

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 047**

51 Int. Cl.:

C07K 14/18 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/GB2015/051370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15722574 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3140317**

54 Título: **Activación de células NK inducida por péptidos**

30 Prioridad:

09.05.2014 GB 201408264

09.02.2015 GB 201502122

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

10.02.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON (100.0%)
Highfield
Southampton, Hampshire SO17 1BJ, GB**

72 Inventor/es:

KHAKOO, SALIM IQBAL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 805 047 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Activación de células NK inducida por péptidos

5 Esta invención se refiere a la activación de células NK y a la inmunidad mediada por células NK, a péptidos inmunogénicos, a composiciones y a complejos; y a métodos asociados de tratamiento o profilaxis.

10 Las células citolíticas naturales (NK) son importantes en la respuesta inmunitaria al cáncer, trastornos inflamatorios e infecciones globalmente importantes, tales como VIH, hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC) y malaria. Los receptores similares a inmunoglobulinas de células citolíticas (KIR) se expresan en células NK y combinaciones específicas de KIR y sus ligandos de HLA de clase I conducen a la protección o susceptibilidad a VHC, VIH, VPH y malaria; a cánceres relacionados con virus, incluyendo carcinoma hepatocelular (VHB y VHC) y cáncer de cuello uterino (VPH); a trastornos asociados al embarazo y el desenlace de tumores malignos hematológicos y trasplante de médula ósea¹⁻⁹.

15 Se han demostrado células NK de "memoria" longevas específicas de virus en ratones¹⁰⁻¹². Consecuente con estas poblaciones en seres humanos, se han observado expansiones de células NK que expresan KIR inhibidores o activadores específicos para el propio MHC de clase I en varias infecciones virales (VHC, VIH, CMV, hantavirus) y asociados a la protección en la infección tanto por VHC como por virus Chikungunya¹³⁻¹⁷. Los impulsores de estas expansiones específicas del propio MHC de clase I no están claros. Sin embargo, los KIR se acoplan a MHC de clase I y su péptido unido¹⁸ y se ha demostrado una sensibilidad inesperada de las células NK a los cambios en el contenido de péptidos de MHC de clase I^{19, 20}.

20 La especificidad de los receptores inhibidores se ha definido bien. Debido a la alta homología de secuencia en los dominios de unión a ligando con receptores inhibidores relacionados, los ligandos para el KIR activador se han considerado similares a los del KIR inhibidor, pero generalmente de menor afinidad. Por tanto, en general se cree que los KIR activadores se acoplan a moléculas de MHC de clase I y su péptido unido con los mismos motivos que sus homólogos inhibidores.

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una terapia o profilaxis mediada por células NK mejorada o alternativa.

30 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un complejo que comprende una molécula de HLA-C de MHC de clase I y un péptido capaz de activar la inmunidad mediada por células NK según la reivindicación 1 en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un péptido capaz de activar la inmunidad mediada por células NK, comprendiendo o consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos XⁿAX²X¹,

en la que

40 Xⁿ es una secuencia de aminoácidos de entre 5 y 12 residuos, y

X¹ es cualquier aminoácido; o leucina o isoleucina; y

45 X² es alanina, treonina, triptófano o serina.

En una realización X¹ es leucina o isoleucina. En una realización X¹ es leucina. Alternativamente, en una realización X¹ es isoleucina.

50 En una realización X² es alanina o treonina. En otra realización X² es triptófano o treonina. En otra realización X² es alanina. En otra realización X² es treonina. En otra realización X² es triptófano. En una realización X¹ es leucina y X² es alanina o treonina. En otra realización X¹ es leucina y X² es triptófano o treonina. En otra realización X¹ es leucina y X² es triptófano. En otra realización X¹ es leucina y X² es treonina. En otra realización X¹ es leucina y X² es alanina.

55 Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 5 residuos. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 6 residuos. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 7 residuos. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 5 residuos y X¹ es leucina. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 6 residuos y X¹ es leucina. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 7 residuos y X¹ es leucina. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 7 residuos y X² es triptófano. Xⁿ puede ser una secuencia de aminoácidos de 7 residuos y X² es treonina.

60 La secuencia peptídica de aminoácidos puede comprender cualquier secuencia seleccionada del grupo que comprende:

LNPSVAATL; NPSVAATL; PSVAATL;

65 VAPWNAATL; APWNAATL; PWNAATL;

VAPWNSATL; APWNSATL; PWNSATL;

VAPWNSAAL; APWNSAAL; PWNSAAL;

5 VAPWNAAL; APWNAAL; GAVPDLAWL; GAVPDLATL y PWNAAL.

En una realización alternativa, la secuencia peptídica de aminoácidos puede comprender cualquier secuencia seleccionada del grupo que comprende:

10 LNPSVAATI; NPSVAATI; PSVAATI;

VAPWNAATI; APWNAATI; PWNAATI;

15 VAPWNSATI; APWNSATI; PWNSATI;

VAPWNSAAI; APWNSAAI; PWNSAAI;

VAPWNSAAI; APWNSAAI; y PWNSAAI.

20 La secuencia peptídica de aminoácidos puede comprender cualquier secuencia seleccionada del grupo que comprende:

LNPSVAATL; NPSVAATL; PSVAATL;

25 LNPSVAAAL; NPSVAAAL; PSVAAAL;

LNPSVAASL; NPSVAASL; PSVAASL;

30 LNPSVAAWL; NPSVAAWL; y PSVAAWL.

La secuencia peptídica de aminoácidos puede comprender cualquier secuencia seleccionada del grupo que comprende:

35 LNPSVAATI; NPSVAATI; PSVAATI;

LNPSVAAAI; NPSVAAAI; PSVAAAI;

LNPSVAASI; NPSVAASI; PSVAASI;

40 LNPSVAAWI; NPSVAAWI; y PSVAAWI.

La secuencia peptídica de aminoácidos puede comprender cualquier secuencia seleccionada del grupo que comprende LNPSVAATL; LNPSVAAAL; LNPSVAASL; y LNPSVAAWL.

45 El péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos LNPSVAATL. En otra realización el péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos VAPWNAATL. En otra realización el péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos VAPWNSATL. En otra realización el péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos VAPWNAAL.

50 El péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos GAVPDLAWL. El péptido puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos GAVPDLATL.

55 El péptido puede tener entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 residuos de aminoácidos de longitud. El péptido puede tener entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 residuos de aminoácidos de longitud. El péptido puede tener al menos 8 residuos de aminoácidos de longitud. El péptido puede tener 9 residuos de aminoácidos de longitud.

60 El péptido puede ser un péptido aislado. El péptido puede ser inmunogénico. El péptido puede comprender un péptido derivado de virus, por ejemplo un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína de virus. El péptido puede incluir un péptido oncogénico. El péptido oncogénico puede ser un péptido que se presenta de manera anómala en una célula, de manera que identifica la célula como cancerosa. El péptido puede ser un péptido propio, es decir, un péptido que comprende una secuencia que está codificada por el genoma de un paciente. Por ejemplo, un péptido propio puede estar codificado por un gen que se regula por incremento durante la infección.

65 La divulgación proporciona ventajosamente que puedan utilizarse péptidos específicos de MHC de clase I para dirigir

la activación y expansión de células NK que expresan KIR inhibidores o activadores específicos y que esta propiedad pueda aprovecharse para generar protocolos específicos de péptidos para la terapia con células NK. Esto es atractivo para células NK porque los KIR tienen amplias especificidades de péptido:HLA de manera que el inmunógeno y el antígeno no es necesario que sean los mismos. Hasta la fecha, la terapia con células NK se centra en la generación de grandes cantidades de células NK no específicas. Sin embargo, la comprensión de los conceptos de la presente divulgación conduciría a la activación específica de péptidos de células NK que orientaría a estrategias de vacunación basadas en NK y a los protocolos basados en péptidos para generar subpoblaciones específicas de células NK que pueden usarse terapéuticamente. En particular, los KIR activadores están asociados con tumores malignos hematológicos. Tienen especificidades de MHC de clase I:péptido similares al KIR inhibidor, pero se unen a una afinidad mucho menor²²⁻²⁴. Por tanto, la inhibición domina sobre la activación. En una realización, la divulgación identifica un péptido derivado de VHC que se une específicamente a KIR2DS2, pero no a KIR2DL2. Esto significa que podrían activarse células NK positivas para KIR2DS2 mediante péptidos específicos.

Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un complejo que comprende una molécula de MHC de clase I y el péptido según la divulgación. La molécula de MHC de clase I puede comprender una MHC de clase I truncada en la región de tallo del dominio α 3. La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-C, o parte de la misma. La HLA-C puede ser una HLA-C del grupo 1 (por ejemplo, HLA-C con lisina en el residuo 80 de la hélice alfa de la cadena pesada de MHC de clase I). La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-Cw*0102. La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-C*0304. El complejo puede comprender una proteína de fusión de la molécula de MHC de clase I y el péptido según la divulgación. El complejo puede comprender una proteína de fusión de la molécula de MHC de clase I HLA-Cw*0102 y el péptido según la divulgación. El complejo puede comprender una proteína de fusión de la molécula de MHC de clase I HLA-C*0304 y el péptido según la divulgación. El complejo puede ser un complejo aislado.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una vesícula según la reivindicación 6 en el presente documento.

También tal como se describe, se proporciona una vesícula que comprende el complejo de la divulgación.

