



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 814**

51 Int. Cl.:
C12N 5/02 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03712887 .3**
96 Fecha de presentación : **25.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1496109**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Proceso para producir linfocitos citotóxicos.**

30 Prioridad: **25.03.2002 JP 2002-84414**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2011

73 Titular/es: **TAKARA BIO Inc.**
4-1, Seta 3-chome
Otsu-shi, Shiga 520-2193, JP

72 Inventor/es: **Sagawa, Hiroaki;**
Ideno, Mitsuko y
Kato, Ikunoshin

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 356 814 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

Proceso para producir linfocitos citotóxicos.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un método para preparar un linfocito citotóxico, que es útil en el campo médico.

Antecedentes técnicos

10

Un cuerpo vivo está protegido de sustancias exógenas principalmente por una respuesta inmune, y se ha establecido un sistema inmunitario por varias células y los factores solubles producidos por ellas. Entre ellas, los leucocitos, en especial los linfocitos, desempeñan un papel clave. Los linfocitos se clasifican en dos tipos principales, linfocito B (al que se puede denominar de aquí en adelante como célula B) y linfocito T (al que se puede denominar de aquí en adelante como célula T), ambos reconocen de forma específica un antígeno y actúan sobre el antígeno para proteger el cuerpo vivo.

15

Las células T se subclasifican en células T cooperadoras que tienen el marcador CD (grupo de diferenciación)⁴ (de aquí en adelante denominadas T_H), principalmente implicadas en asistir en la producción de anticuerpos e inducción de varias respuestas inmunitarias, y células T citotóxicas que tienen el marcador CD8 (T_C: linfocito T citotóxico, también denominada célula T citolítica y que se puede denominar de aquí en adelante como CTL), que muestran principalmente una actividad citotóxica. El CTL, que desempeña el papel más importante en reconocer, destruir y eliminar células tumorales, células infectadas por virus o similares, no produce un anticuerpo que reaccione específicamente con un antígeno, como en la célula B, pero directamente reconoce y actúa sobre antígenos (péptidos antigénicos) de una célula diana que se asocia con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad [MHC, que también se puede denominar como antígeno de leucocito humano (HLA) en seres humanos] de clase I que existen en la superficie de la membrana de la célula diana. En este punto, el receptor de la célula T (de aquí en adelante denominado TCR) que existe en la superficie de la membrana de las CTL específicamente reconoce los péptidos antigénicos anteriormente mencionados y las moléculas de MHC de clase I, y determina si el péptido antigénico deriva de sí mismo o es extraño. La célula diana que se ha determinado que es extraña específicamente se destruye y elimina después por CTL.

20

En los últimos años, se ha reconsiderado una terapia que causaría una carga física más pesada en un paciente, tal como farmacoterapia o radioterapia, y ha aumentado el interés en una inmunoterapia con una carga física más ligera en un paciente. En especial, se ha remarcado la eficacia de la inmunoterapia adoptiva en la se inducen *in vitro* CTL capaces de específicamente reaccionar con un antígeno de interés a partir de linfocitos derivados de un ser humano que tiene función inmunitaria normal, o se expande el linfocito sin inducción, y después se transfiere a un paciente. Por ejemplo, se ha sugerido que la inmunoterapia adoptiva en un modelo animal es una terapia eficaz para infección por virus y tumores [escrito por Greenberg, P. D., *Advances in Immunology*, publicado en 1992; Reusser P., *et al.*, *Blood*, **78(5)**, 1373-1380 (1991)]. En esta terapia, es importante mantener o aumentar el número de células en un estado en el que se mantenga o aumente la actividad citotóxica específica de antígeno del CTL.

25

30

En la inmunoterapia adoptiva como se describe anteriormente, es necesario administrar linfocitos citotóxicos en el número de células de una cantidad determinada o mayor para obtener un efecto terapéutico. En otras palabras, se puede decir que es un problema principal obtener el número anterior de células *in vitro* en un corto periodo de tiempo.

35

Para mantener y aumentar una actividad citotóxica específica de antígeno de CTL, en general se ha empleado un método de estimulación repetida con un antígeno de interés cuando se induce una respuesta específica a un antígeno para CTL. Sin embargo, en este método el número de CTL finalmente obtenidos normalmente puede disminuir, de modo que no se puede obtener un número suficiente de células.

40

Como método para preparar células T que sea eficaz para el tratamiento de una enfermedad, se conoce, por ejemplo, inmunoterapia adoptiva que usa linfocitos infiltrantes en tumor (TIL) inducidos con IL-2 a una concentración alta [*N. Engl. J. Med.*, **316**, 1310-1321 (1986); Rosenberg S. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **319(25)**, 1676-1680 (1988); Ho M. *et al.*, *Blood*, **81(8)**, 2093-2101 (1993)].

45

A continuación, respecto a la preparación del CTL específico de antígeno, se ha descrito un método para aislar y expandir un clon de CTL específico de CMV usando fibroblastos infectados con auto-CMV e IL-2 [Riddell S. A. *et al.*, *J. Immunol.*, **146(8)**, 2795-2804 (1991)] o usando un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAc anti-CD3) e IL-2 [Riddell S. A. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **128(2)**, 189-201 (1990)].

