneas celulares al llevar copias integradas de secuencias de DFF ADN
50	Fusión de protoplasto	(Rassoulzadegan <i>et al.</i> , 1982; Sandri-Golfín <i>et al.</i> , 1981; Schaffner, 1980)	

[0042] Otros vectores y líneas celulares de empaquetamiento se han utilizado en la preparación de variantes modificadas genéticamente, de células NK-92 (Klingemann, 2002; Nagashima *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999; Uherek *et al.*, 2002) y puede usarse de manera equivalente aquí. Los sistemas de transducción retrovirales diferentes a los de los Ejemplos discutidos a continuación también se han usado con éxito para transducir una variedad de genes en células NK-92. A modo de ejemplo, estos métodos alternativos incluyen, pero no se limitan al vector p-JET junto con células de empaquetamiento FLYA 13 (Gerstmayer *et al.*, 1999), el sistema de transducción retroviral *kat* basado en plásmido y DFG-hIL-2-neo/CRIP (Nagashima *et al.*, 1998). También se practica la introducción de electroporación y "pistola de genes" del vector en las células de empaquetamiento. El uso del vector pBMN-IRES-EGFP en combinación con la línea celular de empaquetamiento Phoenix-Amphotropic es conveniente para el propósito de este y los siguientes Ejemplos en que proporciona altas eficiencias de transfección celular Phoenix-Amphotropic; el uso de promotores LTR de Moloney da como resultado un alto nivel de expresión de CD16; el virus se produce a altos títulos; la eficacia 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 alojar el ADNc de CD16 o inserciones alternativas. El vector pBMN-IRES-EGFP incorpora además genes para la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), que se puede usar como un marcador sustituto endógeno para la expresión génica. La línea celular 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 forma 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 los sistemas retrovirales alternativos pueden usarse para introducir los ADNc en NK-92.

**[0043]** Una "secuencia de polinucleótido homólogo " o "secuencia de aminoácidos homóloga", o variaciones de los mismos, se refieren a secuencias caracterizadas por una homología a nivel polinucleótido o nivel de aminoácido. Las secuencias de polinucleótidos homólogos codifican aquellas secuencias que codifican isoformas de CD16. Diferentes genes pueden codificar isoformas tales como secuencias de polinucleótidos CD16 homólogas de especies distintas de ratones, incluyendo otros vertebrados, tales como humanos, rana, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo y otros organismos. Las secuencias de polinucleótidos homólogas también incluyen variaciones alélicas y mutaciones de ocurrencia natural de las SEQ ID NOS: 1 o 2. Las secuencias de polinucleótidos homólogas pueden codificar sustituciones de aminoácidos conservativas en SEQ ID NOS: 1 o 2.

**[0044]** La composición de la invención puede incluir células que utilizan moléculas de polinucleótidos 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 codificar el mismo CD 16 que el codificado por la secuencia de polinucleótido mostrado en SEQ ID NOS: 3. Cualquier molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NOS: 1 O 2 es útil para modificar las células NK-92.

**[0045]** Además de la secuencia de polinucleótido CD16 mostrada en la SEQ ID NO:3, los polimorfismos de secuencia de ADN que cambia las secuencias de aminoácidos de CD16 también puede ser útil para modificar células NK-92. Por ejemplo, las variaciones alélicas entre individuos exhiben polimorfismos genéticos en genes CD16.

**[0046]** Por otra parte, los genes CD16 de otras especies que tienen una secuencia de polinucleótido que difiere de la secuencia de SEQ ID NO:3 se contemplan para ser útiles en las composiciones de la invención y métodos de la descripción.

**[0047]** "Variante de polinucleótido CD16" o "secuencia de polinucleótidos de variante CD16" significa una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido CD16 que (1) tiene al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia de polinucleótido con una secuencia de ácido polinucleótido que codifica una CD16 nativa de longitud completa, (2) una CD16 nativa de longitud completa que carece del péptido señal, (3) un dominio extracelular de una CD16, con o sin el péptido señal, o (4) cualquier otro fragmento de una CD16 de longitud completa. Normalmente, un polinucleótido de variante CD16 tendrá al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia de polinucleótido, más preferiblemente al menos aproximadamente 71% - 99% de identidad de secuencia de polinucleótido y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% e incluso más preferiblemente, identidad de secuencia de polinucleótidos del 99% con la secuencia de polinucleótidos que codifica una CD16 nativa de longitud completa. Un polinucleótido de variante CD16 puede codificar CD16 nativa de longitud completa que carece del péptido señal, un dominio extracelular de CD16, con o sin la secuencia señal, o cualquier otro fragmento de una CD16 de longitud completa.

**[0048]** Normalmente, las variantes de CD16 son 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.

**[0049]** "Porcentaje (%) de polinucleótido de identidad de secuencia" con respecto a secuencias de polinucleótidos de codificación de CD16 se define como el porcentaje de polinucleótidos en la secuencia de polinucleótidos CD 16 de interés que son idénticos a los polinucleótidos en una secuencia candidata, después de alinear las secuencias e introduciendo huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación se puede lograr de varias maneras bien conocidas en la técnica; por ejemplo, usando software disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

**[0050]** Cuando las secuencias de polinucleótidos están alineadas, el % de identidad de secuencia de polinucleótido de una secuencia de polinucleótidos dada C respecto a, con o contra una secuencia D de polinucleótidos dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia C de polinucleótido dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de polinucleótido para, con, o contra una secuencia D de polinucleótido dada) puede calcularse como:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de polinucleótido} = W/Z \cdot 100$$

dónde

W es el número de polinucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el alineamiento de algoritmos o el programa de alineación de secuencias de C y D

y

Z es el número total de polinucleótidos en D.

5 **[0051]** Cuando la longitud de la secuencia de polinucleótido C no es igual a la longitud de la secuencia de polinucleótido D, la identidad de secuencia% polinucleótido de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de polinucleótidos de D a C.

10 **[0052]** Los homólogos o otros relacionados las secuencias (por ejemplo, parálogos) pueden obtenerse mediante hibridación de astringencia baja, moderada o alta con toda o una porción de la secuencia particular usada como sonda usando procedimientos de hibridación y clonación de polinucleótidos bien conocidos en la técnica.

15 **[0053]** Además de origen natural las variantes alélicas de los polinucleótidos CD16, pueden introducirse cambios por mutación en SEQ ID NO:3 que incurrir en alteraciones en la secuencia de aminoácidos de CD16, pero no altera 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" pueden realizarse en las SEQ ID NOs: 1 o 2. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de la naturaleza tipo de secuencia de CD16 sin alterar la función de CD16 en los métodos de la divulgación y las 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 CD16 de la divulgación son particularmente no susceptibles de alteración (Tabla 9).

25 **[0054]** Las sustituciones conservativas útiles se muestran en la Tabla B, "sustituciones preferidas". Las sustituciones conservativas en las que un aminoácido de una clase se reemplaza por 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 descripción y composiciones 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 los productos se criban para determinar la actividad de CD16 para los métodos de la divulgación y las composiciones de la invención.

Tabla B		
Sustituciones preferidas		
Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn(n)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lis, 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

60 **[0055]** Sustituciones no conservativas que afectan (1) la estructura del esqueleto del polipéptido, tal como una  $\beta$ -hoja o conformación  $\alpha$ -helicoidal, (2) la carga o (3) hidrofobicidad o (4) la mayor parte de la cadena lateral del sitio diana puede modificar la función del polipéptido CD16 o la identidad inmunológica. Los residuos se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral como se indica en la Tabla A. Las sustituciones no conservativas implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones se pueden introducir en sitios de sustitución conservadores o más preferiblemente en sitios no conservados.

Tabla C	
Clases de aminoácidos	
Clase	Aminoácidos
hidrofóbico	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
neutro hidrófilo	Cys, Ser, Thr
ácido	Asp, Glu
básico	Asn, Gin, Su, Lys, Arg
alterar conformación de cadena	Gly, Pro
aromático	Trp, Tyr, Phe

**[0056]** Los polipéptidos variantes se pueden hacer usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida por sitio), barrido de alanina, y mutagénesis PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), la mutagénesis en cassette, la 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*

**[0057]** "Variante de polipéptido CD16" significa un polipéptido CD16 que tiene al menos: (1) aproximadamente 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 una 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 eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Una variante polipeptídica CD16 tendrá al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 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 más preferiblemente al menos aproximadamente 99% de secuencia de aminoácidos identidad con una secuencia CD16 de secuencia nativa de longitud completa. Habitualmente, los polipéptidos variantes de CD16 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 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.

**[0058]** 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 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 alcanzar el % de identidad de secuencia máxima; las sustituciones conservativas 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. El software de ordenador disponible públicamente como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) puede usarse para alinear secuencias de polipéptidos. Los expertos en la técnica determinarán los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

**[0059]** Cuando las secuencias de aminoácidos se alinean, el % de identidad de secuencia aminoacídica de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos, con, o en contra de una secuencia de aminoácidos dada B) puede calcularse como:

$$\% \text{ de identidad de secuencia de aminoácido} = X/Y \times 100$$

dónde

X es el número de residuos de aminoácidos anotados como coincidencias idénticas por el alineamiento de secuencias del programa de alineación o algoritmo de A y B

y

Y es el número total de residuos de aminoácidos en B.

**[0060]** Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácido de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácido de B a A.

**[0061]** Una CD16 de "polipéptido de fusión" o "polipéptido quimérico" comprende CD16 fusionada a un polipéptido

no CD 16. Un polipéptido no CD16 no es sustancialmente homólogo a CD16 (SEQ ID NOs: 1 o 2). Un polipéptido de fusión CD16 puede incluir cualquier porción de una CD16 completa, que incluye cualquier número de porciones biológicamente activas.

5 **[0062]** Los polipéptidos de fusión pueden crearse fácilmente usando métodos recombinantes. Un polinucleótido que codifica CD16 (por ejemplo, SEQ ID NO:3) se puede fusionar en el marco con un polinucleótido que no codifica CD16, con el extremo N o C de CD16, o internamente. Los genes de fusión también se pueden sintetizar mediante técnicas convencionales, que incluyen sintetizadores de ADN automatizados y amplificación por PCR usando cebadores de anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que  
10 posteriormente pueden reasociarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (Ausubel, 2002). Muchos vectores están disponibles comercialmente que facilitan la subclonación de CD16 en marco a un resto de fusión.

#### Medición de la citotoxicidad

15 **[0063]** Algunos ejemplos de medición de citotoxicidad se presentan en la presente memoria a continuación, pero cualquier ensayo de citotoxicidad se puede utilizar.

20 **[0064]** Las células NK-92-CD16 se pueden usar en ensayos de ADCC como una población pura de células "efectoras" que tienen una definición y coherencia consistentes. En algunos casos, puede ser deseable seleccionar y usar células que exhiban niveles intermedios de expresión de CD16. En particular, tales células intermedias pueden ser útiles para generar curvas de dosis-respuesta y como calibradores de tipo "escalera" para la actividad de CD16. Las células NK-92 transducidas con las formas de alta y baja afinidad de CD16 también podrían usarse para estos fines.