La vesícula puede ser un exosoma. La vesícula puede estar aislada. El exosoma puede aislarse de una célula dispuesta para expresar una molécula de MHC de clase I, o parte de la misma, y el péptido según la divulgación. El exosoma puede aislarse de una célula dispuesta para expresar una molécula de MHC de clase I HLA-C, o parte de la misma, y el péptido según la divulgación. El exosoma puede aislarse de una célula dispuesta para expresar una molécula de MHC de clase I HLA-Cw*0102 y el péptido según la divulgación. El exosoma puede aislarse de una célula dispuesta para expresar una molécula de MHC de clase I HLA-C*0304 y el péptido según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona una célula NK activada, en la que la célula NK expresa el receptor KIR2DS2, y en la que la célula NK se activa por exposición al péptido según la divulgación.

La célula NK puede ser de mamífero. La célula NK puede ser humana. La exposición de la célula NK al péptido para activar la célula NK puede ser *in vitro*, por ejemplo en un cultivo celular. La exposición de la célula NK al péptido para activar la célula NK puede provocar la expansión de la célula NK en múltiples células NK que tienen especificidad por péptidos específicos, tales como el péptido según la divulgación, o péptidos relacionados. Una o más citocinas pueden añadirse adicionalmente a las células NK para ayudar a la activación y/o expansión.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico según la reivindicación 7 dada a conocer en el presente documento.

También tal como se describe, se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un péptido según la divulgación.

El ácido nucleico puede ser un vector de plásmido para vacunación. El ácido nucleico puede comprender ADN o ARN. El ácido nucleico puede comprender ácido nucleico viral. El ácido nucleico puede comprender un vector viral. El ácido nucleico puede ser un vector. El ácido nucleico puede comprender ADN de plásmido de virus adenoasociado. El ácido nucleico puede comprender además una secuencia que codifica una molécula de MHC de clase I. La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-C, o parte de la misma. La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-Cw*0102. La molécula de MHC de clase I puede comprender HLA-C*0304. El ácido nucleico puede comprender un promotor viral, tal como el promotor de SV40, el promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) o el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV). El ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica el CTE del virus del mono de Mason-Pfizer (MPV) con o sin rev. El ácido nucleico puede comprender una secuencia potenciadora. El ácido nucleico puede comprender un intrón sintético. El ácido nucleico puede comprender una secuencia líder tripartita (TPL) de adenovirus. El ácido nucleico puede comprender una señal de ubiquitina N-terminal para seleccionar como diana la ruta de MHC de clase I. El ácido nucleico puede codificar para la glicoproteína E3/19K de adenovirus. El ácido nucleico puede codificar para una secuencia 2A para el control del corte y empalme, por ejemplo T2A (virus *Thosea asigna* 2A: T2A), F2A (virus de la fiebre aftosa 2A), virus de la rinitis equina A (E2A) o tescovirus porcino-1 (P2A). El ácido nucleico puede codificar para E19/3K, el péptido de la divulgación, T2A, y una

HLA-C, o parte de la misma. El ácido nucleico puede codificar para E19/3K:péptido:T2A:HLA-C en la orientación proporcionada.

5 Según otro aspecto de la invención se proporciona un virus según la reivindicación 9 dada a conocer en el presente documento.

10 Tal como se describe en el presente documento, se proporciona un virus que comprende el ácido nucleico según la divulgación. El virus puede seleccionarse de cualquiera del grupo que comprende adenovirus; virus adenoasociados; virus de la viruela, por ejemplo, vaccinia tal como MVA; virus alfa, por ejemplo, virus del bosque Semliki; lentivirus; retrovirus; virus oncolítico, por ejemplo, reovirus. El virus puede estar atenuado.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una célula dendrítica que expresa, o capaz de expresar el complejo, según la reivindicación 10 dada a conocer en el presente documento.

15 Tal como se describe en el presente documento, se proporciona una célula dendrítica que expresa, o capaz de expresar el complejo según la divulgación. La célula dendrítica puede comprender ácido nucleico que codifica el complejo según la divulgación. La célula dendrítica puede ser autóloga para el paciente. Por ejemplo, la célula dendrítica puede recogerse de un paciente y transformarse con ácido nucleico que codifica el complejo según la divulgación. Los transformantes, o generaciones de los mismos, pueden devolverse entonces al paciente para su
20 tratamiento o profilaxis (por ejemplo, inmunización).

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica, según la reivindicación 11 dada a conocer en el presente documento.

25 También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más de:

- el péptido según la divulgación;

30 - el complejo según la divulgación;

- la vesícula según la divulgación;

- la célula dendrítica según la divulgación;

35 - el ácido nucleico según la divulgación; y

- el virus según la divulgación.

40 También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el péptido según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el complejo según la divulgación.

45 También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende la vesícula según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende la célula dendrítica según la divulgación.

50 También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el ácido nucleico según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona una composición inmunogénica que comprende el virus según la divulgación.

55 La composición inmunogénica puede incluir un portador, tal como un portador farmacéutico aceptable. El portador puede comprender un tampón.

60 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración de:

- el péptido según la divulgación;

65 - la composición inmunogénica según la divulgación;

- el complejo según la divulgación;

- la vesícula según la divulgación;

5 - la célula dendrítica según la divulgación;

- la célula NK activada según la divulgación;

10 - el ácido nucleico según la divulgación; o

- el virus según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración del péptido según la divulgación.

15 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración de la composición inmunogénica según la divulgación.

20 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración del complejo según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración de la vesícula según la divulgación.

25 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración de la célula dendrítica según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración de la célula NK activada según la divulgación.

30 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración del ácido nucleico según la divulgación.

35 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad regulada por células NK que comprende la administración del virus según la divulgación.

Las células NK activadas pueden proporcionarse en la cantidad de al menos 1×10^7 células por kg de peso corporal. Las células NK activadas pueden proporcionarse en la cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 y 5×10^9 células por kg de peso corporal. Las células NK activadas pueden proporcionarse en la cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^9 células por kg de peso corporal.

40 El tratamiento o profilaxis puede comprender adicionalmente la administración de una o más citocinas. La(s) citocina(s) puede(n) administrarse en la misma composición que el péptido de la divulgación. La administración puede ser por vía intravenosa. En una realización donde va a tratarse el cáncer, la administración puede ser directamente en la arteria que suministra al cáncer.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o infección, según la reivindicación 12 dada a conocer en el presente documento.

50 También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en:

- el péptido según la divulgación;

55 - la composición inmunogénica según la divulgación;

- el complejo según la divulgación;

- la vesícula según la divulgación;

60 - la célula dendrítica según la divulgación;

- la célula NK activada según la divulgación;

65 - el ácido nucleico según la divulgación; o

- el virus según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en el péptido según la divulgación.

5 También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en la composición inmunogénica según la divulgación.

10 También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en el complejo según la divulgación.

15 También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en la vesícula según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en la célula dendrítica según la divulgación.

20 También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en la célula NK activada según la divulgación;

25 también tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en el ácido nucleico según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad regulada por células NK, comprendiendo o consistiendo el agente en el virus según la divulgación.

30 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar:

35 - el péptido según la divulgación;

- la composición inmunogénica según la divulgación;

40 - el complejo según la divulgación;

- la vesícula según la divulgación;

45 - la célula dendrítica según la divulgación;

- el ácido nucleico según la divulgación; o

- el virus según la divulgación; y

50 opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

55 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar el péptido según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

60 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

65 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar la composición inmunogénica según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al

paciente las células NK activadas según la divulgación.

5 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

10 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar el complejo según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

15 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

20 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar la vesícula según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

25 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

30 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar la célula dendrítica según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

35 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2;

40 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar el ácido nucleico según la divulgación; y opcionalmente en el que si el paciente no produce células NK que expresan KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

45 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;

50 en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar:

- el péptido según la divulgación;

55 - la composición inmunogénica según la divulgación;

- el complejo según la divulgación;

60 - la vesícula según la divulgación;

- la célula dendrítica según la divulgación;

- el ácido nucleico según la divulgación; o

65 - el virus según la divulgación; y

opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.

También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;

- en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar el péptido según la divulgación; y
- 5 opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- 10 en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar la composición inmunogénica según la divulgación; y
- opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- 15 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- 20 en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar el complejo según la divulgación; y
- opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- 25 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar la vesícula según la divulgación; y
- 30 opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- 35 en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar la célula dendrítica según la divulgación; y
- opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- 40 También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar el ácido nucleico según la divulgación; y
- 45 opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- También tal como se describe, se proporciona un método de tratamiento o profilaxis de un paciente para una enfermedad regulada por células NK que comprende determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2;
- 50 en el que si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, administrar el virus según la divulgación; y
- opcionalmente en el que si el paciente no produce un ligando para KIR2DS2, administrar al paciente las células NK activadas según la divulgación.
- 55 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente se selecciona de:
- 60 - el péptido según la divulgación;
- la composición inmunogénica según la divulgación;
- el complejo según la divulgación;
- 65 - la vesícula según la divulgación;

- el ácido nucleico según la divulgación; o

- el virus según la divulgación;

5 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
10 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es el péptido según la divulgación;

15 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
20 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es la composición inmunogénica según la divulgación;

25 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
30 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es el complejo según la divulgación;

35 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona a un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
40 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es la vesícula según la divulgación;

45 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
50 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es el ácido nucleico según la divulgación;

55 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,
en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis
con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se
60 selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis
con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente
es el virus según la divulgación;

65 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2,

en el que se selecciona un paciente que produce células NK que expresan KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce células NK que expresan KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

5 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente se selecciona de:

10 - el péptido según la divulgación;
- la composición inmunogénica según la divulgación;

15 - el complejo según la divulgación;
- la vesícula según la divulgación;
- el ácido nucleico según la divulgación; o

20 - el virus según la divulgación;

comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2,

25 en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente, en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

30 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es el péptido según la divulgación;

comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2,

35 en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

40 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es la composición inmunogénica según la divulgación;

comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2,

45 en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente, en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

50 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es el complejo según la divulgación;

comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2,

55 en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

60 También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es la vesícula según la divulgación;

comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2,

65 en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es el ácido nucleico según la divulgación;

5 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

También tal como se describe, se proporciona un método de selección de un paciente para el tratamiento o la profilaxis con un agente dispuesto para activar la protección mediada por células NK de una enfermedad, en el que el agente es el virus según la divulgación;

15 comprendiendo el método la etapa de determinar si el paciente produce un ligando para KIR2DS2, en el que se selecciona un paciente que produce un ligando para KIR2DS2 para el tratamiento o la profilaxis con el agente; y opcionalmente, en el que un paciente que no produce un ligando para KIR2DS2 no se selecciona para el tratamiento o la profilaxis con el agente, y/o se selecciona para un tratamiento alternativo.