50

Además, el documento WO 96/06929 divulga un método REM (método de expansión rápida). Este método REM es un método para expandir una población primaria de células T que contiene CTL específicas de antígeno y T_H en un corto periodo de tiempo. En otras palabras, este método se caracteriza en que se puede suministrar una gran cantidad de células T mediante proliferación de clones individuales de células T y en que el número de CTL específicas de antígeno aumenta usando un anticuerpo anti-CD3, IL-2 y PBMC (células mononucleares de sangre periférica) hechas deficientes en la capacidad de proliferación mediante irradiación, y células infectadas con virus de Epstein-Barr (de aquí en adelante simplemente denominadas células infectadas con EBV).

55

60

65

Además, el documento WO 97/32970 divulga un método REM modificado, en donde el método es un método que usa como célula alimentadora una cepa de células de mamífero indiferenciadas que expresa un componente que estimula células T que es distinguible de PMBC para reducir la cantidad de PMBC usadas.

5 La célula citotóxica activada por linfoquinas (célula LAK) es una población de células funcionales que tiene actividad citotóxica, que se obtiene añadiendo IL-2 a sangre periférica (leucocitos de sangre periférica), sangre de cordón umbilical, líquido tisular o similares que contiene linfocitos, y cultivando las células *in vitro* durante varios días. Durante el cultivo, la proliferación de células LAK se acelera además añadiendo un anticuerpo anti-CD3 a las mismas y cultivando las células. La célula LAK obtenida de esta manera tiene una actividad citotóxica no específica hacia varias
10 células cancerosas y otras dianas. La célula LAK también se usa en la inmunoterapia adoptiva de la misma manera que el CTL mencionado anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, la utilización de IL-2 es esencial en el paso de obtener un linfocito citotóxico, por ejemplo, CTL, célula LAK, TIL o similar. La célula se activa adicionalmente por unión de IL-2 al receptor de interleuquina-2 (IL-2R) en la superficie de una célula. Además, se conoce IL-2R como un marcador de activación
15 para un linfocito. Desde estos puntos de vista, es importante mejorar la expresión de IL-2R en la superficie celular. Además, en la inducción de CTL, es importante mejorar una eficacia para inducir una célula precursora de CTL sometida a estimulación por un antígeno como CTL, es decir, mejorar una proporción (relación) de la célula CD8 positiva en un grupo de células después de la inducción.

20 La fibronectina es una glicoproteína gigantesca que tiene un peso molecular de 250 mil, que existe en la sangre animal, en la superficie de células cultivadas o en la matriz extracelular de un tejido, y se sabe que tiene varias funciones. Una estructura de dominios de la misma se divide en siete partes (de aquí en adelante referido a la figura 1), en donde tres tipos de secuencias similares están contenidas en una secuencia de aminoácidos de la misma, las repeticiones de cada una de estas secuencias constituyen la secuencia entera. Los tres tipos de secuencias similares se denominan tipo I, tipo II y tipo III. Entre ellas, el tipo III está constituida por de 71 a 96 residuos de aminoácidos, en donde la relación de coincidencia de estos residuos de aminoácidos es del 17 al 40%. En la fibronectina, hay catorce secuencias de tipo III, entre las cuales la secuencia 8^a, 9^a o 10^a (cada una se denomina de aquí en adelante III-8, III-9 o III-10) está contenida en un dominio de unión a células, y la secuencia 12^a, 13^a o 14^a (cada una se
30 denomina de aquí en adelante III-12, III-13 o III-14) está contenida en un dominio de unión a heparina. Además, una región a unión a VLA (antígeno de activación muy tardía)-5 está contenida en III-10 y su secuencia núcleo es RGDS. Además, existe una región denominada IIICS en el lado C-terminal del dominio de unión a heparina. Una región denominada CS-1 que consiste en 25 aminoácidos y que tiene una actividad de unión a VLA-4 existe en III-CS (Deane F. Momer, *FIBRONECTIN*, ACADEMIC PRESS INC., 1-8 (1988); Kimizuka F. *et al.*, *J. Biochem.* **110**, 284-291 (1991); Hanenberg H. *et al.*, *Human Gene Therapy* **8**, 2193-2206 (1997)). Por último, Mizobata S. *et al.*, *British Journal of Cancer*, **74**, 1598-1604, (1996) describe el uso de linfocitos citotóxicos tratados con fibronectina en inmunoterapia adoptiva.

Divulgación de la invención

40 La invención proporciona un método para preparar un linfocito citotóxico que tiene una actividad citotóxica a alto nivel, que se usa de forma adecuada en el campo médico.