25 **[0065]** Tales ensayos *in vitro* se emplean comúnmente para fines tales como la determinación de la eficacia de los anticuerpos que se están desarrollando como agentes terapéuticos potenciales. Los ensayos de ADCC se realizan típicamente cargando células diana con un material indicador tal como [<sup>51</sup>Cr] o un quelato de Europio; tratar las células diana cargadas con el indicador con el anticuerpo a evaluar; y exponer estas células a células efectoras NK-92-CD16. La lisis de las células diana se indica mediante la liberación del material indicador en el sobrenadante de ensayo donde su concentración se puede medir por un método adecuado, tal como el recuento de centelleo (<sup>51</sup>Cr) o intensidad de la fluorescencia o la determinación de por vida (quelato de europio). La eficacia también se puede evaluar mediante la medición de indicadores indirectos tales como la liberación de citoquinas por las células NK-92-CD16; la regulación positiva 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 diana. Las células NK-92 parentales deficientes en CD16 sirven como un control único y valioso en tales ensayos, ya que permiten diferenciar entre la citotoxicidad mediada por ADCC y otros efectos citolíticos que las células NK-92 ejercen sobre las células diana. Las células diana preferidas en los ensayos de ADCC son aquellas que expresan un antígeno que es apropiado para el anticuerpo que se está evaluando y que tiene una baja susceptibilidad a la lisis por la línea celular parental NK-92. Si tal línea de célula diana no es convenientemente disponible, otras líneas celulares adecuadas, tales como la línea de carcinoma ovaria SKOV-3 (*p. ej.*, depósito ATCC HTB-77) (Tam *et al.*, 1999), a veces pueden ser utilizadas como un sustituto viable, particularmente si está transducido/transfectado de modo que exprese el antígeno específico requerido. Entre las líneas celulares que se ha demostrado que son adecuadas para su uso en ensayos de citotoxicidad mediada por ADCC están U373MG y T98G (por ejemplo, Depósito ATCC CRL-1690) (Komatsu y Kajiwara, 1998); AML-193 (mieloide, por ejemplo, depósito ATCC CRL-9589) y SR-91 (progenitor linfoide) (Gong *et al.*, 1994); y ALL1 y REH (leucemia linfocítica aguda de células B) (Reid *et al.*, 2002). Otros tipos de células diana, tales como la línea murina FcγRII/III<sup>+</sup> de células de mastocitoma P815 (por ejemplo, depósito ATCC N° TIB-64.); y la línea FcγRII/III<sup>+</sup> de leucemia mielocítica THP-1 (*p. ej.*, depósito ATCC N° TIB-202) que han limitado (de entre 5 y 30%) la susceptibilidad a la lisis por las células no modificadas NK-92 se usan preferiblemente donde se debe determinar la citotoxicidad redirigida o ADCC para asegurar un rango dinámico de ensayo suficiente para la detección de efectos significativos a través de CD16. Otros tipos de células con potencial citolítico limitado que expresan o están diseñados para expresar marcadores de superficie celular específicos de interés también se pueden emplear como dianas. Además, la capacidad citolítica de referencia de NK-92 puede reducirse disminuyendo la concentración de IL-2 en los cultivos y/o ensayando cuatro días después de pasar las células a medio fresco que contienen IL-2, la funcionalidad de CD 16 introducido en células NK-92-CD16, NK-92-CD16 y o NK-92-CD16-ζ puede determinarse utilizando el ensayo de citotoxicidad del Ejemplo 4, ya sea en el formato de ADCC o de "citotoxicidad redirigida". Los anticuerpos monoclonales que se unen a CD16 pueden usarse para evaluar la función del receptor en células NK-92 en un ensayo de citotoxicidad redirigido, en el que la porción F(ab) del anticuerpo se une al receptor en la célula NK y la porción Fc se une a receptores Fc en células diana apropiadas (FcγRII/III en células diana P815 o THP-1). Otra forma de citotoxicidad redirigida se puede analizar usando un anticuerpo bi-específico quimérico, tal como 2B1 (Clark *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1995a; Weiner *et al.*, 1995b), que expresa dos regiones F(ab), uno que se une a CD16 en la célula NK-92 y otro que se une al antígeno HeR2/neu en una línea celular diana apropiada, como SKOV-3. Además, los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los antígenos que se expresan de forma única en las células diana pueden someter a prueba directamente la ADCC. En este formato, la porción F(ab) del anticuerpo se une al ligando correspondiente en la célula diana, mientras que el receptor CD16 en las células NK-

92-CD16 se une a la porción Fc del anticuerpo. El entrecruzamiento resultante entre el antígeno en la célula diana y el receptor CD16 da como resultado la lisis de la célula diana a través de la ruta ADCC.

5 **[0066]** Para algunos propósitos, en particular relacionados con la evaluación de anticuerpos bi- o poli-funcionales o en el estudio de los mecanismos de activación y otras características de las células NK-92, que puede ser útil para reestructurar el ensayo de ADCC previamente descrito como un ensayo de "citotoxicidad redirigida". Por ejemplo, un anticuerpo bifuncional que tiene un dominio que específicamente se une a un antígeno de interés en las células diana y se puede evaluar un segundo dominio que se une específicamente a CD16 en células NK-92-CD16 de la manera descrita anteriormente. En este caso, el anticuerpo bifuncional reticula el antígeno en la célula diana con CD16 en la célula NK-92-CD16 y desencadena una respuesta ADCC. El mismo ensayo para fines de investigación puede, por ejemplo, tratar una célula diana que expresa CD16 u otro receptor de Fc con un anticuerpo tal como anti-CD 16 que se dirige contra este receptor. La exposición de las células diana marcadas con anti-CD16 a las células NK-92-CD16 da como resultado la reticulación de los receptores en ambas células con el consiguiente desencadenamiento de ADCC. La diferenciación entre la ADCC y los formatos de citotoxicidad redirigida se basa en si el receptor CD16 de la célula efectora se une a la porción Fc de un anticuerpo (ADCC) o este mismo receptor está unido a la porción F(ab) de un anticuerpo anti CD 16 (citotoxicidad redirigida). Ya que ambas disposiciones de unión pueden desencadenar respuestas de citotoxicidad similares en la célula diana, la elección entre la ADCC y los formatos redirigidos es en gran medida una cuestión de conveniencia.

20 **[0067]** En algunos casos, puede ser ventajoso bloquear los receptores activantes conocidos en las células NK-92; tales métodos y agentes son bien conocidos; véase por ejemplo (Pende *et al.*, 1999; Pessino *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 1998). Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos de enmascaramiento (Pessino *et al.*, 1998).

25 **[0068]** En presencia de un anticuerpo apropiado, células NK-92-CD16 pueden efectivamente y eficientemente lisar células diana. CD16 en células NK está asociada no covalentemente en la membrana de plasma con homodímeros o heterodímeros de la FcεRI-γ (nº de acceso GenBank M33195; SEQ ID NO: 4 (polinucleótido) y SEQ ID NO:5 (polipéptido)) o TCR-ζ (Genbank, Nº de registro de acceso J04132; SEQ ID NO: 6 (polinucleótido); proteínas de señalización accesorias SEQ ID NO: 7 (polipéptido)); estas secuencias se presentan en las Tablas 4-7. La discusión con respecto a la identidad de secuencia se aplica también a SEQ ID NOs: 4-7; así, aquellos polinucleótidos o polipéptidos de SEQ ID NO: 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 divulgados y la composición de la invención. Cuando se estimulan mediante 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, son compatibles con la expresión de superficie de CD16. La actividad de señalización iniciada a través de ζ y γ sirve para activar las respuestas de ADCC. FcεRI-γ y/o TCR-ζ se pueden co-introducir convenientemente en células NK-92 mediante transducción secuencial con CD16 y FcεRI-γ y/o ADNc TCR-ζ de la manera descrita anteriormente. En este proceso, generalmente es deseable eliminar el gen EGFP del vector que contiene el ADNc de CD16. El proceso de transducción secuencial consiste en transducir las células parentales NK-92 con el vector CD16; inmunotinción de las células transducidas con un anticuerpo anti-CD16 marcado fluorescentemente; clasificando las células para la expresión de CD 16; transducir las células NK-92-CD16 con un vector que contiene ADNc tanto para la proteína accesoria como para EGFP; y clasificando las células doblemente transducidas sobre la base de la expresión de EGFP. Las células resultantes doblemente transducidas NK-92 (NK-92-CD 16/γ o NK-92-CD 16/ζ, respectivamente) usualmente exhiben niveles más altos de expresión de CD16 en la superficie y actividades mejoradas de citotoxicidad y liberación de citocinas que las células NK-92-CD16.

Tabla 4  
Secuencia de polinucleótidos de FcεRI-γ (SEQ ID NO: 4)

50	cagaacgggc gatctccagc ccaagatgat tccagcagtg gtcttgcctct tactcctttt	60
	ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc tatacctgg atgccatcct	120
55	gtttctgtat ggaattgtcc tcaccctcct ctactgtcga ctgaagatcc aagtgcgaaa	180
	ggcagctata accagctatg agaaatcaga tgggtgttac acgggcctga gcaccaggaa	240
	ccaggagact tacgagactc tgaagcatga gaaaccacca cagtagcttt agaatagatg	300
60	cggtcataatt cttcttttggc ttctggttct tccagccctc atggttgga tcacatatgc	360
	ctgcatgcca ttaacaccag ctggccctac cctataatg atcctgtgtc ctaaattaat	420
	atacaccagt ggttctcctc cctgtttaa gactaatgct cagatgctyt ttacggatat	480
65	ttatattota gtctcactct cttgtccac ccttctctc tccccatc ccaactccag	540
	ctaaaatatg ggaagggaga accccaata aaactgcat ggactggact c	591

# ES 2 678 094 T3

Tabla 5  
Secuencia polipeptídica FcεRI-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	Leu
			20					25					30		
Phe	Leu	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Leu	Tyr	Cys	Arg	Leu	Lys	Ile
		35					40					45			
Gln	Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Ile	Thr	Ser	Tyr	Glu	Lys	Ser	Asp	Gly	Val
	50					55					60				
Tyr	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Lys
65					70					75					80
His	Glu	Lys	Pro	Pro	Gln										
					85										