El ligando para KIR2DS2 puede comprender un ligando codificado por el alelo HLA-C del grupo I. El ligando para KIR2DS2 puede comprender HLA-A11.

25 El método para seleccionar un paciente puede comprender además administrar el agente al paciente seleccionado.

El tratamiento alternativo puede incluir administrar al paciente la célula NK activada según la divulgación.

30 Determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2 puede comprender proporcionar una muestra de sangre o plasma sanguíneo del paciente y detectar células NK que expresan KIR2DS2 en la sangre o plasma sanguíneo. Determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2 puede comprender proporcionar una muestra de sangre o plasma sanguíneo del paciente y detectar ácido nucleico que codifica KIR2DS2. La detección puede comprender PCR, por ejemplo, usando cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP). La detección puede comprender secuenciación de ácido nucleico, tal como secuenciación de ARN. La detección puede comprender detección mediada por anticuerpos. La detección puede comprender detección mediada por unión de receptor-ligando de KIR2DS2.

40 Determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2 puede comprender proporcionar una muestra de sangre o plasma sanguíneo del paciente y detectar un ligando para KIR2DS2 en la sangre o plasma sanguíneo. Determinar si un paciente produce un ligando para KIR2DS2 puede comprender proporcionar una muestra de sangre o plasma sanguíneo del paciente y detectar ácido nucleico que codifica un ligando para KIR2DS2. La detección puede comprender PCR, por ejemplo, usando cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP). La detección puede comprender secuenciación de ácido nucleico, tal como secuenciación de ARN. La detección puede comprender detección mediada por anticuerpos. La detección puede comprender detección mediada por unión de ligando-receptor.

45 La enfermedad regulada por células NK puede ser una enfermedad capaz de inhibirse, suprimirse, curarse, aliviarse o prevenirse por la acción de destrucción mediada por células NK específicas. La enfermedad regulada por células NK puede ser una enfermedad capaz de modificarse por la acción de destrucción de células NK específicas. La enfermedad regulada por células NK puede comprender una infección viral. La infección viral puede comprender infección por VHC. La infección viral puede comprender infección por VIH. La infección viral puede comprender infección viral crónica, tal como infección por VHC crónica.

50 La enfermedad regulada por células NK puede comprender una enfermedad mediada por KIR activador. La enfermedad regulada por células NK puede incluir una enfermedad mediada por KIR activador. La enfermedad regulada por células NK puede ser cualquiera de las enfermedades de infecciones seleccionadas del grupo que comprende cáncer, VHC, VHB, VPH, malaria, trastornos relacionados con el embarazo, VEB, sarcoma de Kaposi, ébola, VHS, lepra y TB. La enfermedad regulada por células NK puede comprender infección por VHC. La enfermedad regulada por células NK puede incluir infección por VEB.

60 También tal como se describe, se proporciona un método de producción de células NK activadas que comprende exponer una célula NK que expresa receptor de KIR2DS2 a un péptido según la divulgación.

El método de producción de células NK activadas puede ser *in vitro*, por ejemplo en un cultivo celular.

65 También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración de:

- el péptido según la divulgación;
 - 5 - el complejo según la divulgación;
 - la vesícula según la divulgación;
 - el ácido nucleico según la divulgación; o
 - 10 - el virus según la divulgación.
- También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración del péptido según la divulgación.
- 15 También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración del complejo según la divulgación.
- 20 También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración de la vesícula según la divulgación.
- 25 También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración del ácido nucleico según la divulgación.
- 30 También tal como se describe, se proporciona un método para activar una respuesta inmunitaria mediada por células NK de un paciente para el reconocimiento de un antígeno que comprende la administración del virus según la divulgación.
- El antígeno puede comprender un péptido derivado de VHC. El antígeno puede comprender un péptido derivado de VIH. El antígeno puede comprender un péptido derivado de una célula cancerosa. El antígeno puede comprender un péptido derivado de, o específico para, cualquiera de las enfermedades de infecciones seleccionadas del grupo que comprende cáncer, VHC, VHB, VPH, malaria, trastornos relacionados con el embarazo, VEB, sarcoma de Kaposi, ébola, VHS, lepra y TB. La enfermedad regulada por células NK puede comprender infección por VHC.
- 35 La respuesta inmunitaria puede ser protectora.
- 40 También tal como se describe, se proporciona un péptido según la divulgación para su uso en, o como, una vacuna.
- El término "inmunogénico", cuando se aplica al péptido o a la composición de la presente divulgación, significa capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un cuerpo humano o animal.
- 45 El término "aislado", cuando se aplica al péptido o complejo de la presente divulgación, significa un péptido o complejo: (i) codificado por ácidos nucleicos usando métodos de ADN recombinante; o (ii); sintetizado, por ejemplo, por métodos de síntesis química; o (iii) separado de materiales biológicos que se producen de manera natural, y luego purificado usando procedimientos analíticos de proteínas; o (iv) asociado con restos químicos (por ejemplo, péptidos, hidratos de carbono, ácidos grasos y similares) distintos de los asociados con el péptido antigénico en su estado que se produce
- 50 de manera natural; o (v) que no se producen en la naturaleza. Un péptido o complejo aislado de la divulgación incluye un péptido o complejo expresado a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o complejo, o a partir de un vector recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o complejo.
- El término "protector" significa la prevención de una enfermedad, un riesgo reducido de infección, progresión y/o transmisión de la enfermedad, gravedad reducida de la enfermedad, una cura de un estado o enfermedad, un alivio de los síntomas o una reducción de la gravedad de una enfermedad o de los síntomas de la enfermedad.
- 55 El término "profilaxis" significa la prevención de o el tratamiento protector para una enfermedad. La profilaxis puede incluir un riesgo reducido de infección, progresión y/o de transmisión de la enfermedad, o reducción de la gravedad de la enfermedad.
- 60 El término "tratamiento" significa una cura de un estado o enfermedad, un alivio de los síntomas o una reducción de la gravedad de una enfermedad o de los síntomas de la enfermedad.
- 65 El experto en la técnica entenderá que características opcionales de una realización o aspecto de la divulgación pueden ser aplicables, cuando sea apropiado, a otras realizaciones o aspectos de la divulgación.

Las realizaciones de la divulgación se describirán ahora con más detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos.

5 La figura 1 muestra que el péptido LNPSVAATL se une a HLA-Cw*0102. La línea celular positiva para HLA-Cw*0102 L721.174 se incubó con concentraciones crecientes del péptido LNPSVAATL o un péptido de control VAPWNSLSL. Se tiñeron las células para superficie celular de MHC de clase I y se analizaron por citometría de flujo. Se representó gráficamente la intensidad de fluorescencia media de la superficie celular de MHC de clase I contra la concentración de péptido.

10 La figura 2 muestra que LNPSVAATL se reconoce por células NK positivas para KIR2DS2 y conduce a la activación de células NK (desgranulación de CD107a) y a la destrucción de células diana que expresan HLA-Cw*010. A. Se incubaron las células en presencia o ausencia de péptidos, y luego se cultivaron con células NK de un donante positivo para KIR2DS2 o negativo para KIR2DS2. Se midió el nivel de expresión de CD107a (LAMP) en células NK positivas para el anticuerpo CH-L. Este anticuerpo se une a KIR2DS2, KIR2DL2 y KIR2DL3. B. Datos de resumen de 5 donantes positivos para KIR2DS2 y 6 donantes negativos para KIR2DS2 sometidos a prueba según el panel A de la figura 2. Para comparar los diferentes donantes, se normalizaron los datos al 100% para la condición sin péptidos.

20 La figura 3 muestra que clones de células NK positivas para KIR2DS2 destruyen células diana que expresan HLA-Cw*0102 y el péptido LNPSVAATL. Se incubaron células L721.174 en presencia o ausencia de los péptidos VAPWNSFAL y el LNPSVAATL. Entonces se marcaron las células con el colorante naranja rastreador celular, y luego se cultivaron con clones de células NK positivas para KIR2DS2 (clones 4, 6, 9) o un clon de células NK negativas para KIR2DS2 (clon 27). Entonces se determinó la citotoxicidad usando tinción de rojo lejano fijable Live/Dead®.