En concreto, la invención se refiere a:

- 45 [1] un método para preparar un linfocito citotóxico o una preparación de linfocitos citotóxicos en donde dicho método comprende el paso de llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12,
- 50 [3] el método según el anterior [1], en donde el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 está inmovilizada en una fase sólida,
- 55 [3] el método según el anterior [2], en donde la fase sólida es un equipo de cultivo celular o un soporte de cultivo de células,
- [4] un método según el anterior [3], en donde el equipo de cultivo celular es una placa de Petri, una botella o una bolsa, y el soporte de cultivo de células es bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio,
- 60 [5] el método según los anteriores [1] o [2], en donde se lleva a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en un medio que contiene el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12,
- 65 [6] el método según el anterior [1], que comprende llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 en un equipo de cultivo celular que contiene un medio, en donde el método satisface cualquiera de las condiciones de:

ES 2 356 814 T3

(a) una relación del número de células al inicio del cultivo respecto a un área de cultivo en el equipo de cultivo celular que es de 1 célula/cm² a 5 x 10⁵ células/cm²; y

(b) una concentración de células en un medio al inicio del cultivo que es de 1 célula/ml a 5 x 10⁵ células/ml,

[7] el método según el anterior [6], en donde el método excluye un paso de dilución o un paso de intercambiar el equipo de cultivo celular,

[8] el método según los anteriores [1] a [7], que comprende además el paso de transducir un gen exógeno en un linfocito citotóxico,

[9] el método según el anterior [8], en donde el gen exógeno se transduce usando retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus simio,

[10] un método *in vitro* para aumentar la expresión del receptor de interleuquina-2 de una célula, para mejorar la relación de células CD-8 positivas en una población de linfocitos citotóxicos o para mejorar o mantener la actividad citotóxica en un linfocito citotóxico caracterizado en que el método comprende el paso de llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una vista esquemática que muestra una estructura de dominios de fibronectina.

Mejor manera para llevar a cabo la invención

Los descubrimientos divulgados aquí han completado que en el linfocito citotóxico preparado en presencia de fibronectina y/o un fragmento de la misma, se mantiene una alta actividad citotóxica, el nivel de expresión de IL-2R aumenta significativamente y la relación de células CD8 positivas mejora.

Dicho sea de paso, la preparación de un linfocito citotóxico como se usa aquí se refiere a un paso que abarca cada uno de los pasos de inducción (activación), mantenimiento y expansión de la célula, o los pasos combinados de los mismos. La preparación de un linfocito citotóxico como se divulga aquí también se denomina cultivo de un linfocito citotóxico.

La invención se explicará específicamente a continuación.

(1) *Fibronectina y fragmento de la misma usados aquí*

La fibronectina y un fragmento de la misma como se menciona aquí pueden ser los obtenidos de la naturaleza o los que se sintetizan de forma artificial. La fibronectina y un fragmento de la misma se pueden preparar en una forma sustancialmente pura a partir de una sustancia de origen natural, en base a la divulgación de Ruoslahti E. *et al.* [*J. Biol. Chem.*, **256**(14), 7277-7281 (1981)]. El término “fibronectina o fragmento de fibronectina sustancialmente pura” como se cita aquí significa que estas fibronectina y fragmento de fibronectina no contienen sustancialmente otras proteínas y similares que existen junto a fibronectina en la naturaleza. Cada uno de los anteriormente mencionados fibronectina y fragmento de la misma se pueden usar aquí solos o en mezcla de tipos plurales.

La información útil respecto a los fragmentos de fibronectina que se puede usar aquí y la preparación de los fragmentos se puede obtener de Kimiduka F., *et al.* [*J. Biochem.*, **110**, 284-291 (1991)], Kornbriht A. R. *et al.* [*EMBO J.*, **4**(7), 1755-1759 (1985)], Sekiguchi K., *et al.* [*Biochemistry*, **25**(17), 4936-4941 (1986)], y similares.

El fragmento de fibronectina descrito aquí se ejemplifica mediante, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos cualquiera de las regiones de III-8 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1),

III-9 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2),

III-10 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3),

III-12 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4),

III-13 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5),

III-14 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6),

y CS-1 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7) (véase la figura 1).

ES 2 356 814 T3

Además, como el fragmento, se puede usar preferiblemente un fragmento que tenga actividad de adhesión a células y/o una actividad de unión a heparina. La actividad de adhesión a células se puede evaluar ensayando la unión del fragmento (su dominio de unión a células) usado aquí a una célula usando un método conocido. Por ejemplo, el método mencionado anteriormente incluye un método de Williams D. A., *et al.* [*Nature*, **352**, 438-441 (1991)]. El método es un método de determinar la unión de una célula a un fragmento inmovilizado en una placa de cultivo. Además, se puede evaluar la actividad de unión a heparina ensayando la unión del fragmento (su dominio de unión a heparina) usado aquí a heparina usando un método conocido. Por ejemplo, se puede evaluar la unión del fragmento a heparina de la misma manera, usando heparina, por ejemplo, una heparina marcada en lugar de la célula en el método anteriormente mencionado de Williams D. A. y col.

Además, el fragmento de fibronectina se ejemplifica mediante un polipéptido seleccionado de

C-274 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8),

H-271 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9),

H-296 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10),

CH-271 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11),

CH-296 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12) o

C-CS1 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13).

Cada uno de los fragmentos mencionados anteriormente CH-271, CH-296, C-274 y C-CS1 es un polipéptido que tiene un dominio de unión a células con actividad de unión a VLA-5. Además, C-CS1, H-296 o CH-296 es un polipéptido que tiene un dominio de unión a células con actividad de unión a VLA-4. Además, H-271, H-296, CH-271 o CH-296 es un polipéptido que tiene un dominio de unión a heparina.