---

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

ES 2 678 094 T3

cttttctcct aaccgtcccg gccaccgctg cctcagcctc tgcctcccag cctctttctg 60  
 agggaaagga caagatgaag tgggaaggcg ttttcaccgc ggccatcctg caggcacagt 120  
 tgcgattac agaggcacag agctttggcc tgcctggatcc caaactctgc tacctgctgg 180  
 atggaatcct cttcatctat ggtgtcattc tcactgcctt gttcctgaga gtgaagttca 240  
 gcaggagcgc agagcccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca 300  
 atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga 360  
 tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaaag 420  
 ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg 480  
 ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacaacctac gacgccttc 540  
 acatgcaggc cctgccccct cgctaacagc caggggattt caccactcaa aggccagacc 600  
 tgcagacgcc cagattatga gacacaggat gaagcattta caaccogggt cactcttctc 660  
 agccactgaa gtattcccc ttatgtacag gatgctttgg ttatatttag ctccaaacct 720  
 tcacacacag actgtttgct ctgcactctt taagggagtg tactcccagg gcttacggcc 780  
 ctgccttggg cctctggtt tgcgggtggt gcaggtagac ctgtctcctg gcggttcctc 840  
 gttctccctg ggaggcgggc gcactgcctc tcacagctga gttgttgagt ctgttttgta 900  
 aagtccccag agaaagcgca gatgctagca catgcocbaa tgtctgtatc actctgtgtc 960  
 tgagtggctt cactcctgct gtaaatttgg ctctctgtgt caccttcacc tcctttcaag 1020  
 gtaactgtac tgggccatgt tgtgcctccc tggtagagagg gccgggcaga ggggcagatg 1080  
 gaaaggagcc taggccaggt gcaaccaggg agctgcaggg gcatgggaag gtgggcgggc 1140  
 aggggagggc cagccagggc ctgcgagggc agcgggagcc tccctgctc aggcctctgt 1200  
 gccgcaccat tgaactgtac catgtgctac aggggdcaga agatgaacag actgaccttg 1260  
 atgagctgtg cacaaagtgg cataaaaaac agtgtggtta cacagtgtga ataaagtgct 1320  
 gcggagcaag aggaggccgt tgattcactt cacgctttca gcgaatgaca aaatcatctt 1380  
 tgtgaaggcc tcgcaggaag acgcaacaca tgggacctat aactycccag cggacagtgg 1440  
 caggacagga aaaaccgctc aatgtactag gg 1472

Tabla 7  
Secuencia polipeptídica TCR-ζ (SEQ ID NO:7)

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

50 [0069] Las células NK-92 se usan ampliamente como un sistema modelo para el estudio de la activación, acción e inhibición de células NK, ya que expresan establemente un conjunto definido de receptores activadores de células NK conocidas, incluidas NKp46, NKp44, 2B4 y NKG2D, pero sin CD16, activando KIR y NKG2C. Más importante aún, también carecen de casi todos los receptores inhibidores de células NK conocidas, excepto los niveles bajos de NKG2A/CD94 e ILT2/LIR1. Esto es una gran ventaja de la presente invención ya que las moléculas 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 a las células NK-92, aumentando así el rango de ligandos activadores a los que responden estas células. Tanto los receptores activadores como cualquier receptor inhibidor residual pueden bloquearse selectivamente mediante el tratamiento de las células efectoras con los anticuerpos monoclonales apropiados o los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> correspondientes, tales como 3.43.13 (anti-NKp44), 9E2 (anti-NKp46), 158 (anti-2B4) y 3G8 (anti-CD16). La capacidad de bloquear selectivamente receptores individuales o grupos de receptores junto con células diana que difieren en susceptibilidad a la lisis por células NK-92 (y sus derivados) facilita el estudio de los muchos mecanismos implicados en la activación e inhibición de células NK.

65 *Anticuerpos (Abs)*

**[0070]** La invención hace uso de Abs y fragmentos de anticuerpos, tales como  $F_{ab}$  o  $(F_{ab})_2$ , que se unen inmuno-específicamente a sus epítopos.

5 **[0071]** "Anticuerpo" (Ab) comprende solo Abs dirigido contra un epítipo, las composiciones de anti-Ab con especificidad poli-epítipo, de cadena sencilla anti-Abs, y fragmentos de Abs. Se obtiene un "anticuerpo monoclonal" a partir de una población de Abs substancialmente homogénea, es decir, los Abs individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los ejemplos de Abs incluyen anticuerpos policlonales (pAb), monoclonales (mAb), humanizados, biespecíficos (bsAb), quiméricos y heteroconjugados. Los anticuerpos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica o se pueden obtener comercialmente.

#### *Abs monovalente*

15 **[0072]** El Abs puede ser Abs monovalente que por consiguiente, no se reticulan entre sí. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina (Ig) y cadenas pesadas modificadas. Los truncamientos de cadena pesada generalmente en cualquier punto de la región Fc evitarán la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen con otro resto de aminoácido o se eliminan, evitando la reticulación. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar Abs monovalente. Los ABS pueden digerirse para producir fragmentos, tales como fragmentos  $F_{ab}$  (Harlow y Lane, 1988, Harlow y Lane, 1999).

#### *Abs humanizado y humano*

25 **[0073]** Los Abs pueden comprender además Abs humano o humanizado. Las formas humanizadas de Abs no humanos son Igs quiméricos, cadenas de Ig o fragmentos (tales como  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  u otras subsecuencias de Abs de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de Ig no humano.

30 **[0074]** Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se lleva a cabo sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeyen *et al.*, 1988). Dichos Abs "humanizados" son Abs quiméricos (1989), en los que substancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los Abs humanizados son típicamente Abs humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en Abs de roedores. Los Abs humanizados incluyen Igs humano (anticuerpo receptor) en el 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) tales como ratón, rata o conejo, teniendo la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunos casos, los restos no humanos correspondientes reemplazan los restos de marco  $F_v$  de la Ig humana. Los Abs humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprende substancialmente todos al menos uno, y típicamente 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 las de una secuencia consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprende por lo 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).

50 **[0075]** Abs humano también se puede producir utilizando varias técnicas, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991; Marcas *et al.*, 1991) y la preparación de mAbs humanos (Boerner *et al.*, 1991; Reisfeld y Sell, 1985). De manera similar, la introducción de genes de Ig humana en animales transgénicos en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado parcial o completamente se puede explotar para sintetizar Abs humanos. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo \*\* reordenamiento génico, 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, Marks *et al.*, 1992, 1997, 1997, 1997).

#### *MAB bi-específicos*

60 **[0076]** Los Abs biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes.

65 **[0077]** Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena/cadena ligera de Ig pesada, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, 1983). Debido a la variedad aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de Ig, los híbridos (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 puede purificarse usando cromatografía de

afinidad u otras técnicas (Traunecker *et al.*, 1991, 1993).

**[0078]** Para la fabricación de un anticuerpo bi-específico (Suresh *et al.*, 1986), los dominios variables con los sitios de combinación de anticuerpo-antígeno deseados se fusionan a secuencias del 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 de bisagra, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a 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 hospedador adecuado.

**[0079]** La interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes (1996). La interfaz preferida comprende al menos parte de la región CH<sub>3</sub> de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). "Cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena lateral grande se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (*p. ej.*, alanina o treonina). Este mecanismo aumenta el rendimiento del heterodímero sobre productos finales no deseados tales como homodímeros.

**[0080]** Abs bi-específico se puede preparar como Abs de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.* Abs bi-específico F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>). Una técnica para generar Abs bi-específico explota el enlace químico. Los Abs intactos se pueden escindir proteolíticamente para generar fragmentos F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> (Brennan *et al.*, 1985). Los fragmentos se reducen con un agente complejante de ditiol, como arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos F<sub>ab'</sub> generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados F<sub>ab'</sub>-TNB se reconvierte a continuación el F<sub>ab'</sub>-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado F<sub>ab'</sub>-TNB para formar el anticuerpo bi-específico. Los Abs bi-específicos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

**[0081]** Fragmentos F<sub>ab'</sub> se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir Abs bi-específicos completamente humanizados F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> (Shalaby *et al.*, 1992). Cada fragmento F<sub>ab'</sub> se secreta por separado de *E. coli* y se acopla directamente químicamente *in vitro*, formando el anticuerpo biespecífico.

**[0082]** También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los motivos de cremallera de leucina pueden explotarse (Kostelny *et al.*, 1992). Los péptidos de las proteínas *Fos* y *Jun* se unen a las porciones F<sub>ab'</sub> de dos Abs diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se reducen en la región bisagra para formar monómeros y luego se vuelven a oxidar para formar heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede producir homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" (Holliger *et al.*, 1993) proporciona un método alternativo para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos bi-específicos es el uso de dímeros de una sola cadena de F<sub>v</sub> (sF<sub>v</sub>) (Gruber *et al.*, 1994). También se contemplan los Abs con más de dos valencias, como Abs tri-específicos (Tutt *et al.*, 1991).

#### *Abs heteroconjugados*

**[0083]** Los Abs heteroconjugados, que consisten en dos Abs unidos covalentemente, se han propuesto 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 abs preparados *in vitro* utilizando métodos de química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados incluyen iminotiolato y metilo-4-mercaptobutirimidato (1987).

#### *Composiciones farmacéuticas para Abs*

**[0084]** Los Abs se pueden administrar en composiciones farmacéuticas. Los principios y consideraciones involucradas en la preparación de tales composiciones, así como la orientación en la elección de los componentes se pueden encontrar en (de Boer, 1994, Gennaro, 2000, Lee, 1990).

**[0085]** Los liposomas también se pueden utilizar como un vehículo de administración para la introducción intracelular. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al epítipo. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que se unen a un epítipo

preferido basado en las secuencias de la región variable de un anticuerpo útil. Tales 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 aquellas con actividades que no se afectan adversamente entre sí. La composición puede comprender un agente que mejora la función, tal como un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. La composición también puede contener células, como células NK-92.

**[0086]** Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial; por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de 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.

**[0087]** Las formulaciones a utilizar para administración *in vivo* son muy preferidas para ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles o cualquiera de una serie de técnicas.

**[0088]** Preparaciones de liberación sostenida también se pueden preparar, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que 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-hidroxietilo-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactid.es (Boswell y Scribner, 1973), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etilo-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como microesferas inyectables compuestas de ácido láctico-copolímero de ácido glicólico y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitubúrico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de etileno-vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos y pueden ser preferidos.

**[0089]** De manera similar, el uso de anticuerpos múltiples o fragmentos  $F(ab')_2$  para bloquear específicamente los receptores de activación seleccionados, permite el refinamiento de la identificación de los receptores que están implicados en cualquier caso particular. A este respecto, la presencia de lisis mediada por células NK de un objetivo para el que están bloqueados todos los receptores activadores conocidos sugiere la presencia de receptores o ligandos activadores previamente desconocidos. El experimento inverso de observar la actividad citolítica de células NK-92 nativas y transducidas contra células diana que se han modificado para expresar supuestos ligandos para estos receptores puede proporcionar información adicional y confirmación posible. La respuesta de las citocinas de las células efectoras en estos experimentos también puede proporcionar información adicional. Por lo tanto, la divulgación ofrece una miríada de opciones para refinar las condiciones del ensayo para adaptarse a las necesidades del usuario, así como proporcionar una herramienta valiosa para las investigaciones de los mecanismos fisiológicos básicos de la función de las células NK.