25 La figura 4 muestra que KIR2DS2 se une a HLA-C*0102 y al péptido LNPSVAATL. A. Se expresó la proteína KIR2DS2 con una etiqueta C-terminal de biotilación. Tras la biotilación con la enzima BirA, la proteína KIR2DS2 se incubó con estreptavidina-ficoeritrina para formar tetrámeros de KIR2DS2 fluorescentes (KIR2DS2-PE). Se incubaron entonces células L721.174 con los péptidos indicados. Entonces se tiñeron las células con KIR2DS2-PE y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de histograma. Los números en negrita representan la intensidad de tinción fluorescente media de la tinción de KIR2DS2-PE de las células en presencia de péptido y los números sin negrita la tinción en ausencia de péptido. B. Representa las intensidades fluorescentes de error estándar y media del experimento en "A" después de experimentos replicados.

35 La figura 5 muestra que KIR2DS2 reconoce péptidos con motivos XXXXXXXAAL y XXXXXXXATL. A. Se incubaron las células L721.174 con los péptidos indicados. Entonces se tiñeron las células con KIR2DS2-PE (véase la figura 4) y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de histograma. Los números en negrita representan la intensidad de tinción fluorescente media de la tinción de KIR2DS2-PE de las células en presencia de péptido y los números sin negrita la tinción en ausencia de péptido. B. Representa las intensidades fluorescentes de error estándar y media del experimento en "A" después de experimentos replicados.

40 Figura 6. LNPSVAATL activa células NK que expresan KIR2DS2. A. Se incubaron células L721.174 con los péptidos indicados. Entonces se incubaron las células con la línea celular NK transfectada con KIR2DS2. Se lisaron las células y entonces se inmunoprecipitó el KIR2DS2 a partir de la mezcla usando el anticuerpo GL183 acoplado a perlas de proteína G. Se analizó el inmunoprecipitado por inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo frente a fosfotirosina. Entonces se separó la membrana y volvió a estudiarse con sonda con un anticuerpo frente a DAP12, la molécula que transduce una señal positiva a partir de KIR2DS2. Se muestran las regiones en las inmunotransferencias en el nivel de DAP12 (12-15 kDa). B. Se incubaron células L721.174 con los péptidos indicados. Entonces se incubaron las células con la línea celular NK transfectada con KIR2DS2 o transfectada con KIR2DL2. Se lisaron las células en NP-40 al 1% y luego se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos frente a pVav1 y luego tras la separación de la membrana frente a Vav1. Se muestran inmunotransferencias de tipo Western alrededor de la región de 98 kDa, y por debajo de las mismas las densitometrías correspondientes para 3 experimentos independientes.

55 Figura 7. Se incubaron 1×10^6 células L721.221-HLA-C*0304-ICP47 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 20 μ M. Se incubaron entonces las células con la línea celular NKL transfectada con KIR2DS2 o transfectada con KIR2DL2 durante 5 minutos. Se lisaron las células en NP-40 al 1% y luego se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos frente a pVav1 y luego tras la separación de la membrana frente a Vav1. Se muestran inmunotransferencias de tipo Western alrededor de la región de 98 kDa, y por debajo de las mismas las densitometrías correspondientes para 2 experimentos independientes.

60 Figura 8. La línea celular 721.221 negativa para MHC de clase I se transfectó con un constructo que expresaba HLA-C*0102:T2A:E19/3K:LNPSVAATL. Se lavaron las células y luego se eluyeron los péptidos que se unían a HLA-C usando ácido acético al 10%. Se analizó el eluato por HPLC usando una columna C18 y un gradiente de acetonitrilo del 4-60%. El perfil resultante se comparó con el perfil del péptido LNPSVAATL solo. El pico de elución del péptido está indicado con una flecha.

65

La figura 9 muestra la tinción de tetrámero de KIR2DS2 en 174 células con y sin los péptidos. Se muestra la comparación de tinción con las células no teñidas, MFI de las células teñidas (indicada por *).

Ejemplo 1 - KIR2DS1 y sus ligandos de HLA-C del grupo 1 proporcionan protección contra la infección crónica por virus de la hepatitis C (VHC).

La tabla 1 muestra un análisis de regresión logística del desenlace de la infección por VHC y su asociación con KIR y HLA en 272 individuos expuestos a VHC. 180 individuos tenían infección crónica y 92 eliminaron la infección. Una razón de probabilidades (OR) >1 indica protección contra la infección crónica por VHC. (HLA-C*0102 es uno de los alelos de HLA-C del grupo 1).

Tabla 1: KIR2DS1 y sus ligandos de HLA-C del grupo 1 proporcionan protección contra la infección crónica por virus de la hepatitis C (VHC).

	P	OR	IC del 95%
KIR2DL3:HLA-C1C1	0,006	2,56	1,31-5,02
KIR2DS3	0,027	0,50	0,28-0,92
KIR2DS2:HLA-C del grupo 1	0,033	1,83	1,05-3,19
KIR3DS1:HLA-Bw4	0,076	1,83	0,94-3,55
KIR2DS1:HLA-C2	0,176	0,60	0,29-1,25

Ejemplo 2 - El péptido LNPSVAATL se une a HLA-Cw*0102

Con referencia a la figura 1, la línea celular positiva para HLA-Cw*0102 L721.174 se incubó con concentraciones crecientes del péptido LNPSVAATL o un péptido de control VAPWNSLSL (que se sabe que se une a HLA-Cw*0102) durante la noche a 26°C. Se usaron 3x10⁵ células por condición. Tras el lavado en PBS, se tiñeron las células para superficie celular de MHC de clase I y se analizaron por citometría de flujo. Se representó gráficamente la intensidad de fluorescencia media de la superficie celular de MHC de clase I contra la concentración de péptido.

Ejemplo 3 - LNPSVAATL se reconoce por células NK positivas para KIR2DS2 y conduce a activación de células NK (desgranulación de CD107a) y a la destrucción de células diana que expresan HLA-Cw*0102.

Con referencia a la figura 2A, se incubaron 3x10⁵ células L721.174 a 26°C durante la noche en presencia o ausencia de péptidos, y luego se cultivaron durante cuatro horas con células NK de un donante o bien positivo para KIR2DS2 o bien negativo para KIR2DS2. Se midió el nivel de expresión de CD107a (LAMP) en células NK positivas para el anticuerpo CH-L. Este anticuerpo se une a KIR2DS2, KIR2DL2 y KIR2DL3. Las células NK de ambos donantes tienen niveles más bajos de desgranulación cuando se exponen al péptido VAP-FA (VAPWNSFAL) en comparación con ningún péptido. Las células NK de los donantes positivos para KIR2DS2 tienen niveles más altos de desgranulación cuando se exponen al péptido LNPSVAATL en comparación con ningún péptido. Las células NK de los donantes positivos para KIR2DS2 tienen niveles más altos de desgranulación cuando se exponen al péptido VAPWNSFAL y al péptido LNPSVAATL en combinación en comparación con el péptido VAPWNSFAL solo. Con referencia a la figura 2B, se sometieron a prueba datos de resumen de 5 donantes positivos para KIR2DS2 y 6 negativos para KIR2DS2 según el panel A de la figura 2. Para comparar los diferentes donantes, se normalizan los datos al 100% para la condición sin péptidos.

Ejemplo 4 - Clones de células NK positivas para KIR2DS2 destruyen células diana que expresan HLA-Cw*0102 y el péptido LNPSVAATL

Con referencia a la figura 3, se incubaron 3x10⁵ células L721.174 a 26°C durante la noche en presencia o ausencia de los péptidos VAPWNSFAL y el LNPSVAATL. Entonces se marcaron las células con el colorante naranja rastreador celular, y luego se cultivaron durante cuatro horas con clones de células NK positivas para KIR2DS2 (clones 4, 6, 9) o un clon de células NK negativas para KIR2DS2 (clon 27). Entonces se determinó la citotoxicidad usando tinción de rojo lejano fijable Live/Dead®. Solo los clones 4, 6, 9 destruyeron la línea celular L721.174 en mayor medida en presencia del péptido LNPSVAATL en comparación con ningún péptido o el péptido VAPWNSFAL.

Ejemplo 5 - KIR2DS2 se une a HLA-C*0102 y al péptido LNPSVAATL

Con referencia a la figura 4A, la proteína KIR2DS2 se expresó como una proteína recombinante con una etiqueta C-terminal de biotilación. Tras la biotilación con la enzima BirA, la proteína KIR2DS2 se incubó con estreptavidina-ficoeritrina para formar tetrámeros de KIR2DS2 fluorescentes (KIR2DS2-PE). Entonces se incubaron 3x10⁵ células L721.174 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 200 µM. Entonces se tiñeron las células con KIR2DS2-PE y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de histograma. Los números en negrita representan la intensidad de tinción fluorescente media de la tinción de KIR2DS2-PE de las células en presencia de péptido y los números sin negrita la tinción en ausencia de péptido. Con referencia a la figura 4B, el panel B representa las intensidades fluorescentes medias y de error estándar del experimento en "A" después de los

experimentos replicados.

Ejemplo 6 - KIR2DS2 reconoce péptidos con motivos XXXXXXXAAL y XXXXXXXATL

5 Con referencia a la figura 5A, se incubaron 3×10^5 células L721.174 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 200 μM . Entonces se tiñeron las células con KIR2DS2-PE (véase la figura 4) y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de histograma. Los números en negrita representan la intensidad de tinción fluorescente media de la tinción de KIR2DS2-PE de las células en presencia de péptido y los números sin negrita la tinción en ausencia de péptido. Con referencia a la figura 5B, el panel B representa las intensidades fluorescentes medias y de error estándar del experimento en "A" después de los experimentos replicados.