También se puede usar un fragmento en el que cada uno de los dominios anteriores está modificado. El dominio de unión a heparina de la fibronectina está constituido por tres secuencias de tipo III (III-12, III-13 y III-14). También se puede usar aquí un fragmento que contiene un dominio de unión a heparina que tiene una delección de una o dos de las secuencias de tipo III. Por ejemplo, los fragmentos se puede ejemplificar mediante

CHV-89 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14),

CHV-90 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15) o

CHV-92 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16),

que es un fragmento en el que están unidos un sitio de unión a células de la fibronectina (dominio de unión a VLA-5: Pro1239 a Ser1515) y una de las secuencias de tipo III, o CHV-179 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17) o CHV-181 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18), que es un fragmento en el que están unidos el sitio de unión a células de la fibronectina y dos de las secuencias de tipo III. CHV-89, CHV-90 y CHV-92 contienen III-13, III-14 y III-12, respectivamente, y CHV-179 contiene III-13 y III-14, y CHV-181 contiene III-12 y III-13, respectivamente.

Además, se puede usar aquí un fragmento que tiene la adición de un aminoácido adicional a cada uno de los fragmentos mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede preparar el fragmento añadiendo un aminoácido deseado a cada uno de los fragmentos mencionados anteriormente según el método para preparar H-275-Cys descrito en los ejemplos de preparación explicado posteriormente. Por ejemplo, H-275-Cys (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19) es un fragmento que tiene un dominio de unión a heparina de la fibronectina y un residuo de cisteína en C-terminal.

El fragmento descrito aquí puede ser esos que comprenden un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que constituye un fragmento que contiene al menos parcialmente una secuencia de aminoácidos de la fibronectina natural ejemplificada anteriormente, en donde el polipéptido tiene una función equivalente al fragmento, siempre que se obtengan los efectos deseados como se describen aquí.

Es preferible que la sustitución o similar de los aminoácidos se lleve a cabo a un grado que pueda cambiar las características fisicoquímicas y similares de un polipéptido inherente en el intervalo que se puede mantener la función del polipéptido. Por ejemplo, la sustitución o similar de aminoácidos es conservadora, en el intervalo que las características que posee inherentemente el polipéptido (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga eléctrica, pK y similares) no cambian sustancialmente. Por ejemplo, la sustitución de los aminoácidos es sustituciones dentro de cada uno de los grupos de: 1) glicina, alanina; 2) valina, isoleucina, leucina; 3) ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; 4) serina, treonina; 5) lisina, arginina; 6) fenilalanina, tirosina. La delección, adición o inserción de

ES 2 356 814 T3

aminoácidos es delección, adición o inserción en los aminoácidos que tienen características similares a las características de los alrededores del sitio sujeto en el polipéptido dentro del intervalo que las características de los alrededores del sitio sujeto no cambian sustancialmente.

5 Además, la frase “que tiene una función equivalente” se refiere a que tiene al menos cualquiera de las funciones de (i) una función de mantener una actividad citotóxica de un linfocito citotóxico, (ii) una función de aumentar un nivel de expresión de IL-2R o (iii) una función de mejorar una relación de células CD8 positivas. Si el fragmento que comprende un polipéptido que tiene sustitución o similar de aminoácidos tiene esas funciones o no se puede confirmar de forma apropiada según el método descrito en los ejemplos como se explica posteriormente. Además, como el
10 fragmento que comprende un polipéptido que tiene una sustitución o similar de aminoácidos, se prefiere el fragmento que tiene actividad de adhesión a células y/o una actividad de unión a heparina. La actividad de adhesión a células y la actividad de unión a heparina se pueden evaluar según los métodos anteriormente mencionados para determinar esas actividades.

15 Como el fragmento que comprende un polipéptido que tiene una sustitución o similar de aminoácidos, por ejemplo, también se puede usar aquí un fragmento que tiene uno o más aminoácidos insertados como un enlazador entre dos dominios diferentes.

20 Por cierto, como la fibronectina por sí, de forma similar, se puede usar aquí un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos que constituye el polipéptido de la fibronectina, en donde el polipéptido tiene al menos cualquiera de las funciones de los anteriormente mencionados (i) a (iii).

25 El fragmento de fibronectina como se cita aquí también se puede preparar a partir de un recombinante genético basado en la descripción de, por ejemplo, la patente de EE UU No. 5.198.423. Por ejemplo, se describen en detalle cada uno de los fragmentos de H-271 (SEQ ID NO: 9), H-296 (SEQ ID NO: 10), CH-271 (SEQ ID NO: 11) y CH-296 (SEQ ID NO: 12) y un método de preparar estos fragmentos en la especificación de esta patente. Además, el fragmento mencionado anteriormente C-274 (SEQ ID NO: 8) se puede obtener según el método descrito en la patente de EE UU No. 5.102.988. Además, se puede obtener un fragmento C-CS1 (SEQ ID NO: 13) según el método
30 descrito en el boletín de patente japonesa No. 3104178. Se puede obtener cada uno de los fragmentos CHV-89 (SEQ ID NO: 14), CHV-90 (SEQ ID NO: 15) o CHV-179 (SEQ ID NO: 17) según el método descrito en el boletín de patente japonesa No. 2729712. Además, se puede obtener el fragmento CHV-181 (SEQ ID NO: 18) según el método descrito en el documento WO 97/18318. Se puede obtener el fragmento CHV-92 (SEQ ID NO: 16) mediante técnica de manipulación genética usando un plásmido construido de una manera normal basado en el plásmido descrito en esta bibliografía con referencia al boletín de patente japonesa No. 2729712 y WO 97/18318.
35

Se pueden preparar estos fragmentos o fragmentos que pueden derivar de estos fragmentos de una manera normal usando microorganismos depositados en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Avanzada, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal 305-8566) con los siguientes números de acceso, o modificando un plásmido que lleva cada microorganismo según un método conocido.