**[0090]** Además, el uso de anticuerpos para el tratamiento terapéutico de la enfermedad es un campo en rápido crecimiento y evolución. Aunque los mecanismos implicados en los efectos terapéuticos de los tratamientos con anticuerpos todavía no se han dilucidado, existen pruebas de que estos efectos están mediados por la interacción ad-hoc de la porción Fc del anticuerpo administrado con los receptores Fc correspondientes en células efectoras citolíticas tales como neutrófilos, fagocitos mononucleares, células transformadas, células T y células NK. La actividad citolítica de las células efectoras se dirige de ese modo contra las células diana que presentan antígenos de superficie que están unidos por el anticuerpo. Este mecanismo propuesto no pretende limitar la invención de ninguna manera.

**[0091]** El principal empuje actual de este campo implica el uso de anticuerpos monoclonales humanizados de longitud completa (que contienen por tanto los dominios Fc) que están dirigidos hacia antígenos de superficie celular en las células tumorales, por ejemplo, beneficios clínicos sustanciales se han demostrado 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 células nativas NK y las células NK-92- $CD16$  y células NK-92- $CD16\gamma/\zeta$  de esta invención se unen a las porciones Fc de Herceptina o anticuerpos Rituximab que, en su vez, se unen a través de sus porciones  $F(ab)$  al correspondiente antígeno de superficie celular en una célula cancerosa. Esta ligadura del antígeno de células cancerígenas a  $CD 16$  activa la célula efectora y dirige su actividad citolítica contra la célula cancerosa, lo que da como resultado su destrucción.

**[0092]** Otro aspecto de desarrollo en esta área es dirigido hacia la creación de anticuerpos quiméricos que incorporan dos o más dominios  $F(ab)$  que tienen diferentes especificidades de unión al antígeno. 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 manera única o característica en el tumor diana o células infectadas y un segundo dominio  $F(ab)$  que activa específicamente la activación de receptores tales como  $CD 16$  en NK u otras células efectoras. Tales anticuerpos quiméricos se ejemplifican por 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 ovarios ErbB2<sup>+</sup> SKOV-3 son solo ligeramente susceptibles a la citolisis

por células NK o células NK-92-CD16. Sin embargo, las células SKOV-3 se vuelven altamente susceptibles a la citólisis mediada por células NK-92-CD16 en presencia de anticuerpo 2B1 que liga el antígeno ErbB2 en una célula SKOV-3 al receptor activador de CD16 en una célula NK-92-CD16. (Figura 5).

5 **[0093]** Groner y Moritz (Groner y Moritz, 1997) describen otro medio de la utilización de anticuerpos para dirigir la actividad de una célula efectora contra una diana específica. En este enfoque, la célula efectora se modifica genéticamente para expresar una única cadena polipeptídica que consiste en un dominio de unión a F(ab) monovalente específico de antígeno que está unido covalentemente a un dominio de señalización, tal como TCR-ζ (Genbank N° de acceso J04132; SEQ ID NO:6).

10 **[0094]** Como se ilustra en mayor detalle a continuación en el Ejemplo 6, ADCC y ensayos de citotoxicidad redirigidos se pueden utilizar 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 diana y las características del anticuerpo o constructo de anticuerpo a evaluar determinan en gran medida si el ADCC o el formato del ensayo de citotoxicidad redirigido es más apropiado. Una célula diana que expresa el ligando de interés, pero que no expresa ningún receptor de Fc, es apropiada para la evaluación de anticuerpos en el formato ADCC. Este mismo tipo de célula diana también es adecuado para la evaluación ADCC de constructos de anticuerpos que incluyen un dominio Fc. Por el contrario, una construcción de anticuerpo que incorpora dominios de unión a F(ab) que son específicos para el antígeno de interés y para CD16 se evalúan más apropiadamente mediante citotoxicidad redirigida usando células diana que expresan el antígeno de interés, pero que no expresan CD16. Otras disposiciones de este tipo son también posibles y pueden usarse en la práctica de la presente invención. Con el fin de asegurar el rango dinámico máximo del ensayo, es deseable seleccionar la célula diana entre aquellas que son mínimamente susceptibles a la lisis por la línea celular parental NK-92. Por esta razón, la célula diana se selecciona típicamente para exhibir 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 celulares diana tales como SKOV-3 son útiles porque exhiben una susceptibilidad mínima (5% -30%) a la lisis por células NK-92 y expresan constitutivamente ciertos antígenos de superficie celular que son de particular interés como dianas para anticuerpos terapéuticos. Estas células también se pueden transducir o transfectar para expresar otros antígenos de interés y utilidad.

30 **[0095]** Una aplicación importante de la presente descripción es en el cribado de los sobrenadantes de hibridoma para la presencia de anticuerpos monoclonales de ADCC inductores. Las fusiones de células del 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 típicamente produce un anticuerpo único que tiene al menos cierta afinidad por el antígeno diana. Las células en esta mezcla heterogénea original se subclonan, típicamente mediante dilución limitante, hasta el punto en que cada subclona se origina en una única célula parental. A continuación, cada subclon se criba típicamente para eliminar aquellos que no secretan inmunoglobulinas. Los subclones restantes, que pueden ser de decenas a cientos, cada uno secreta un anticuerpo único, algunos de los cuales pueden tener especificidades, afinidades y otras características que los hacen adecuados para su posterior evaluación y desarrollo como posibles agentes terapéuticos. La ADCC y los ensayos de citotoxicidad redirigidos del Ejemplo 6 encuentran utilidad en el cribado de clones para identificar aquellos subclones que secretan anticuerpos potencialmente útiles de los isotipos IgG. Estos mismos ensayos pueden usarse posteriormente para respaldar la evaluación, caracterización y desarrollo adicional de estos anticuerpos.

45 **[0096]** La presente invención utiliza constructos de células NK-92 que han sido manipuladas para expresar de forma estable la forma de afinidad totalmente activa, alta o baja del receptor FcγRIII (CD16). 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 celulares conocidas de tipo NK. Las líneas celulares transducidas NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ y NK-92-CD16-ζ 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 respuesta funcional en citotoxicidad y ensayos de citoquinas que son superiores a las células NK primarias y a la mayoría de las otras líneas celulares similares a NK humanas disponibles y parecen tolerarse de forma segura en sujetos humanos. Por estas razones, las construcciones de la presente invención, 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 diana deseada, proporciona un nivel sustancialmente más alto de actividad citolítica y especificidad hacia el tipo de célula diana que la proporcionada por las células parentales NK-92 o el anticuerpo solo cuando se usa de la misma manera. Además, a diferencia de las células NK nativas, las construcciones NK-92 de esta invención expresan receptores inhibidores mínimos, lo que los hace reactivos frente a una amplia gama de tumores. La especificidad de las células diana de estos constructos se determina mediante el anticuerpo o anticuerpos coadministrados, permitiendo así que estos constructos se usen sin cambios para ninguna indicación clínica para la que se pueda preparar un anticuerpo adecuado. Los anticuerpos policlonales, cócteles que consisten en múltiples anticuerpos monoclonales, y construcciones de anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos biespecíficos, minicuerpos y anticuerpos TriBi (triméricos, biespecíficos) se pueden usar de manera beneficiosa junto con esta invención.

65 **[0097]** La presente invención se puede administrar ya sea a los animales o a sujetos humanos. Al evaluar la eficacia

clínica, los modelos animales más beneficiosos incluyen ratones deficientes en RAG/de cadena y común (que carecen de células T, B y NK) o ratones SCID (que carecen de células T y B); estas cepas están disponibles en The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME. La supresión del sistema inmune nativo en tales animales inmunocomprometidos facilita la diferenciación entre las respuestas inducidas por el tratamiento y las respuestas inmunes normales. Además, los derivados de líneas celulares pueden usarse para tratar sujetos animales, como bovinos, cerdos, conejos, alpacas, caballos, caninos, felinos, hurones, ratas, ratones, aves de corral y búfalos, que padecen tumores en combinación con anticuerpos específicos de tumores. El uso terapéutico de las células NK-92 se puede mejorar preparando sujetos que van a recibir células NK-92 transducidas con CD16 para el tratamiento mediante infusión de los sujetos con una dosis baja de IL-2 durante varios días antes de administrar las células NK-92-CD16 y anticuerpo dirigido, 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 celulares NK-92mi o NK-92ci que se han modificado por ingeniería genética para expresar constitutivamente IL-2. En cualquier caso, el tratamiento concurrente con IL-2 puede aumentar la supervivencia de las células NK-92 administradas.

**[0098]** Puesto que la línea de células NK-92 se aisló de un gran sujeto linfomático granular, las células tienen el potencial para establecer tumores en sujetos receptores. Aunque esta tumorigenicidad no se ha observado en ningún sujeto (humano o animal), la práctica aceptada incorpora irradiación y de células NK-92 antes de la administración a niveles de dosis que suprime la proliferación de células NK-92 mientras que se mantiene sustancialmente la citotoxicidad y la supervivencia celular. La irradiación gamma de células NK-92 a dosis de entre aproximadamente 750 y 1000 grises, *por ejemplo*, 750, 800, 850, 900 y 950 grises, se considera suficiente para este fin.

**[0099]** El tratamiento *in vivo* de un sujeto se inicia mediante la administración del anticuerpo de direccionamiento antes, o concurrentemente con, la administración de células NK-92 transducidas con CD16. La administración se realiza típicamente por 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 dividida, particularmente cuando IL-2 no se coadministra, con el fin de mantener un alto nivel de células NK-92 transducidas activas en el sujeto. En algunos 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.

**[0100]** Las células NK-92-CD16, NK-92-CD16/γ y NK-92-CD16/ζ de la presente invención representan poblaciones estables y reproducibles de las células efectoras que son de particular utilidad en la evaluación *in-vitro* de anticuerpos que se están desarrollando como posibles agentes terapéuticos. Estas mismas líneas celulares son componentes efectivos de terapias *in vivo* para el tratamiento de enfermedades, incluidos cánceres e infecciones. La coadministración de una de estas líneas celulares junto con un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno que es expresado por el tumor o la célula infectada puede potenciar los efectos terapéuticos del anticuerpo, tratando así la enfermedad. Se puede observar un efecto beneficioso similar en los casos en que la línea celular se administra como una terapia única a un sujeto que ha desarrollado anticuerpos endógenos contra un tumor o infección.

**[0101]** Además, mientras que el receptor Fc CD16 se ha ejemplificado, la presente descripción no se limita a la expresión de FcγRIII-A, y la expresión de otros receptores de Fc para IgG y otros tipos de anticuerpos está también dentro del alcance de la divulgación, incluyendo las clases de receptores Fcγ (*p. ej.*, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII y FcRn, Fcα (alfa), Fcε (épsilon), y sus diversas subclases. También se pueden usar líneas celulares variantes adicionales NK-92 con la invención. El NK-92 puede, a modo de ejemplo, ser co-transducido con genes que conducen a la creación de líneas celulares tales como NK-92ci-CD16 y NK-92mi-CD16 que expresan tanto IL-2 como CD16, y que, por lo tanto, pueden usarse sin necesidad de IL-2 exógena. Otros beneficios y usos de la presente invención se harán evidentes en los ejemplos específicos descritos abajo.