Ejemplo 7 - LNPSVAATL activa células NK que expresan KIR2DS2.

15 Con referencia a la figura 6A, se incubaron 1×10^6 células L721.174 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 20 μM . Entonces se incubaron las células con la línea celular NK transfectada con KIR2DS2 durante 5 minutos. Se lisaron las células en tampón digitonina al 1% y el KIR2DS2 se inmunoprecipitó entonces a partir de la mezcla usando el anticuerpo GL183 acoplado a perlas de proteína G. Se analizó el inmunoprecipitado por inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo frente a fosfotirosina. Entonces se separó la membrana y volvió a estudiarse con sonda con un anticuerpo frente a DAP12, la molécula que transduce una señal positiva a partir de KIR2DS2. Se muestran regiones en las inmunotransferencias en el nivel de DAP12 (12-15 kDa). El péptido LNPSVAATL induce la fosforilación de DAP12. Con referencia a la figura 6B, se incubaron 1×10^6 células L721.174 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 20 μM . Entonces se incubaron las células con la línea celular NK transfectada con KIR2DS2 o transfectada con KIR2DL2 durante 5 minutos. Se lisaron las células en NP-40 al 1% y luego se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos frente a pVav1 y luego tras la separación de la membrana frente a Vav1. Se muestran inmunotransferencias de tipo Western alrededor de la región de 98 kDa, y por debajo de las mismas las densitometrías correspondientes para 3 experimentos independientes.

Ejemplo 8 - KIR2DS2 se activa mediante el péptido GAVPDLAWL y GAVPDLATL

30 Con referencia a la figura 7, se incubaron 1×10^6 células HLA-C*0304:ICP47:721.221 durante la noche a 26°C con los péptidos indicados a una concentración de 20 μM . Entonces se incubaron las células con la línea celular NK transfectada con KIR2DS2 durante 5 minutos. Se lisaron las células en NP-40 al 1% y luego se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos frente a pVav1 y luego tras la separación de la membrana frente a Vav1. Se muestran inmunotransferencias de tipo Western alrededor de la región de 98 kDa, y debajo de las mismas las densitometrías correspondientes para 3 experimentos independientes.

Ejemplo 9

40 La figura 8 muestra el perfil de elución del péptido en un constructo de HLA-C:T2A:E19/3K:péptido (figura 8). La línea celular 721.221 que expresa HLA-C*0102:T2A:E19/3K:LNPSVAATL. Tras la elución de los péptidos de unión a HLA-C usando ácido acético al 10%, se analizaron los péptidos mediante HPLC usando una columna C18 y un gradiente de acetonitrilo. En comparación con el péptido LNPSVAATL de control, se observa un pico en el eluato de péptido que corresponde al tiempo de retención del péptido LNPSVAATL, lo que indica que se procesa y se presenta de manera endógena y que se trata de un constructo de vacuna adecuado.

Bibliografía

- 50 1. Khakoo SI, *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305(5685):872-4.
2. Martin MP, *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31(4):429-34.
- 55 3. Deshpande A, Wheeler CM, Hunt WC, Peyton CL, White PS, Valdez YE, Nolan JP. Variation in HLA class I antigen-processing genes and susceptibility to human papillomavirus type 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*. 2008;197(3):371-81.
- 60 4. Carrington M, *et al.* Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005;201(7):1069-75.
5. Hirayasu K, *et al.* Significant Association of KIR2DL3-HLA-C1 Combination with Cerebral Malaria and Implications for Co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002565.
- 65 6. Lopez-Vazquez A, *et al.* Protective Effect of the HLA-Bw4I80 Epitope and the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 3DS1 Gene against the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection.

- J Infect Dis. 2005;192(1):162-5.
7. Pan N, *et al.* KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: a case-control study. PLoS ONE. 2011;6(10):e25682.
8. Hiby SE, *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. J Clin Invest. 2010;120(11):4102-10.
9. Marcus A, Raulet DH. Evidence for natural killer cell memory. Curr Biol. 2013;23(17):R817-20.
10. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. Nature. 2009;457(7229):557-61.
11. Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. Nature Immunology. 2011;13(6):500-8.
12. Beziat V, *et al.* CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. Eur J Immunol. 2012;42(2):447-57.
13. Beziat V, *et al.* NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. Blood. 2013;121(14):2678-88.
14. Bjorkstrom NK, *et al.* Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. J Exp Med. 2011;208(1):13-21.
15. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Beziat V, Debre P, Leroy EM, Vieillard V. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. PLoS Pathog. 2011;7(9):e1002268.
16. Alter G, Jost S, Rihn S, Reyor LL, Nolan BE, Ghebremichael M, Bosch R, Altfeld M, Lauer GM. Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+ and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. J Hepatol. 2010.
17. Alter G, Rihn S, Walter K, Nolting A, Martin M, Rosenberg ES, Miller JS, Carrington M, Altfeld M. HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol. 2009;83(13):6798-805.
18. Malnati MS, Peruzzi M, Parker KC, Biddison WE, Ciccone E, Moretta A, Long EO. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. Science. 1995;267(5200):1016-8.
19. Fadda L, *et al.* Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(22):10160-5.
20. Cheent KS, Jamil KM, Cassidy S, Liu M, Mbiribindi B, Mulder A, Claas FH, Purbhoo MA, Khakoo SI. Synergistic inhibition of natural killer cells by the non-signaling molecule CD94. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(42):16981-6.
21. Croft NP, Smith SA, Wong YC, Tan CT, Dudek NL, Flesch IE, Lin LC, Tschärke DC, Purcell AW. Kinetics of antigen expression and epitope presentation during virus infection. PLoS Pathog. 2013;9(1):e1003129.
22. Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. Frontiers in immunology. 2012;3:336.
23. Korner C, Altfeld M. Role of KIR3DS1 in human diseases. Frontiers in immunology. 2012;3:326.
24. David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, Gagne K, Cesbron A, Retiere C. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 specificity of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. J Immunol. 2013;191(9):4778-88.
25. Knapp S, *et al.* Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. Hepatology. 2010;51(4):1168-75. (Khakoo Senior Author)
26. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999;50(3-4):213-9.
27. Gatfield J, *et al.* Cell lines transfected with the TAP inhibitor ICP47 allow testing peptide binding to a variety of HLA class I molecules. Int Immunol. 1998;10(11):1665-72.
28. Seidel SA, *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging

- conditions. *Methods*. 2013;59(3):301-15.
29. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications*. 2010;1:100.
- 5 30. Suppiah V, *et al*. IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study. *PLoS Med*. 2011;8(9):e1001092.
- 10 31. Borhis G, Ahmed PS, Mbiribindi B, Naiyer MM, Davis DM, Purbhoo MA, Khakoo SI. A Peptide Antagonist Disrupts NK Cell Inhibitory Synapse Formation. *J Immunol*. 2013.
32. Stewart CA, *et al*. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(37):13224-9.
- 15 33. Harrison RJ, Ettore A, Little AM, Khakoo SI. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):306-14.
34. Anton LC, Yewdell JW, Bennink JR. MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J Immunol*. 1997;158(6):2535-42.
- 20 35. Liberatore C, Capanni M, Albi N, Volpi I, Urbani E, Ruggeri L, Mencarelli A, Grignani F, Velardi A. Natural killer cell-mediated lysis of autologous cells modified by gene therapy. *J Exp Med*. 1999;189(12):1855-62.
- 25 36. Minskaia E, Ryan MD. Protein coexpression using FMDV 2A: effect of "linker" residues. *BioMed research international*. 2013;2013:291730.
37. Tomasello E, *et al*. Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem*. 1998;273(51):34115-9.
- 30 38. Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, Sun R, Yokoyama WM, Tian Z. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1444-56.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo que comprende una molécula de HLA-C de MHC clase I y un péptido capaz de activar la inmunidad mediada por células NK, comprendiendo o consistiendo el péptido en la secuencia de aminoácidos $X^nAX^2X^1$,
en la que
 X^n es una secuencia de aminoácidos de entre 5 y 12 residuos, y
10 X^1 es cualquier aminoácido; o leucina o isoleucina; y
 X^2 es alanina, treonina, triptófano o serina.
- 15 2. Complejo según la reivindicación 1, en el que la HLA-C es una HLA-C del grupo 1.
3. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula de HLA-C de MHC clase I es HLA-Cw*0102 o HLA-C*304.
- 20 4. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula de HLA-C de MHC de clase I es una molécula de HLA-C de MHC de clase I que está truncada en la región de tallo del dominio $\alpha 3$.
5. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el complejo comprende una proteína de fusión de la molécula de HLA-C de MHC de clase I y el péptido.
- 25 6. Vesícula que comprende el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un péptido capaz de activar la inmunidad mediada por células NK y una secuencia que codifica una molécula de HLA-C de MHC de clase I, en el que el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos $X^nAX^2X^1$,
30 en la que
 X^n es una secuencia de aminoácidos de entre 5 y 12 residuos, y
35 X^1 es cualquier aminoácido; o leucina o isoleucina; y
 X^2 es alanina, treonina, triptófano o serina.
- 40 8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico es un vector de plásmido para vacunación.
9. Virus que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7 o la reivindicación 8.
- 45 10. Célula dendrítica que expresa, o capaz de expresar, el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
11. Composición inmunogénica que comprende uno o más de:
50 - el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- la vesícula según la reivindicación 6;
- la célula dendrítica según la reivindicación 10;
55 - el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8; y
- el virus según la reivindicación 9.
- 60 12. Agente para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o infección seleccionada del grupo que consiste en infección viral, cáncer, malaria, lepra y TB,
en el que el agente comprende o consiste en;
65 - la composición inmunogénica según la reivindicación 11;
- el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; o

- la vesícula según la reivindicación 6; o
 - la célula dendrítica según la reivindicación 10; o
 - el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8; o
 - el virus según la reivindicación 9.
- 5
- 10 13. Agente para el uso según la reivindicación 12, en el que el uso comprende determinar si un paciente produce células NK que expresan KIR2DS2 o un ligando para KIR2DS2;
- 15 en el que si el paciente produce células NK que expresan KIR2DS2 o un ligando para KIR2DS2, administrar el agente.
14. Composición inmunogénica según la reivindicación 11; complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; vesícula según la reivindicación 6; célula dendrítica según la reivindicación 10; ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8; o virus según la reivindicación 9; para su uso como vacuna.