FERM BP-2264 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica H-271, fecha de depósito: 30 de enero, 1989);

45 FERM BP-2800 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica CH-296, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);

FERM BP-2799 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica H-271, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);

50 FERM BP-7420 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica H-296, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);

FERM BP-1915 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica C-274, fecha de depósito: 17 de junio, 1988);

55 FERM BP-5723 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica C-CS1, fecha de depósito: 5 de marzo, 1990);

FERM P-12182 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica CHV-89, fecha de depósito: 8 de abril, 1991)

y

60 FERM P-12183 (*Escherichia coli* que lleva un plásmido que codifica CHV-179, fecha de depósito: 8 de abril, 1991).

Puesto que la fibronectina es una glicoproteína gigantesca, no es necesariamente fácil preparar y usar una proteína natural para el propósito industrial y para el propósito de la preparación del medicamento. Además, la fibronectina existe en una gran cantidad en plasma en un cuerpo vivo. Por tanto, cuando se usa una fibronectina obtenida de plasma como preparación sanguínea, hay un riesgo de contaminación de componentes diferentes de la fibronectina, de modo
65 que se considera que hay un problema desde el aspecto de la seguridad. Además, puesto que la fibronectina es una proteína multifuncional, se pueden considerar ciertas desventajas producidas por una región diferente de la región que muestra el efecto por el método descrito aquí dependiendo de las circunstancias de su uso. Por estas razones, se

ES 2 356 814 T3

puede usar preferiblemente aquí un fragmento de fibronectina, más preferiblemente se puede usar un fragmento de fibronectina recombinante obtenido como se ha descrito anteriormente desde los puntos de vista de disponibilidad, manejo fácil y seguridad. Además, se puede usar en especial preferiblemente un fragmento de fibronectina que puede mostrar un efecto tal como mejora en una relación de expansión de un linfocito, aumento en un nivel de expresión de IL-2R en un linfocito expandido o mejora en una relación de células CD8 positivas en una población expandida de linfocitos como se describe posteriormente. Además, el peso molecular del fragmento de fibronectina descrito aquí es, pero no está particularmente limitado a, preferiblemente de 1 a 200 kD, más preferiblemente de 5 a 190 kD, incluso más preferiblemente de 10 a 180 kD.

(2) Método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico

El método descrito aquí para preparar el linfocito citotóxico se explicará concretamente a continuación. El método descrito aquí es un método para preparar linfocitos citotóxicos que comprende el paso de llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de la fibronectina mencionada anteriormente, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.

El "linfocito citotóxico" como se usa aquí significa un grupo de células que contienen un linfocito citotóxico. En un sentido estricto, se puede denominar linfocito citotóxico solo a un linfocito citotóxico contenido en el grupo de células mencionado anteriormente en algunos casos. Además, la preparación del linfocito citotóxico como se describe aquí abarca cualquiera de inducción a partir de una célula precursora que puede formar el linfocito como se describe aquí a un linfocito que tiene una actividad citotóxica, mantenimiento del linfocito citotóxico y expansión del linfocito citotóxico usando el linfocito citotóxico y/o la célula precursora.

El linfocito citotóxico descrito aquí incluye, pero no está particularmente limitado a, por ejemplo, célula T citotóxica (CTL), célula citolítica activada por linfoquinas (LAK), linfocito infiltrante en tumores (TIL), célula NK y similares, cada uno tiene una actividad citotóxica específica de antígeno.

La célula precursora descrita aquí que se puede transformar en un linfocito citotóxico, es decir, la célula precursora que tiene la capacidad de diferenciarse al linfocito, se ejemplifica por PBMC, célula NK, célula indiferenciada, célula de memoria, célula troncal hematopoyética, célula mononuclear de sangre de cordón umbilical y similar. Además, siempre que la célula sea un hemocito, la célula se puede usar aquí como célula precursora. Cualquiera de estas células que se recogen de un cuerpo vivo se pueden usar directamente o se pueden usar las que se someten a almacenamiento congelado. Por cierto, en el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico, se puede usar un material que contenga las células mencionadas anteriormente, por ejemplo, sangre tal como sangre periférica o sangre de cordón umbilical; uno obtenido eliminando componentes tales como eritrocitos y plasma de la sangre, un líquido medular y similares.

Una de las características principales del método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención reside en que el linfocito citotóxico se prepara en presencia de un ingrediente eficaz seleccionado de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.