#### *Composiciones farmacéuticas*

**[0102]** Las células (por ejemplo, NK-92 modificado y no modificado), polipéptidos y Abs, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones típicamente comprenden la célula, polipéptido y/o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles 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 5% de albúmina sérica humana. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

#### *Formulaciones inyectables*

**[0103]** Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una célula NK-92 y/o anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de

ingredientes como se requiera, seguido por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico, y los otros ingredientes requeridos como se discutió. Polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización que producen un polvo que contiene el ingrediente activo y cualquier ingrediente deseado de una solución estéril.

## EJEMPLOS

### *Ejemplo 1: Preparación de retrovirus recombinante CD16*

**[0104]** CD16 ADNc X52645.1 que codifica la forma de baja afinidad de la región receptora inmunoglobulina transmembrana y Fc HI-A (FcγRIII-A o CD16) [fenilalanina-157 (F157), secuencia completa: SwissProt P08637 (SEQ ID NO: 1)] o una variante polimórfica que codifica una forma de afinidad superior del receptor CD16 [Valina-157 (F157V), secuencia completa: SwissProt VAR\_008801 (SEQ ID NO: 2)] se subclonó en el vector de expresión retroviral bicistrónico, pBMN-IRES-EGFP (obtenido de G. Nolan, Stanford University, Stanford, CA) usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I de acuerdo con los métodos estándar.

**[0105]** El vector recombinante se mezcló con 10 µL del reactivo PLUS™ (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™ (Invitrogen) en 100 µL de Opti-MEM® sin suero precalentado; y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esta mezcla se llevó luego a un volumen total de 1 mL mediante la adición de Opti-MEM® sin suero precalentado. Las células empaquetadoras Phoenix-Amphotropic (obtenidas de G. Nolan, Universidad de Stanford, Stanford, CA; (Kinsella y Nolan, 1996)) se cultivaron 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 reactivo Lipofectamina™ PLUS™ a cada pocillo, y se incubaron las células durante al menos tres horas a 37°C bajo un 7% de CO<sub>2</sub> atmósfera de aire/equilibrio. Cuatro mL de medio de RPMI pre-calentado que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) se añadió a cada pocillo, y las células se incubaron por la noche a 37°C, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub>/equilibrio de aire al 7%. Los medios fueron eliminados; las células se lavaron con 6 mL de Opti-MEM® sin suero precalentado; se añadieron 2 mL de Opti-MEM® sin suero; y las células se incubaron a 37°C, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub>/equilibrio de aire al 7% durante 48 horas adicionales.

**[0106]** El sobrenadante que contiene el virus se recogió en un tubo de centrifuga de 15 mL de plástico; se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos para eliminar las células y los fragmentos celulares; y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifuga de plástico de 15 mL. Inmediatamente antes del uso, se añadieron 20 µL de reactivo PLUS™ a la suspensión de virus; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos; se añadieron 8 µL de Lipofectamina™ a la mezcla; y la mezcla se incubó durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente.

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

**[0107]** Las células NK-92 cultivadas en α-MEM (Sigma; St. Louis, MO) suplementado con 12,5% de FBS, 12,5% de suero de caballo fetal (FHS) y 500 IU rhlL-2/ mL (Chiron; Emeryville, CA) se recogieron 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 la suspensión celular que contiene 5 x 10<sup>4</sup> 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 plaquearon en placas de cultivo de 12 pocillos. Las placas se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 minutos y se incubaron a 37°C bajo una atmósfera de 7% de CO<sub>2</sub>/equilibrio de aire durante 3 horas. Este ciclo de centrifugación y la incubación se repitió una 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 bajo un 7% de CO<sub>2</sub> de aire/equilibrio hasta que las células fueron confluentes. Las células transducidas se recogieron, se resuspendieron en medio Opti-MEM® libre de suero y se clasificaron en función de su nivel de expresión de EGFP utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), EGFP coexpresado con, y un marcador sustituto para CD16. La expresión en la superficie de la célula de CD16 se confirmó por inmunotinción de las células transducidas con un anticuerpo anti-CD16. Las células transducidas, que se designan como NK-92-CD16, se pasaron con IL-2 reciente cada 4 días y se ensayaron para determinar la expresión de CD16 en la superficie celular antes del uso.

**[0108]** Las Figuras 1A y 1B (Figura 1) son diagramas de citómetro de flujo de dispersión que muestran células NK-92 transducidas con CD16 ADNc utilizando el vector pBMN-IRES-EGFP después de tinción con ficoeritrina secundaria (PE) conjugada con anti-ratón de anticuerpo IgG solo (Figura 1A) o anticuerpo anti-CD16 (3G8 (Fleit *et al.*, 1982; Perussia y Trinchieri, 1984); IgG de ratón) + PE-anti-IgG de ratón (Figura 1B) y análisis usando un FACS (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) citómetro de flujo. 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 celular NK-92-CD16 expresa CD16 en la superficie de la célula cuando se tiñe con un anticuerpo monoclonal anti-CD 16.

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

[0109] Se prepararon retrovirus recombinantes que incorporan genes insertados para la expresión de cualquiera de las proteínas de señalización accesorias, Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  (SEQ ID NO:5) o TCR- $\zeta$  (SEQ ID NO:7), usando métodos estándar para ligar los correspondientes ADNc en el vector de pBMN-IRES-EGFP y la transfección de este constructo en la línea celular de empaquetamiento Phoenix-Amphotropic en la presencia de Lipofectamina™ Plus tal como se describe en el Ejemplo 1. Los retrovirus recombinantes  $\gamma$  o  $\zeta$  resultantes se utilizaron para transducir células NK-92 como se describe en el Ejemplo 2 con las siguientes modificaciones adicionales.

[0110] Las células NK-92 transducidas con polinucleótido Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  (SEQ ID NO:4) o TCR- $\zeta$  (SEQ ID NO:6) se recogieron, resuspendieron en medio Opti-MEM® libre de suero y ordenados sobre la base de su nivel de la EGFP coexpresada utilizando un FACS, el ADNc de CD16 se ligó 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  $\gamma$  o  $\zeta$  se co-transdujeron secundariamente con CD16 pBMN-NoGFP utilizando el mismo método de transducción retroviral tal como se describe en el Ejemplo 2. Las células co-transducidas se suspendieron en  $\alpha$ -MEM, se transfirieron a un frasco T-25, y se hicieron crecer hasta la confluencia a 37°C bajo un 7% de CO<sub>2</sub> de aire/equilibrio. Después de alcanzar la confluencia, las células co-transducidas se inmunotintaron con un anticuerpo anti-CD16 y se clasificaron mediante FACS para la expresión de la superficie celular del CD 16. Las células seleccionadas se subcultivaron con IL-2 reciente cada cuatro días y ensayado para la expresión de CD 16 en la superficie celular antes del uso.

[0111] En este ejemplo, solo uno de los dos vectores contenía el gen para EGFP. Esta disposición facilita la determinación de los niveles a los que se expresan tanto la proteína de señalización accesoria como CD16. En este caso, la proteína de señalización accesoria se coexpresó 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-CD 16 conjugado a un fluoróforo que tiene un espectro de emisión diferente de EGFP para determinar el nivel de expresión de CD16.

[0112] 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 se transducen células NK-92 con ADNc de CD16 en combinación con Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  ADNc ( $\gamma$ ; Figura 2B); o CD3  $\zeta$  ADNc ( $\zeta$ , Figura 2C). La Figura 2 muestra que cuando CD16 se co-expresa con Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  o CD3  $\zeta$  en la línea celular NK-92, la expresión de la superficie celular de CD16 aumenta sobre la obtenida cuando las células NK-92 se transducen con CD 16 solo.

#### *Ejemplo 4: Ensayos de citotoxicidad*

[0113] Las células efectoras (NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- $\zeta$ , NK-92-CD16- $\gamma$ ) se lavaron mediante suspensión en  $\alpha$ -MEM (sin IL-2) y se sedimentaron a 1300 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se suspendió en  $\alpha$ -MEM, se contaron las células y se prepararon alícuotas a concentraciones celulares de 1x10<sup>5</sup>/ml (relación efector a célula diana (E:T) = 1:1), 5x10<sup>5</sup>/ml (E:T = 5:1), 1x10<sup>6</sup>/ml (E:T = 10:1), 2x10<sup>6</sup>/ml (E:T = 20:1) o según sea apropiado para la determinación que se realiza. Las células NK-92 transducidas usadas en estos ensayos se seleccionaron generalmente para la expresión máxima de CD16 como se describió previamente.

[0114] El tipo de célula diana utilizada en estos ensayos se seleccionó sobre la base de los requisitos de la determinación particular que se realiza. Las células Raji (*p. ej.*, Depósito ATCC N° CCL-86), que se sabe que son moderadamente susceptibles (aproximadamente 50% de lisis 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.

[0115] Aproximadamente 2x10<sup>6</sup> de las células diana seleccionadas se lavaron por suspensión en medio RPMI y sedimentación a 1300 rpm durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, 20  $\mu$ L de FBS y 100  $\mu$ Ci de Na<sup>51</sup>Cr]cromato se añadió y las células se incubaron a 37°C durante 60-90 minutos con mezclado cada 30 minutos. Las células diana 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 resuspendió en  $\alpha$ -MEM y se diluyó a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup>/mL. Las células diana para uso en citotoxicidad redirigida o ensayos de ADCC se incubaron adicionalmente con el anticuerpo apropiado a una concentración final de 0,01-5  $\mu$ g/ml para 10-15 minutos a temperatura ambiente.

[0116] Cien  $\mu$ L del tipo seleccionado de células diana y 100  $\mu$ L de la concentración apropiada de células efectoras se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en V. Se prepararon de tres a seis pocillos replicados en cada relación E:T. En total, se asignaron 6 pocillos a cada uno de un control de lisis espontáneo (células efectoras reemplazadas con 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM) y control de liberación total (las células efectoras se reemplazaron con 100  $\mu$ L de detergente t-octilfenoxipolietoxietanol al 2% (Triton X-100®) en  $\alpha$ -MEM). Desafortunadamente, se asignan seis o más pocillos adicionales al uso de células efectoras NK-92 no modificadas que no expresan CD16 como un control de procedimiento y estándar interno. La placa se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de 7% de CO<sub>2</sub>/balance de aire. Al final del periodo de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos, y 100  $\mu$ L del sobrenadante se recogió de cada pocillo para contar en un contador y para medir de liberación de <sup>51</sup>Cr. El porcentaje de lisis específica de células diana se calculó como:

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

(liberación total de cpm medio - liberación espontánea de cpm medio)