Figura 1

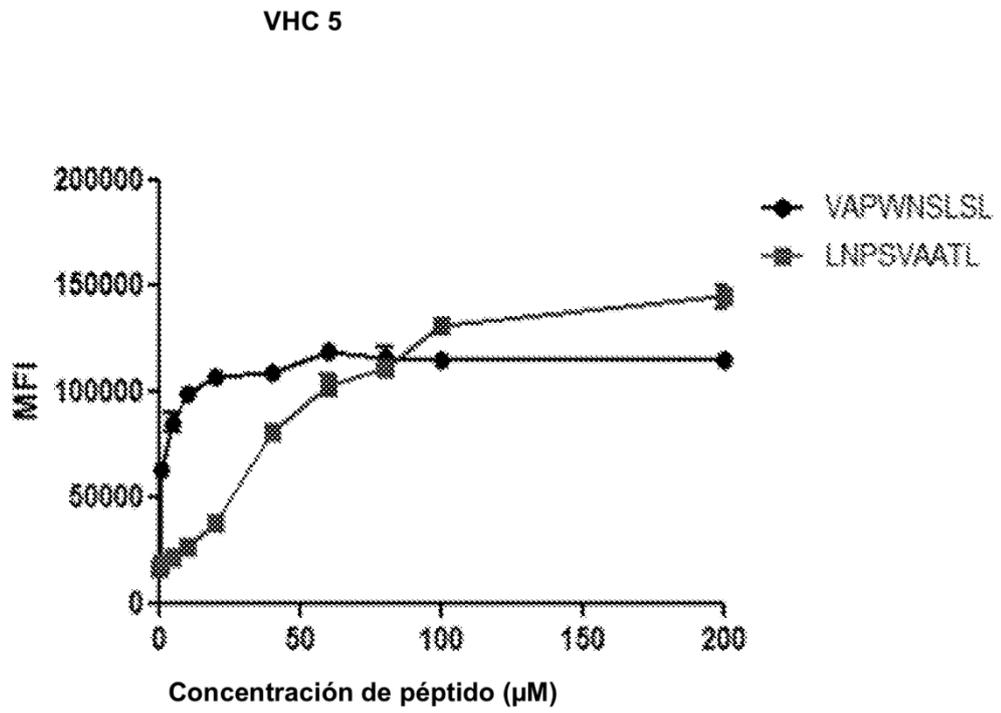
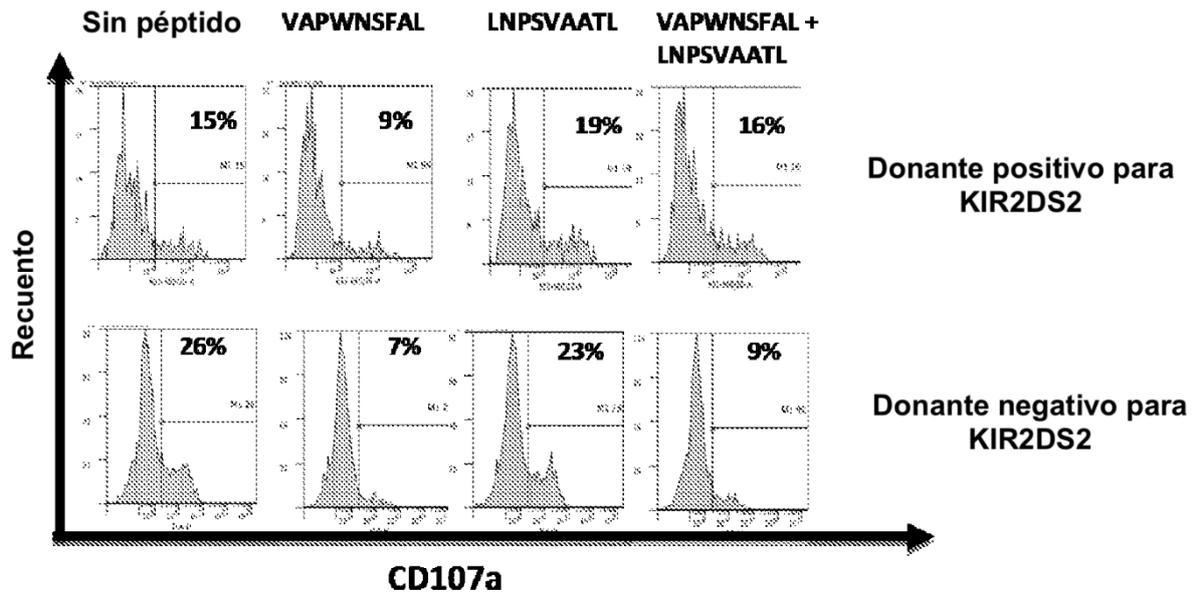