En el método descrito aquí, la inducción, mantenimiento y/o expansión del linfocito citotóxico normalmente se realiza en un medio que contiene componentes determinados en presencia del ingrediente eficaz anteriormente mencionado.

Por ejemplo, en el método descrito aquí cuando se pretende la inducción o expansión del linfocito citotóxico, el número de células (linfocitos citotóxicos y/o células precursoras) al inicio del cultivo usado aquí no está particularmente limitado. Por ejemplo, el número es preferiblemente de 1 a 1×10^8 células/ml. Además, las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas, y se pueden emplear condiciones normales para cultivo de células. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en condiciones de 37°C en presencia de CO₂ al 5% y similares. Además, el medio se puede intercambiar con medio reciente a intervalos apropiados.

El medio usado en el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico no está particularmente limitado, y se puede usar un medio conocido preparado mezclando componentes necesarios para el mantenimiento y crecimiento un linfocito citotóxico o su célula precursora. Por ejemplo, se puede usar medio comercialmente disponible. Estos medios pueden contener proteínas apropiadas, citoquinas y otros componentes además de los constituyentes inherentes. Preferiblemente, aquí se usa un medio que contiene IL-2. La concentración de IL-2 en el medio es, pero no está particularmente limitada a, por ejemplo, preferiblemente de 0,01 a 1×10^5 U/ml, más preferiblemente de 0,1 a 1×10^4 U/ml.

Además, se puede cocultivar una célula precursora que puede formar un linfocito citotóxico en un medio que contiene además un anticuerpo anti-CD3. La concentración del anticuerpo anti-CD3 en el medio es, pero no está particularmente limitada a, por ejemplo, preferiblemente desde 0,01 a 100 µg/ml. El anticuerpo anti-CD3 se puede añadir con el propósito de activar un receptor en un linfocito. Además de lo anterior, también se puede añadir un factor estimulante de linfocitos tal como lecitina. La concentración del componente en un medio no está particularmente limitada, siempre se que puedan obtener los efectos deseados.

ES 2 356 814 T3

Además de la coexistencia de estos componentes disolviendo los componentes en un medio, se pueden usar mediante inmovilización a una fase sólida apropiada, por ejemplo, un equipo de cultivo celular (incluyendo cualquiera de los de sistema abierto y sistema cerrado), tal como una placa de petri, una botella o una bolsa, o a un soporte de cultivo celular tal como bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio. Los materiales para esas fases sólidas no están particularmente limitados siempre que los materiales se puedan usar para cultivo de células. Cuando los componentes se inmovilizan en, por ejemplo, el equipo anteriormente mencionado, es preferible inmovilizar una cantidad determinada de cada componente respecto a la cantidad del medio a colocar en el equipo de modo que el medio tenga una proporción similar a una concentración deseada del caso en que los componentes se usan disolviendo los componentes en un medio después de colocar el medio en el equipo. La cantidad de los componentes inmovilizados no está particularmente limitada, siempre que se puedan obtener los efectos deseados. El soporte mencionado anteriormente se usa sumergiendo el soporte en un medio de cultivo en el equipo de cultivo celular durante el cultivo de células. Cuando los componentes anteriormente mencionados se inmovilizan en el soporte anteriormente mencionado, es preferible inmovilizar una cantidad determinada de cada componente respecto a la cantidad de medio a ser colocada en el equipo de modo que el medio tenga una proporción similar a una concentración deseada del caso donde los componentes se usan disolviendo los componentes en un medio tras colocar el soporte en el medio. La cantidad de los componentes inmovilizados no está particularmente limitada, siempre que se puedan obtener los efectos deseados.

En ambos casos, la inmovilización de los componentes anteriormente mencionados se puede llevar a cabo mediante un método conocido, por ejemplo, un método para inmovilizar un fragmento de fibronectina explicado posteriormente.

Además, se puede usar junto con los componentes mencionados anteriormente un compuesto seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos ácidos, oligosacáridos ácidos, monosacáridos ácidos y sales de los mismos que son eficaces para la inducción de una célula T citotóxica que tiene actividad citotóxica específica de antígeno, descrita en el documento WO 02/14481, o una sustancia seleccionada de los siguientes (A) a (D):

- (A) una sustancia que tiene una actividad de unión a CD44;
- (B) una sustancia capaz de regular una señal emitida por la unión de un ligando de CD44 a CD44;
- (C) una sustancia capaz de inhibir la unión de un factor de crecimiento a un receptor de factor de crecimiento; y
- (D) una sustancia capaz de regular una señal emitida por la unión de un factor de crecimiento a un receptor de factor de crecimiento.