*Ejemplo 5: Lisis celular mediada por CD16*

- 5 **[0117]** Se usó un anticuerpo monoclonal específico para CD16 en ensayos de citotoxicidad redirigidos en aquellos casos en los que estaba disponible una línea celular de obtención de alquitrán que expresaba un receptor de Fc distinto de CD16. En particular, el P815 FcγR + línea celular de mastocitoma de ratón y línea celular mielocítica humana FcγR<sup>+</sup> THP-1 se utilizaron como dianas en combinación con el anticuerpo monoclonal anti-CD 16 (mAb) 3G8 (Fleit *et al.*, 1982; Perussia y Trinchieri, 1984) para evaluar 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 diana se une a la porción Fc del anticuerpo, mientras que la porción F(ab) del anticuerpo se une a CD 16 en la célula efectora. Alternativamente, se pueden realizar ensayos de citotoxicidad redirigidos usando células diana que expresan un antígeno único, pero que no expresan un receptor de Fc, junto con una construcción de anticuerpo biespecífica. En este formato, un dominio de unión F(ab) del anticuerpo biespecífico se une específicamente al antígeno de la célula diana mientras que otro dominio F(ab) se une específicamente a CD16. La evaluación de células NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ o CD16 NK-92-ζ en este formato se llevó a cabo usando SKOV-3 como células diana y el anticuerpo quimérico 2B1 como el agente de reticulación. El anticuerpo biespecífico quimérico 2B1 tiene un dominio de unión que es específico para HER2/neu y un segundo enlace principal 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 células NK-92-CD16, NK-92-CD16-γ y NK-92-CD16-ζ contra células diana P815 en un ensayo redirigido por citotoxicidad usando anticuerpo quimérico 2B1 después de realizar un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr por cuatro horas. Esta Figura muestra que a concentraciones de anticuerpo menos saturación, la citotoxicidad es una función tanto de la concentración de anticuerpo como del nivel de expresión de CD16 en las células efectoras NK-92.
- 10
- 15
- 20
- 25 **[0118]** El siguiente procedimiento se utilizó en la realización de ambos ADCC y ensayos de citotoxicidad redirigida, el tipo de ensayo se determina por las características de la célula diana y el anticuerpo seleccionado. Las células diana seleccionadas fueron etiquetadas con Na<sup>51</sup>Cr]cromato como se describe en el Ejemplo 4. Las alícuotas de las células diana marcadas con <sup>51</sup>[Cr] se incubaron adicionalmente con el anticuerpo seleccionado en múltiples concentraciones entre 0,01 μg y 5 μg/mL durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó con α-MEM, y se ajustó a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/mL antes de su uso. Cien μL del tipo seleccionado de células diana y 100 μL de células efectoras a concentraciones de células de 1x10<sup>5</sup>/mL (E:T = 1:1), 5x10<sup>5</sup>/mL (E:T = 5:1), 1x10<sup>6</sup>/ml (E:T = 10: 1), 2x10<sup>6</sup>/ml (E:T = 20:1) o según sea apropiado para la determinación que se realiza se añadieron a cada pocillo de una placa de fondo en V de 96 pocillos. Se prepararon de tres a seis pocillos replicados en cada relación E:T a evaluar. Se asignaron al menos 6 pocillos a cada uno de los controles de lisis espontáneos (células efectoras reemplazadas con 100 μL de α-MEM) y control de liberación total (las células efectoras se reemplazaron con 100 μL de 2% de detergente triton X-100 en α-MEM). Se asignaron tres pocillos adicionales en cada relación E:T a los controles "no ADCC" en los que las células receptoras no se expusieron al anticuerpo. Deseablemente, se asignan 6 o más pocillos adicionales al uso de células efectoras NK-92 no modificadas que no expresan CD16 como un control de procedimiento y estándar interno. La placa se centrifugó a 500 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de 7% de CO<sub>2</sub>/balance de aire. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos y se recogieron 100 mL del sobrenadante de cada pocillo para contar en un contador y como medida de liberación de <sup>51</sup>[Cr] debido a la citotoxicidad. El porcentaje de lisis específica se calculó como se describe en el Ejemplo 4.
- 30
- 35
- 40
- 45 **[0119]** Estos ensayos también pueden emplear células NK-92-CD16 que expresan diferentes niveles de superficie de CD16 (a través de la clasificación celular o co-transducción de vía γ o ζ), así como NK-92 transducida con el alelo polimórfico de alta afinidad del gen CD16 (F157V). Estas variantes de la invención proporcionan un amplio rango dinámico de sensibilidades de ensayo. Aunque este Ejemplo se describe con referencia a anticuerpos monoclonales y construcciones de anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos policlonales y otros tipos de construcciones de anticuerpos que tienen las características apropiadas también se pueden usar en la práctica de esta invención.
- 50

*Ejemplo 6: Cribado y evaluación de anticuerpos terapéuticos*

- 55 **[0120]** Las células diana seleccionadas se marcaron con Na<sup>51</sup>Cr]cromato como se describe en el Ejemplo 4 y se ajustó a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/mL antes del uso. A continuación, se transfirió una alícuota de 100 μL de células diana marcadas a cada pocillo del número requerido de placas de 96 pocillos. Las concentraciones de inmunoglobulina en los hibridomas sobrenadantes a cribar se ajustaron opcionalmente, pero preferiblemente, a una concentración nominal conveniente de 1 μg/mL. Se añadieron alícuotas de al menos 100 μL de cada sobrenadante de hibridoma a cada uno de los tres pocillos que contenían células diana; se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con α-MEM, y re-suspendieron en 100 μL de α-MEM. La concentración de células efectoras se ajustó según fuera apropiado para alcanzar 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 1x10<sup>6</sup> células/ml. El ensayo se inició añadiendo 100 μL de células efectoras a cada pocillo. Las placas se centrifugaron a 500 rpm durante 3 minutos y se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de 7% de CO<sub>2</sub>/balance de aire. 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 pocillo para contar en un contador y como medida de la liberación de <sup>51</sup>[Cr] debido a la citotoxicidad. El
- 60
- 65

porcentaje de lisis específica se calculó como se describe en el Ejemplo 4. Se asignaron al menos seis pocillos a cada uno de un control de lisis espontáneo (células efectoras reemplazadas por 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM) y un control de liberación total (células efectoras reemplazadas por 100  $\mu$ L de 2% de detergente triton X-100 en  $\alpha$ -MEM) en cada placa. Se asignaron seis pocillos adicionales en cada conjunto de placas a cada uno de los controles "sin anticuerpo" (células diana no tratadas con anticuerpo) y a un control de citolisis NK-92. La lisis específica se informó como el promedio de tres pocillos replicados después de la corrección para los controles apropiados. La eficacia también se puede evaluar mediante la medición de indicadores indirectos, como la liberación de citoquinas por las células NK-92-CD16, la regulación positiva de los marcadores de activación de células NK, como CD25, CD69 y/o CD95L, la activación de los factores de transcripción, como NF-AT o NF- $\kappa$ B dentro de las células NK-92, o la activación de caspasas u otros marcadores de apoptosis en las células diana.

**[0121]** En la mayoría de los casos, se prepararon números relativamente pequeños (a menudo solo uno) de construcciones de anticuerpos. En tales casos, no fue necesario cribar, 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 el cribado se caracterizaron posteriormente con más detalle usando ensayos tales como el descrito en el Ejemplo 5. Se pueden analizar concentraciones variables de anticuerpos purificados para comparar eficacias para inducir ADCC. Además, las pruebas comparativas del potencial de ADCC de anticuerpos en células NK-92 que portan formas de CD16 de baja afinidad (F157) frente a mayor afinidad (F157V) ofrecieron un ensayo conveniente y reproducible para abordar las eficacias terapéuticas de anticuerpos individuales en el contexto de ambos de estos alelos humanos conocidos de CD 16. Esto también evitó la necesidad de que el usuario identificara donantes específicos que son homocigotos para cada uno de los dos alelos para tales ensayos.

#### *Ejemplo 7: Producción de citocina mediada por CD16*

**[0122]** Tras la activación, se sabe que las células NK-92 producen y secretan citocinas, incluyendo interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$  y otros), interleucinas (IL)-5, -10 y -13, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico y otros después de la activación. La producción de estas citoquinas puede determinarse mediante métodos estándar que incluyen kits de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) específicos de citoquinas que están disponibles a partir de múltiples fuentes comerciales (por ejemplo, BD Phramingen, San Diego, CA). La producción de citocinas por células NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- $\gamma$  y NK-92-CD16- $\zeta$  en respuesta a la estimulación mediada por CD16 se pueden determinar de una manera que es análoga a la ADCC y ensayos de citotoxicidad redirigidos descritos en los Ejemplos 4 y 5.

**[0123]** Las células efectoras (NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- $\gamma$  y NK-92-CD16- $\zeta$ ) se lavaron mediante suspensión en  $\alpha$ -MEM (sin IL-2) y sedimentación en 1300 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se suspendió en  $\alpha$ -MEM, se contaron las células y se prepararon alícuotas a concentraciones celulares de  $1 \times 10^5$ /mL (E:T = 1:1),  $5 \times 10^5$ /mL (E:T = 5:1),  $1 \times 10^6$ /mL (E:T = 10:1),  $2 \times 10^6$ /mL (E:T = 20:1), o según corresponda para la determinación que se realiza.

**[0124]** El tipo de célula diana utilizada en estos ensayos se seleccionó sobre la base de los requisitos de la determinación particular que se realiza. Las células Raji, que se sabe que son moderadamente susceptibles (aproximadamente 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.

**[0125]** Se combinaron cien  $\mu$ L de concentraciones variables de células efectoras con una concentración constante de células diana tratadas con anticuerpo (no marcadas con  $^{51}$ [Cr]) en pocillos de una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se prepararon de tres a seis pocillos replicados en cada relación E:T a evaluar. Se asignaron al menos 6 pocillos cada uno como controles para la activación de células efectoras no específicas de CD 16 en donde las células diana se reemplazaron con 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM (liberación espontánea) o con 100  $\mu$ L de triton X-100 al 2% (total lanzamiento). También se incluyeron controles apropiados que usaban células diana que no habían sido tratadas con anticuerpos y células diana o efectoras que habían sido tratadas con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> para suprimir la activación de células efectoras no específicas de CD16 según correspondiera. Las células NK-92 transducidas que expresan diferentes niveles o afinidades de CD16 podrían haberse usado 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 de 7% de CO<sub>2</sub>/balance de aire. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 minutos, y se recogieron alícuotas del sobrenadante de cada pocillo para cuantificar las concentraciones de citoquina, usando kits de ELISA de citoquinas disponibles comercialmente (por ejemplo, BD Phramingen, San Diego, CA). La producción de citoquinas de las células efectoras se determinó generalmente para rastrear la citotoxicidad de las células efectoras y, por lo tanto, podría tomarse como un indicador alternativo de activación de células efectoras.