Figura 2

A



B

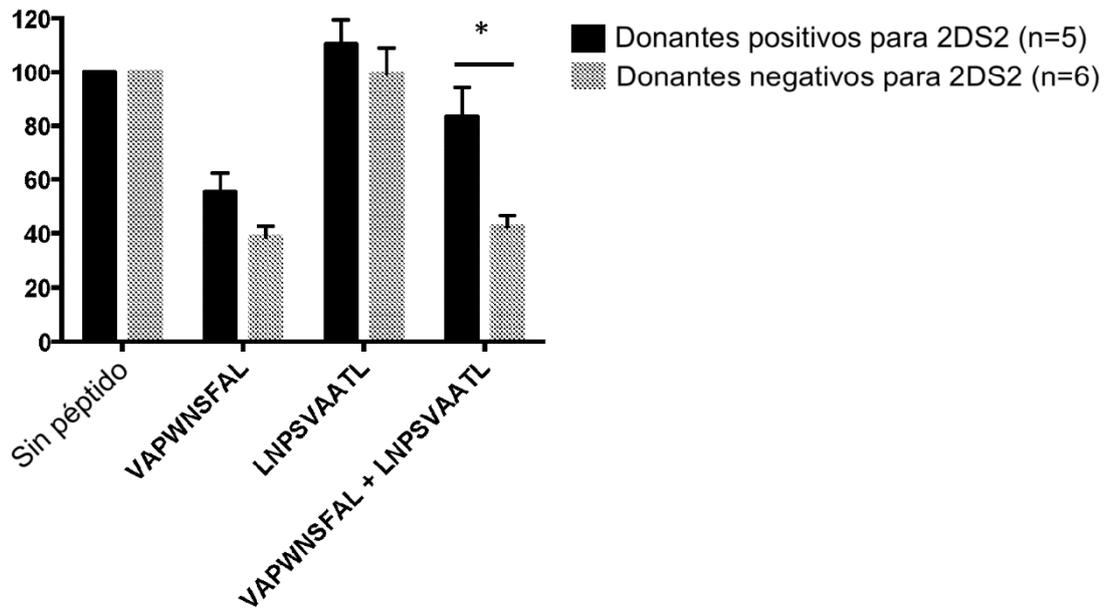


Figura 3

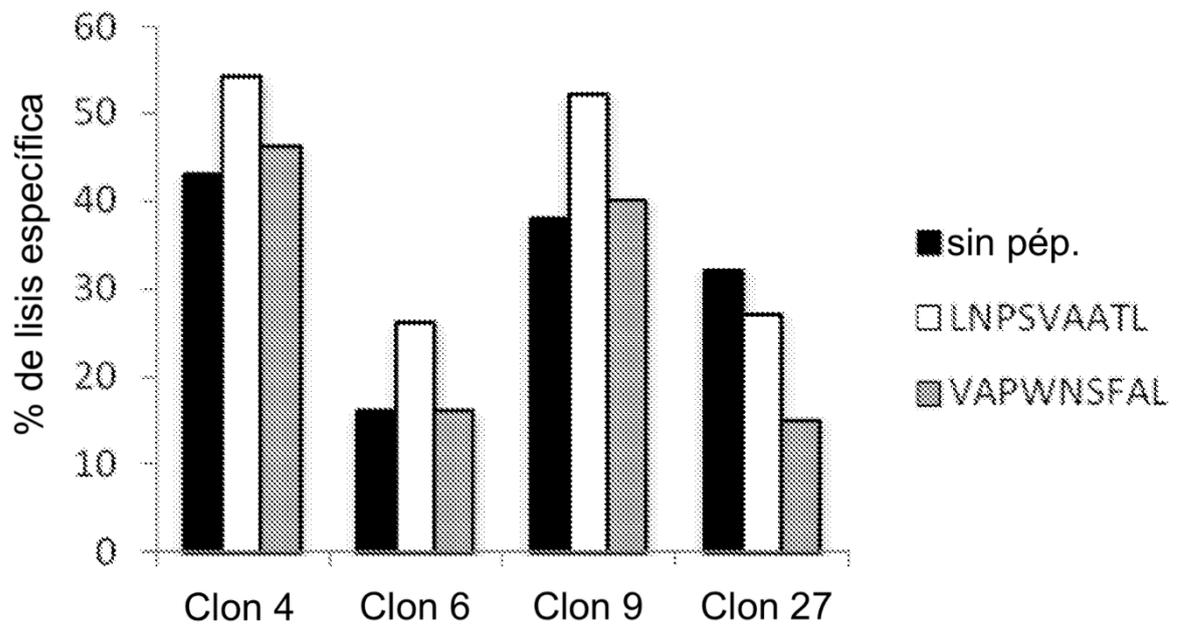


Figura 4

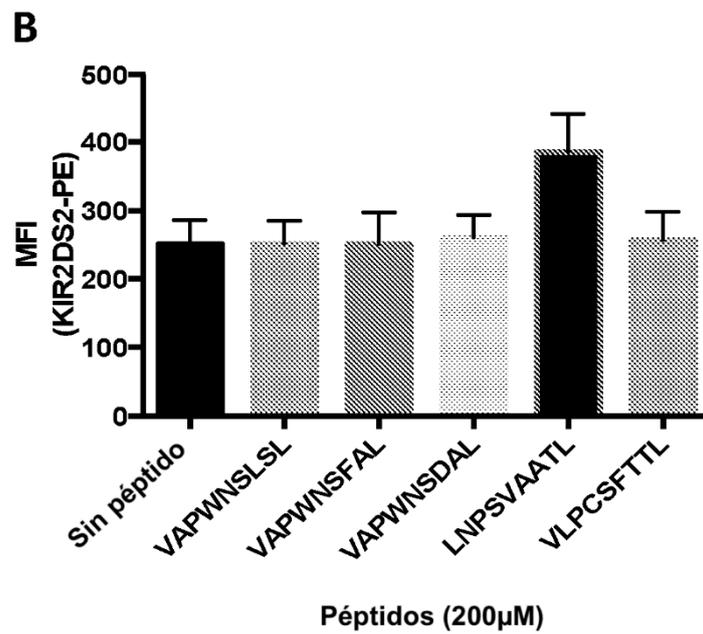
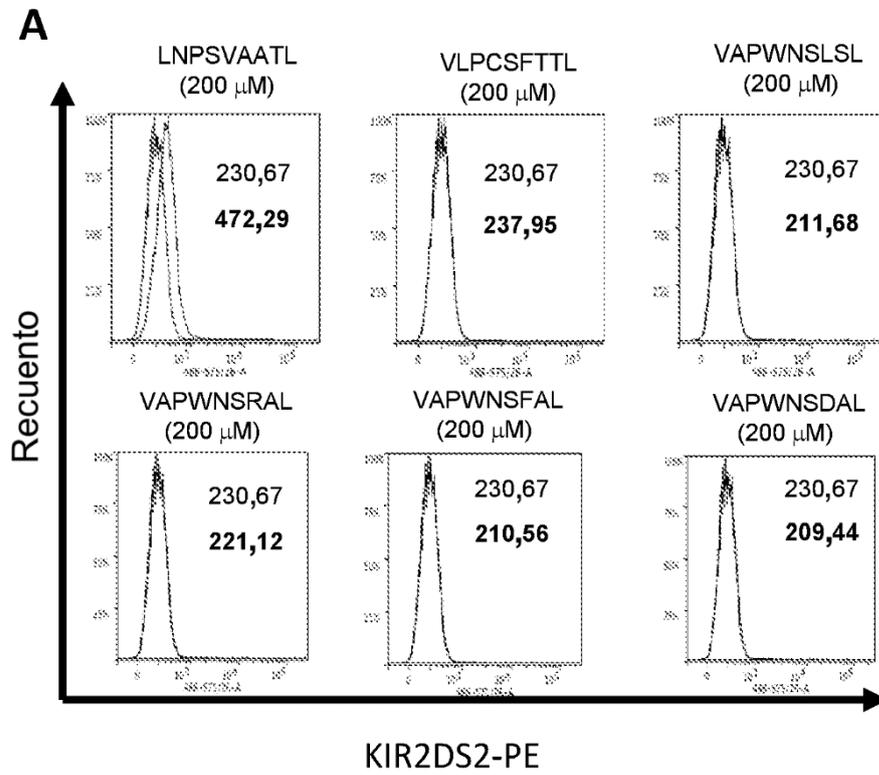


Figura 5

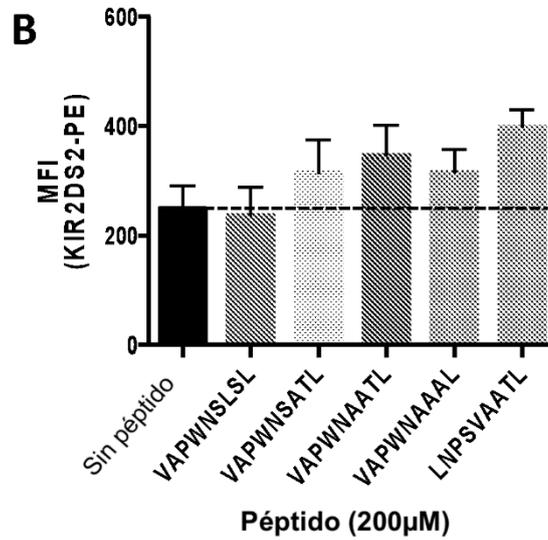
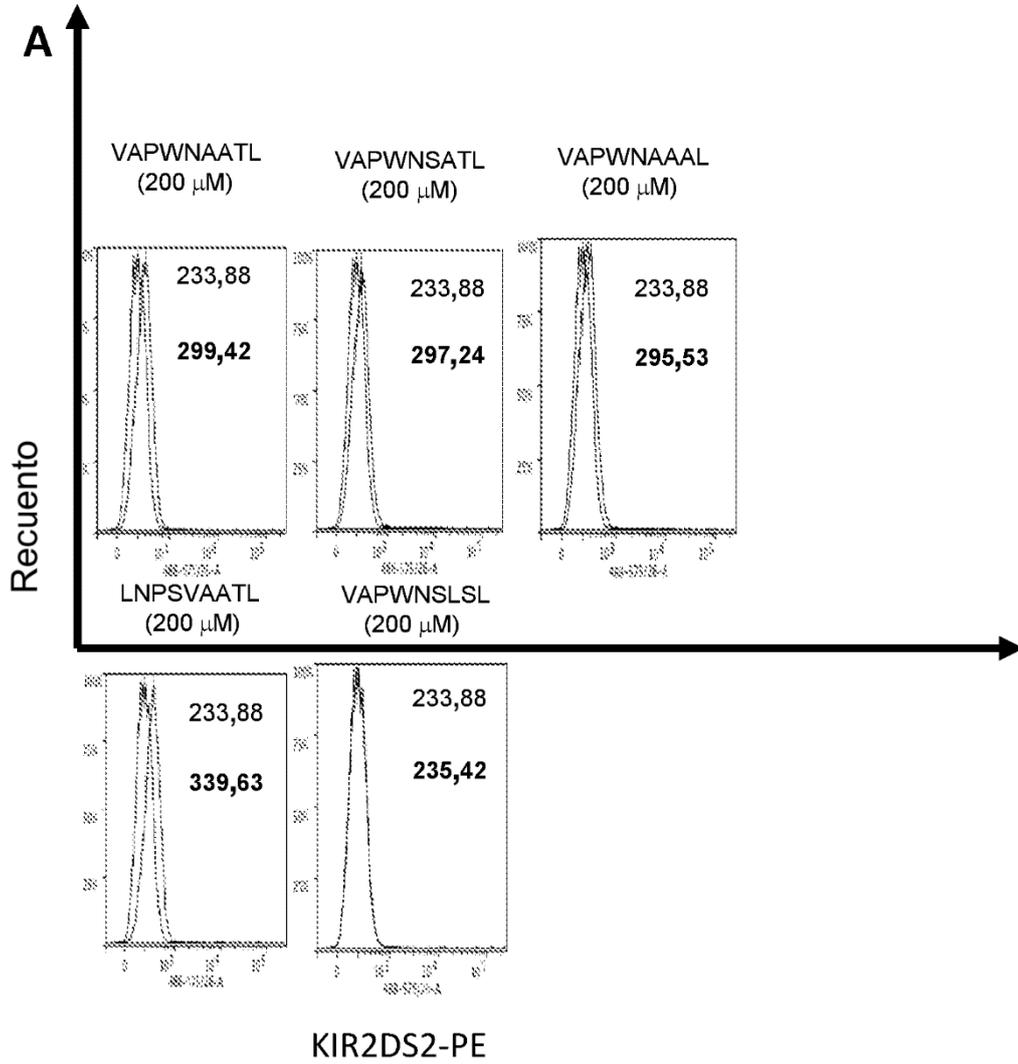