La sustancia mencionada anteriormente que tiene una actividad de unión a CD44 se ejemplifica mediante, por ejemplo, un ligando de CD44 y/o un anticuerpo anti-CD44. La sustancia capaz de regular una señal emitida por la unión de un ligando de CD44 a CD44 incluye, por ejemplo, varios inhibidores para fosfoenzimas. La sustancia capaz de inhibir la unión de un factor de crecimiento al receptor de un factor de crecimiento incluye, por ejemplo, una sustancia que tiene actividad de unión a un factor de crecimiento y que forma un complejo con el factor de crecimiento, inhibiendo de esta manera la unión del factor de crecimiento al receptor del factor de crecimiento, o una sustancia que tiene actividad de unión a un receptor de un factor de crecimiento, inhibiendo de esta manera la unión del factor de crecimiento al receptor del factor de crecimiento. Además, la sustancia capaz de regular una señal emitida por la unión de un factor de crecimiento a un receptor del factor de crecimiento incluye, por ejemplo, varios inhibidores para fosfoenzimas. La concentración de estos componentes en el medio no está particularmente limitada, siempre que se puedan obtener los efectos deseados. Además, estos componentes se pueden usar mediante inmovilización a la fase sólida apropiada como se ha mencionado anteriormente además de la coexistencia de estos componentes en medio disolviendo los componentes en el medio.

Aquí, cada una de las varias sustancias mencionadas anteriormente se pueden usar solas o en mezcla de dos o más tipos.

La frase “en presencia del ingrediente eficaz mencionado anteriormente” se refiere al hecho de que el ingrediente eficaz esté presente en un estado en que el ingrediente eficaz anteriormente mencionado pueda mostrar su función cuando se lleva a cabo la inducción, mantenimiento y expansión del linfocito citotóxico, y la manera existente no está particularmente limitada. Por ejemplo, cuando el ingrediente eficaz está disuelto en el medio a ser usado, el contenido del ingrediente eficaz de la presente invención en el medio en el que se lleva a cabo el cocultivo no está particularmente limitado, siempre que se obtengan los efectos deseados. El contenido del ingrediente eficaz es, por ejemplo, preferiblemente desde 0,01 hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$, más preferiblemente desde 0,1 hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$, incluso más preferiblemente desde 1 hasta 100 $\mu\text{g/ml}$. Además de la coexistencia del ingrediente eficaz disolviendo el ingrediente eficaz en un medio como antes, se puede usar mediante inmovilización a una fase sólida apropiada, por ejemplo, un equipo de cultivo celular (incluyendo cualquiera de los de sistema abierto y sistema cerrado), tales como una placa de petri, una botella o una bolsa, o a un soporte de cultivo de células tal como bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio. Desde el punto de vista de administrar el linfocito citotóxico a un cuerpo vivo, se desea que el ingrediente eficaz anteriormente mencionado esté inmovilizado, pero no está particularmente limitado a ello.

ES 2 356 814 T3

Una vez que varios componentes mencionados anteriormente o el ingrediente eficaz descrito aquí se inmoviliza a la fase sólida, el linfocito citotóxico se puede separar fácilmente del ingrediente eficaz o similar después de obtener el linfocito mediante el método descrito aquí solamente separando el linfocito de la fase sólida, de modo que se pueda prevenir la contaminación del ingrediente eficaz en el linfocito.

5 Cuando el ingrediente eficaz descrito aquí se inmoviliza a, por ejemplo, el equipo anteriormente mencionado, es preferible inmovilizar una cantidad determinada de cada ingrediente eficaz respecto a la cantidad de medio a ser colocada en el equipo de modo que el medio tenga una proporción similar a una concentración deseada en un caso donde el ingrediente eficaz se usa disolviendo el ingrediente eficaz en un medio tras colocar el medio en el equipo.
10 La cantidad del ingrediente eficaz no está particularmente limitada, siempre que se obtengan los efectos deseados. Cuando el ingrediente eficaz se inmoviliza al soporte anteriormente mencionado, es preferible inmovilizar una cantidad determinada de cada ingrediente eficaz respecto a la cantidad de medio a ser colocada en un equipo de modo que el medio tenga una proporción similar a una concentración deseada en un caso donde el ingrediente eficaz se usa disolviendo el ingrediente eficaz en un medio tras colocar el soporte en el medio. La cantidad del ingrediente eficaz
15 no está particularmente limitada, siempre que se obtengan los efectos deseados.

Por ejemplo, la inmovilización del fragmento de fibronectina se puede llevar a cabo según los métodos descritos en los documentos WO 97/18318 y WO 00/09168.

20 Cuando se determina el nivel de expresión de IL-2R para el linfocito citotóxico obtenido mediante el método descrito aquí, se reconoce un aumento significativo en el nivel de expresión de IL-2R comparado con un linfocito citotóxico obtenido al llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. Aquí, se puede determinar el nivel de expresión de IL-2R por un método conocido, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-2R.

25 Como se ha descrito anteriormente, el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí tiene un nivel de expresión aumentado de IL-2R. IL-2R es un marcador de activación que se expresa en la superficie de una célula T activada, y con la expresión de esta molécula, se activa la producción de citoquinas, actividad citotóxica, activación de proliferación o similares. Por tanto, el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí es un grupo de células que tiene una función alta.
30

Además, puesto que el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí tiene un nivel de expresión aumentado de IL-2R, el linfocito citotóxico tiene una sensibilidad aumentada a estimulación por IL-2 añadida al medio, o IL-2 producida por una célula precursora de un linfocito citotóxico, un linfocito mismo u otra célula coexistente. Por esta razón, el linfocito citotóxico se puede activar a si mismo incluso en un medio de una cantidad menor de IL-2 (por ejemplo, en un cuerpo vivo o similar).
35