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

**[0126]** Ciertas citocinas, particularmente IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, son conocidas para promover el crecimiento, supervivencia, citotoxicidad y actividades de liberación de citoquinas de NK, NK-92, NK-92-CD16, NK-92-CD16- $\gamma$  y

NK-92-CD16-ζ, y otras células variantes NK-92 tanto *in vitro* como *in vivo*. A modo de ejemplo, las células transducidas en los Ejemplos 2 y 3 proliferaron y exhibieron niveles estables de expresión de CD16, citotoxicidad y respuesta a citoquinas durante varios meses sin necesidad de selección de antibióticos cuando se subcultivaron con medio nuevo que contenía IL-2 cada 4 días. Por el contrario, cuando estas mismas células se pasaron sin la adición de IL-2, exhibieron citotoxicidad y niveles de producción de citocinas que disminuyeron con el tiempo durante el período de cultivo de 4 días y regresaron a niveles superiores el primer día después de la adición de IL-2 reciente. Además, las células mantenidas en ausencia de IL-2 lisaron específicamente un rango más estrecho de tipos de células que las células mantenidas en presencia de IL-2. Este comportamiento de las células y derivados NK-92 transducidos refleja estrechamente el de las células NK primarias no modificadas. Por estas razones, es deseable ensayar células y derivados transducidos a intervalos constantes después del paso con concentraciones definidas de IL-2. De forma 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 aconsejable, la línea celular NK-92mi o NK-92ci que se ha diseñado para expresar IL-2 endógena a niveles que promueven la proliferación, la supervivencia y la proliferación de NK-92 la actividad también puede ser empleada. Las líneas celulares NK-92mi, NK-92ci y otras líneas celulares derivadas de NK-92 se pueden transducir de la misma manera que se describe para la línea celular NK-92 original en los Ejemplos 2 y 3.

**[0127]** De lo anterior, se observará que numerosas variaciones y modificaciones pueden efectuarse a la divulgación. Por supuesto, se pretende cubrir mediante las reivindicaciones adjuntas todas las modificaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones.

Tabla Z  
Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Definición
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD	Racimo de determinación
CTL	Citotóxicos T-linfocitos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ErbB2	Protooncogen que codifica una cinasa de tirosina receptora unida a membrana de la familia receptora de factor de crecimiento epitelial (EGFR); también conocido como HER-2/neu
FBS	Suero bovino fetal
Fc	Denota la región constante de un anticuerpo
FHS	Suero de caballo fetal
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MCH-I	Complejo de histocompatibilidad principal clase I
MEM	Medio esencial mínimo
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
NF-AT	factor nuclear de células T activadas
NF-AT	factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear-κ: B
NK	Aniquilantes naturales
PBL	Linfocito de sangre periférica
RAG	gen activador de recombinasa
RhIL	recombinante, interleucina humana
ARN	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotaciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
TNF	Factor de necrosis tumoral
TriBi	trimérico, bi-específico

REFERENCIAS

**[0128]**

- Nº de Patent de EE.UU. 4,676,980. 1987. Target specific cross-linked heteroantibodies EE.UU.
- Nº de Patente de EE.UU. 4816567. 1989. Recombinant immunoglobulin preparations.
- WO 91/00360. 1991. Bispecific reagents for AIDS therapy.
- 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.
- Nº de Patente de EE.UU. 5633425. 1997b. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies EE.UU.
- 5 Nº de Patente de EE.UU. 5661016. 1997c. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes EE.UU.
- Nº de Patente de EE.UU. 5625126. 1997d. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies EE.UU. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D.J. Lipman.
- 10 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402. Austin, C.P., and 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. (various pagings) pp.
- 15 Bodine, D.M., K.T. McDonagh, N.E. Seidel, and 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.
- Nº de Patente de EE.UU. 3,773,919. Boswell, G.A., and R.M. Scribner. 1973. Polylactide-drug mixtures EE.UU.
- 20 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. YEE.UU., 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.
- 25 Capecchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell.* 22:479.
- 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.
- 30 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.
- 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.
- 35 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. EE.UU.* 87:6743-6747.
- 40 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. EE.UU.* 90:2350-2354.
- 45 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. EE.UU.* 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.
- 50 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 [see comments]. *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 EE.UU.* 79:3275-9.
- 55 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, Philadelphia, PA.
- 60 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.
- 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.
- 65 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-.

- Nº de Patente EP EP0758394. Groner, B., y D. Moritz. 1997. Bifunctional protein, preparation and use European Patent Office.
- 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.
- 5 Harlow, E., y D. Lane. 1988. *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 EE.UU.* 90:6444-8.
- 10 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.
- Houdebine, L.M. 1997. *Transgenic animals: Generation and use*. Harwood Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. 576 pp.
- 15 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.
- 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.
- 20 Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511.
- Kawai, S., and M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4:1172.
- Kikuchi-Maki, A., S. YEE.UU., 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.
- 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 EE.UU.
- 30 Koehne, G., H.F. Guo, D. Trivedi, R.Y. Williams, R.J. O'Reilly, and 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 (Abstract 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 Lemischka, I.R., D.H. Raulet, y R.C. Mulligan. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell.* 45:917-927.
- 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.
- 50 Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstine, K.M. Higgins, S.R. Schramm, C.C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J.G. McCabe, et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [see comments]. *Nature.* 368:856-9.
- 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.
- 55 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.
- Marasco, W.A., W.A. Haseltine, y S.Y. Chen. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp 120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7889-93.
- 60 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 (N Y).* 10:779-83.
- 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.
- 65 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.
- 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.
- 5 Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, y P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.
- Nº de Patente de EE.UU. 5,830,725. Nolan, G.P., y T. Kinsella. 1998. Rapid, stable high-titre production of recombing retrovirus EE.UU.
- 10 Pear, W., G. Nolan, M. Scott, y D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:8392-8396.
- Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Mataspina, 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.
- 15 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.
- 20 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. EE.UU.* 81:7161-7165.
- 25 Presta, L.G. 1992. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 3:394-8.
- Rassoulzadegan, M., B. Binetruy, and 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-92 cell line. *Clin Exp Immunol*. 129:265-71.
- 30 Reisfeld, R.A., y S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 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.
- 35 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.
- 40 Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl, Acad. Sci. EE.UU.* 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.
- 45 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.
- 50 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., et al. 1997. Plant male germ line transformation. *Plant J*. 12:949-956.
- 55 Traunecker, A., F. Oliveri, and K. Karjalainen. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol*. 9:109-13.
- Trick, H.N., et al. 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol*. 3:9-26.
- Turner, D.L., E.Y. Snyder, and C.L. Cepko. 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron*. 4:833-845.
- 60 Tutt, A., G.T. Stevenson, y M.J. Glennie. 1991. Trispecific F(ab')<sub>3</sub> 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.
- 65

- Verhoeyen, 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, 1. 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, A., L. Buonocore, J.K. Rose, V. Ciccarone, 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, T., 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.
- 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.
- 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, and 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.
- 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.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 **[0129]**
- <110> Campbell, Kerry S.
- 45 <120> LÍNEAS DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES HUMANAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS
- <130> 096937-0028
- <150> 60/586,581
- 50 <151> 2004-07-10
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1
- <211> 254
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 60 <400> 1
- 65

ES 2 678 094 T3

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 1 5 10 15

5 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 Glu  
 35 40 45

10 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 50 55 60

15 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

20 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 100 105 110

25 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

30 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
 145 150 155 160

35 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

40 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
 195 200 205

45 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

50 Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
 245 250

55 <210> 2  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 2

65

ES 2 678 094 T3

5 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 1 5 10 15

10 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
 20 25 30

15 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
 35 40 45

20 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 50 55 60

25 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 65 70 75 80

30 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
 85 90 95

35 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 100 105 110

40 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 115 120 125

45 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
 130 135 140

50 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Val Tyr Ile Pro  
 145 150 155 160

55 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe  
 165 170 175

60 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
 180 185 190

65 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
 195 200 205

70 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly  
 210 215 220

75 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp  
 225 230 235 240

<210> 3  
 <211> 765  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 678 094 T3

atgtggcagc tgetcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgctggact 60  
 5 gaagatctcc caaaggctgt ggtgttccctg gagcctcaat ggtacagggg gctcgagaag 120  
 gacagtgtga ctotgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180  
 tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag goctcgagct acttcattga cgtctccaca 240  
 10 gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccctggg 300  
 cagctagaag tccatategg ctggctgttg ctccaggccc ctgggtgggt gttcaaggag 360  
 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420  
 15 tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca 480  
 aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggttttttg gagtaaaaat 540  
 20 gtgtcttcag agactgtgaa catcaccate actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca 600  
 tcattcttcc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtaet cctttttgca 660  
 gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaaccattc gaagctcaac aagagactgg 720  
 25 aaggaccata aatttaaatg gagaaggac cctcaagaca aatga 765

30 <210> 4  
 <211> 591  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

35 cagaacggcc gatctccagc ccaagatgat tccagcagtg gtcttgctct tactcctttt 60  
 ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc tatatcctgg atgccatcct 120  
 40 gtttctgtat ggaattgtcc tcaccctcct ctactgtcga ctgaagatcc aagtgcgaaa 180  
 ggcagctata accagctatg agaaatcaga tgggttttac acgggcctga gcaccaggaa 240  
 ccaggagact tacgagactc tgaagcatga gaaaccacca cagtagcttt agaatagatg 300  
 45 cggtcataatt cttctttggc ttctggttct tccagcctc atggttggca tcacatatgc 360  
 ctgcatgcca ttaacaccag ctggccctac cctataatg atcctgtgtc ctaaattaat 420  
 50 atacaccagt ggttcctcct cctgtttaa gactaatgct cagatgctgt ttaccgatat 480  
 ttatattcta gtctcactct cttgtcccac ccttcttctc ttcccattc ccaactccag 540  
 ctaaaatatg ggaagggaga acccccata aaactgccat ggactggact c 591

55 <210> 5  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

65

ES 2 678 094 T3

5 Met Ile Pro Ala Val Val Leu 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 Leu  
 20 25 30

10 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 35 40 45

15 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val  
 50 55 60

20 Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln  
 85

25 <210> 6  
 <211> 1472  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 6

ctttttctcct aaccgctcccg gccaccgctg cctcagcctc tgcctcccag cctctttctg 60

35 agggaaagga caagatgaag tggaaggcgc ttttcaccgc ggccatcctg caggcacagt 120

tgccgattac agaggcacag agctttggcc tgctggatcc caaactctgc tacctgctgg 180

40 atggaatcct cttcatctat ggtgtcattc tcaactgcctt gttcctgaga gtgaagttca 240

gcaggagcgc agagcccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagotca 300

atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga 360

45 tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag 420

ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg 480

ggcacgatgg cdtttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc 540

50 acatgcaggc cctgccccct cgctaacagc caggggattt caccactcaa aggcagacc 600

tgcagacgcc cagattatga gacacaggat gaagcattta caaccgggtt cactcttctc 660

55

60

65

ES 2 678 094 T3

5  
10  
15  
20  
25

```

agccaactgaa gtattcccct ttatgtacag gatgctttgg ttatatattag ctccaaacct 720
tcacacacag actgttgtcc ctgcactcct taaggagtg tactcccagg gcttacggcc 780
ctgccttggg cctcttggtt tgcgggtggt gcaggtagac ctgtctcctg gcggttcctc 840
gttctccctg ggaggcgggc gcactgcctc tcacagctga gttgttgagt ctgttttcta 900
aagtccccag agaaagcgca gatgctagca catgcctaa tgtctgtatc actctgtgtc 960
tgagtggcct cactcctgct gtaaatttgg cttctgttgt caccttcacc tcctttcaag 1020
gtaactgtac tgggccatgt tgtgcctccc tggtgagagg gccgggcaga ggggcagatg 1080
gaaaggagcc taggocaggt gcaaccaggg agctgcaggg gcatgggaag gtgggcgggc 1140
aggggagggg cagccagggc ctgcgagggc agcgggagcc tccctgcctc aggctctgt 1200
gccgcaccat tgaactgtac catgtgctac aggggccaga agatgaacag actgaccttg 1260
atgagctgtg cacaaagtgg cataaaaaac agtgtgggta cacagtgtga ataaagtgtc 1320
gctggagcaag aggaggccgt tgattcactt cagccttca gcgaatgaca aaatcatctt 1380
tgtgaaggcc tcgcaggaag acgcaacaca tgggacctat aactgcccag cggacagtgg 1440
caggacagga aaaaccctc aatgtactag gg 1472