Figura 6

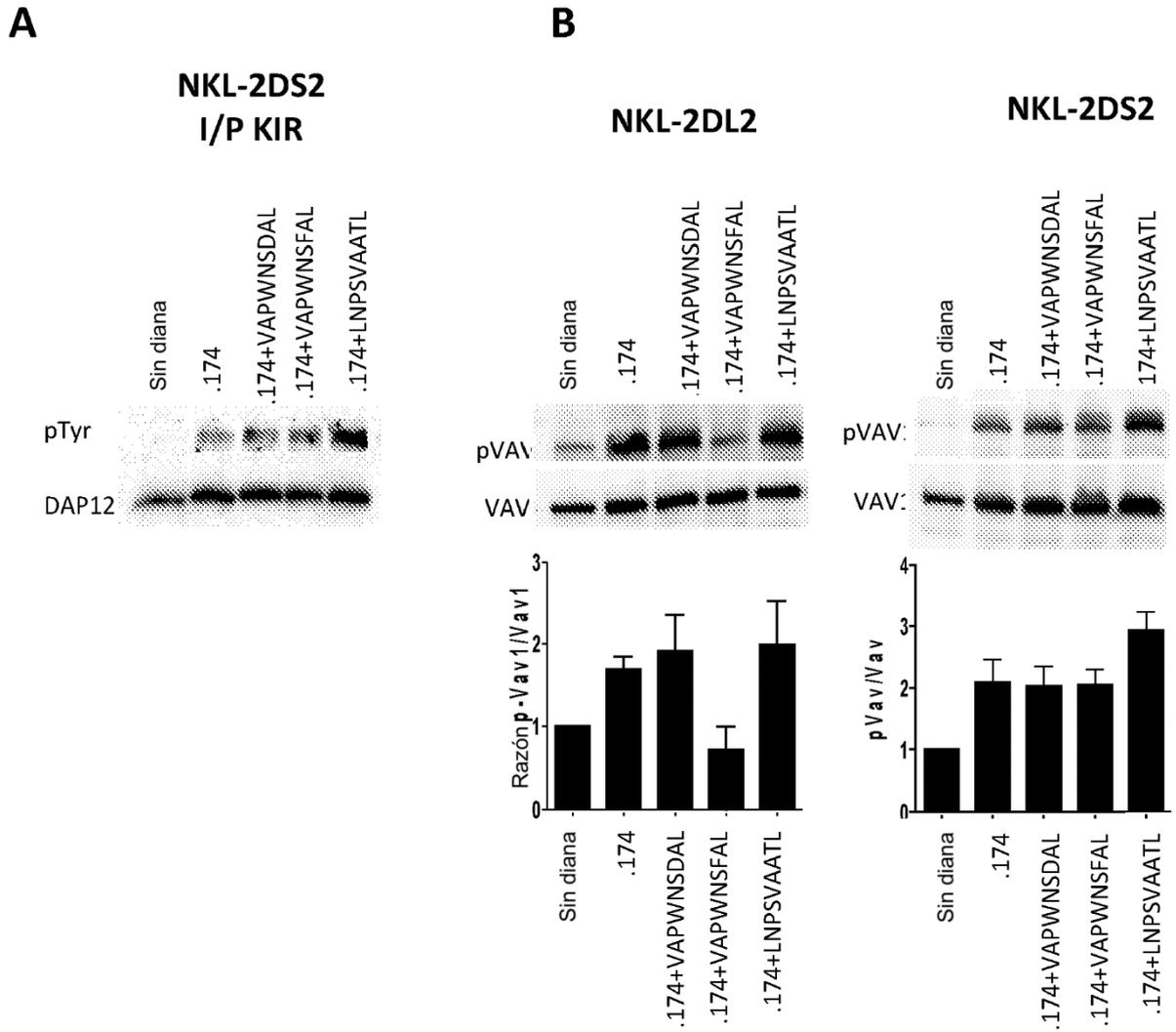


Figura 7

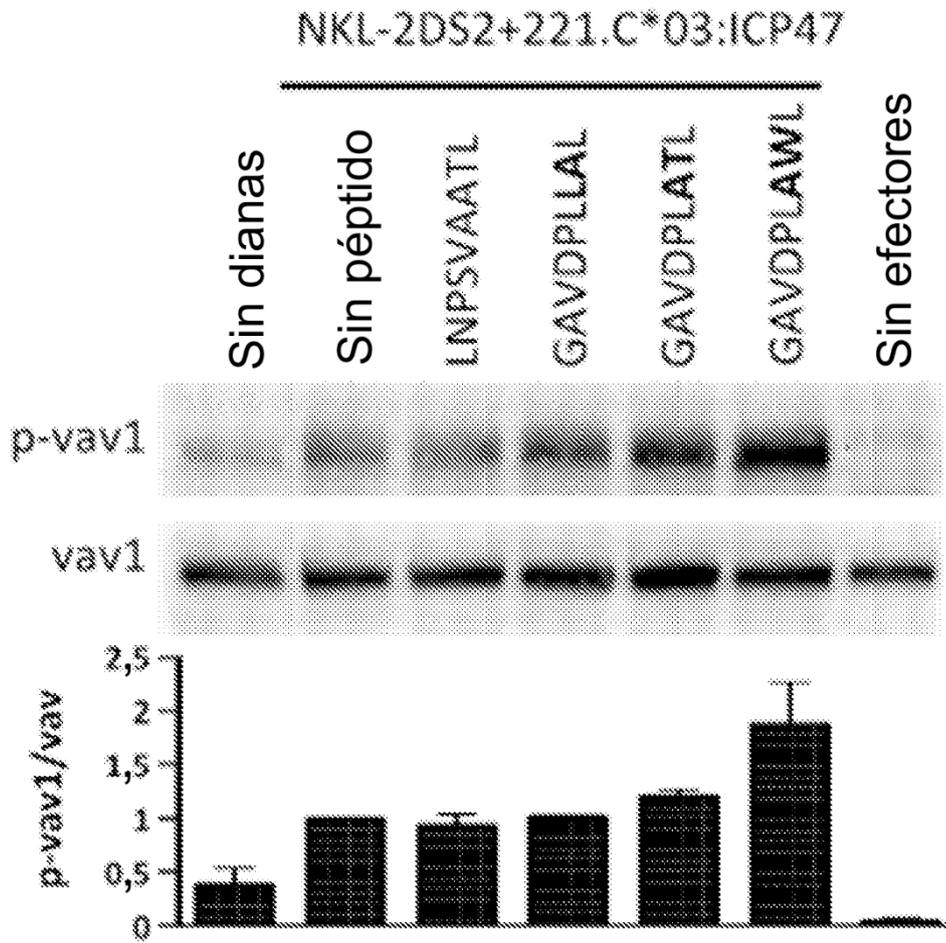


Figura 8

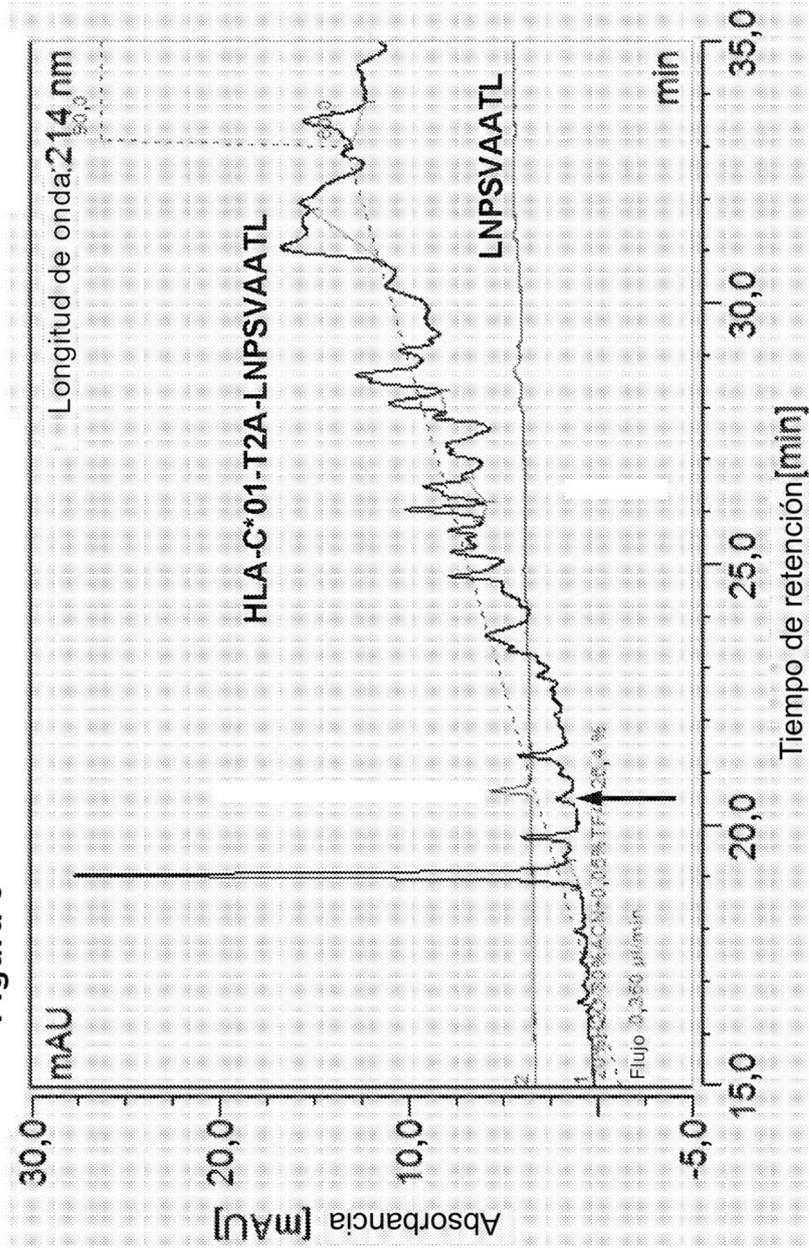


Figura 9