```

30  
35

```

<210> 7
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```

40  
45  
50  
55

```

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

```

60  
65

ES 2 678 094 T3

5           Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
                          85                                   90                                   95

10          Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu  
                          100                                   105                                   110

15          Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys  
                  115                                   120                                   125

20          Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu  
                  130                                   135                                   140

25          Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu  
                  145                                   150                                   155                                   160

30          Pro Pro Arg

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

**1.** Una composición que comprende:

5 una célula NK-92 modificada para expresar un receptor de Fc en una superficie de la célula; y  
un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno que se expresa mediante una célula tumoral o una  
célula infectada; donde el receptor de Fc comprende CD16 (FcγRIII-A).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

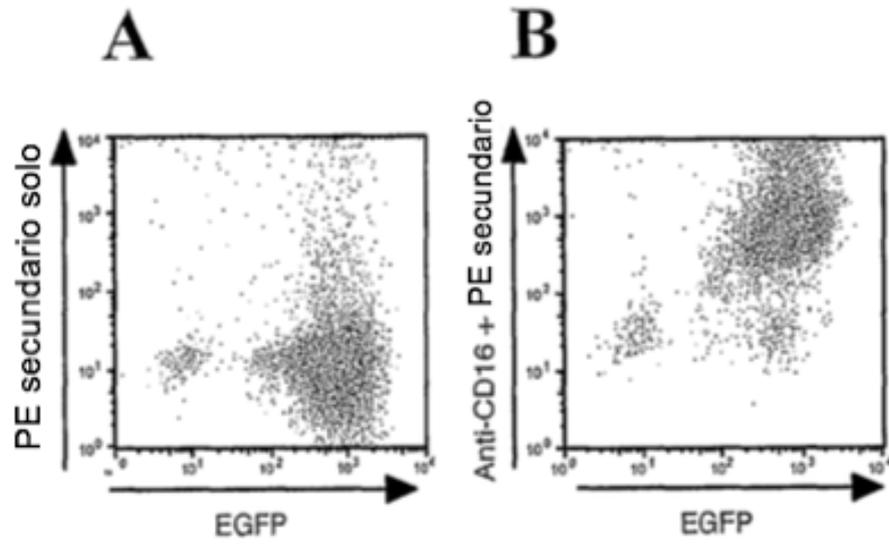


Figura 2

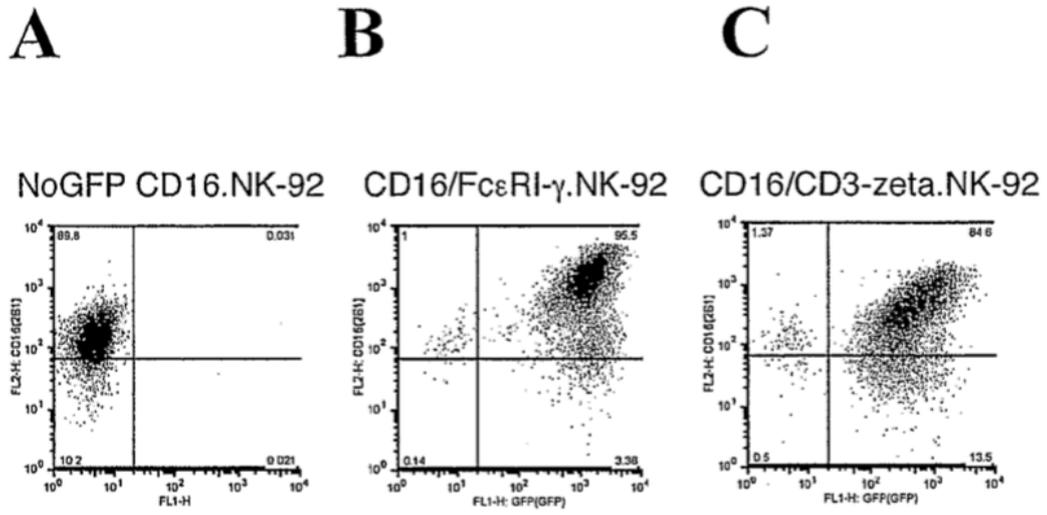


Figura 3

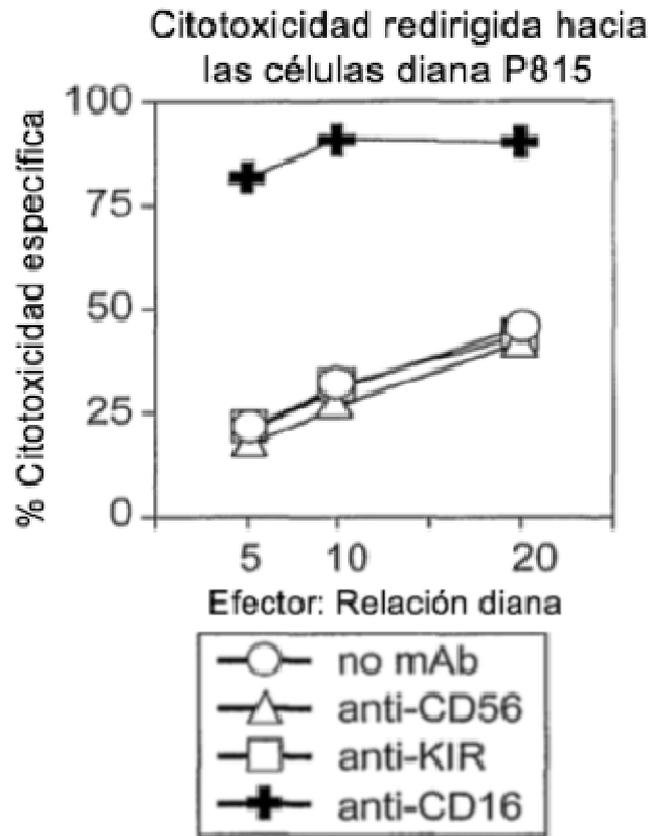


Figura 4

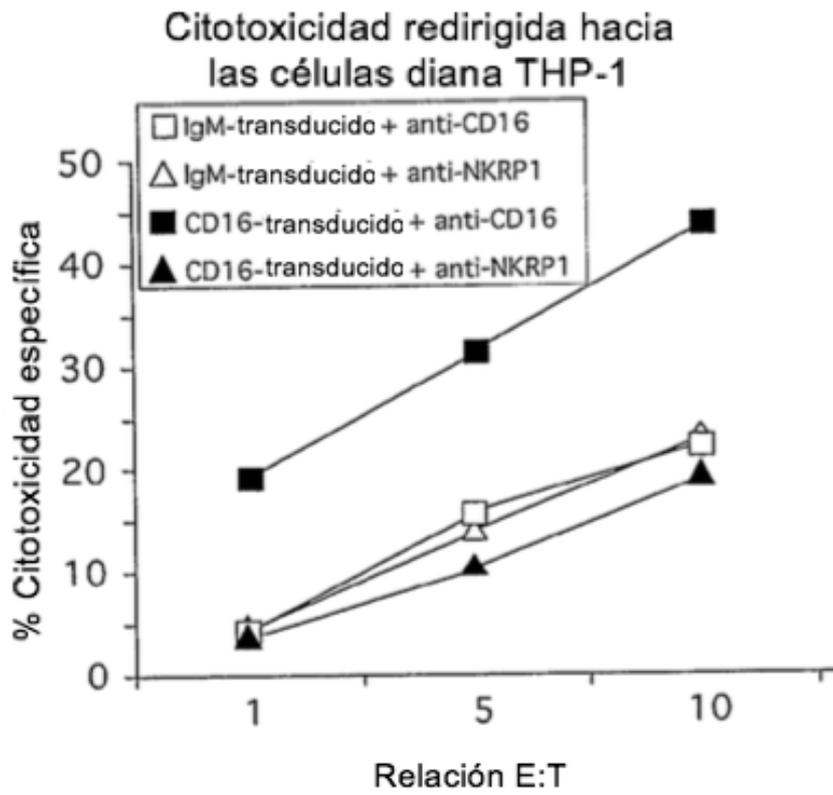


Figura 5

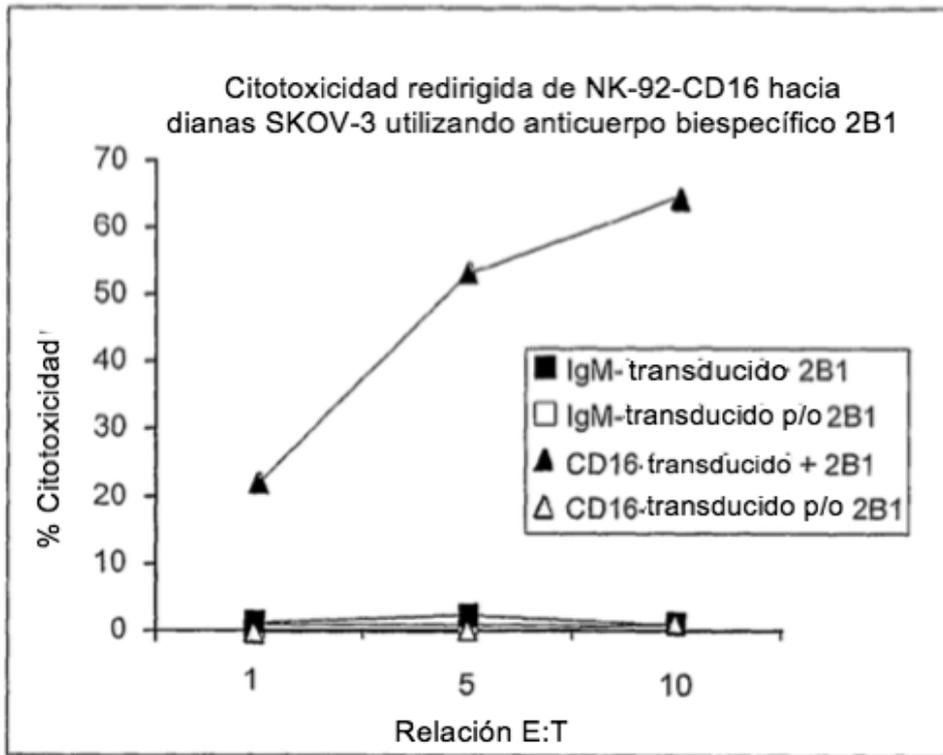


Figura 6