Además, en el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí, la relación de existencia de células (CD8 positivas) que tienen un marcador CD8 es alta comparada con la del linfocito citotóxico obtenido llevando a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. Este hecho tiene algunas ventajas, por ejemplo, 1) que la célula CD8 positiva produce una citoquina tal como interferón- γ , produciendo de esta manera activación inmunológica para cambiar un equilibrio de células T cooperadoras en el sistema dominante Th1, 2) que la célula CD8 positiva es un inmunocito celular que puede excluir de forma eficaz una sustancia exógena tal como un virus o una célula tumoral, 3) que cuando se obtiene la célula CD8 positiva, la célula CD8 positiva se puede enriquecer cultivando la célula según el método descrito aquí mientras que la célula CD8 se ha purificado convencionalmente con bolas magnéticas o un citómetro de flujo, 4) que el linfocito citotóxico se usa adecuadamente como una célula precursora durante la inducción de CTL, porque la relación de células CD8 positivas es alta; 5) que incluso una población de células que tiene una relación menor de la célula CD8 positiva se puede cultivar aumentando la relación de la célula CD8 positiva y similares. Por tanto, el método descrito aquí es muy útil en la preparación de un linfocito citotóxico.
40
45
50

Aquí, la relación de la célula CD8 positiva en el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí se puede determinar, por ejemplo, pero no particularmente limitado a, usando un anticuerpo anti-CD8.

55 Además, el linfocito citotóxico, en especial CTL, preparado según el método descrito aquí tiene una característica excelente de que no hay disminución drástica en actividad citotóxica como se había observado previamente, incluso cuando una célula después del cultivo se mantiene durante un largo periodo de tiempo, o la célula prolifera. En otras palabras, el linfocito citotóxico mantiene una alta actividad citotóxica comparado con un linfocito citotóxico obtenido llevando a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. Por tanto, se puede mantener como un linfocito que tiene una actividad citotóxica estable clonando el linfocito citotóxico cultivado. Además, el CTL inducido puede proliferar y expandirse estimulando el CTL con un antígeno, varios tipos de citoquinas o un anticuerpo anti-CD3. Se puede usar un método conocido para el mantenimiento o expansión del linfocito citotóxico sin estar particularmente limitado.
60

65 El mantenimiento del linfocito citotóxico anteriormente mencionado se refiere al mantenimiento del linfocito citotóxico manteniendo su actividad citotóxica. Las condiciones de cultivo durante el mantenimiento no están particularmente limitadas, y se pueden usar las condiciones usadas para cultivo de células normal. Por ejemplo, se pueden cultivar las células en las condiciones de 37°C y en presencia de CO₂ al 5% y similares. Además, el medio se pue-

ES 2 356 814 T3

de intercambiar por uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados. El medio a ser usado y otros componentes simultáneamente usados con el mismo y similares son iguales a los mencionados anteriormente.

Una de las características principales del mantenimiento y expansión del linfocito citotóxico en el método descrito aquí reside en que el método comprende respectivamente cultivo y expansión continuos del linfocito citotóxico en un medio en presencia del ingrediente eficaz descrito aquí, es decir, fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. Según la expansión, el número de células del linfocito citotóxico puede aumentar en un estado que se mantenga la actividad citotóxica que posee el linfocito citotóxico. En otras palabras, aquí se proporciona un método para expandir un linfocito citotóxico. En el método descrito aquí para expandir el linfocito citotóxico, las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas y se pueden usar condiciones normales usadas para cultivo de células. Por ejemplo, se pueden cultivar las células en las condiciones de 37°C y en presencia de CO₂ al 5% y similares. Además, el medio se puede intercambiar por una reciente a los intervalos de tiempo apropiados. El medio a ser usado y otros componentes simultáneamente usados con el mismo y similares son iguales a los mencionados anteriormente.

Según el método descrito aquí para la expansión, por ejemplo, en el caso de expansión de CTL, se pueden obtener CTL cuyo número de células aumenta de 100 a 1000 veces por expansión durante 14 días. Además, como ejemplo del caso de expansión de una célula LAK, se pueden obtener células LAK aumentadas en alrededor de 200 veces cultivando la célula durante 7 días, y en alrededor de 1000 veces cultivando la célula durante 9 días. Además, el linfocito citotóxico así obtenido, especialmente CTL, tiene una actividad citotóxica mayor comparado con uno obtenido por un método convencional para expandir un linfocito citotóxico, por ejemplo, un método REM o un método REM modificado. Los efectos como se han descrito anteriormente se pueden confirmar determinando la actividad citotóxica que posee el CTL o similar expandido por el método descrito aquí, según el método descrito en los ejemplos mostrados posteriormente.

Además, el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico tiene la característica de que el cultivo se puede iniciar a un número bajo de células. Se requiere una gran cantidad de linfocitos para llevar a cabo inmunoterapia adoptada, pero es difícil obtener una gran cantidad de linfocitos de un paciente. Además, en una expansión normal del linfocito citotóxico, se necesita selección de un equipo de cultivo celular que tiene un área de cultivo apropiada dependiendo del número de células a ser usadas, y cultivar en una cantidad apropiada de medio. En otras palabras, normalmente, el cultivo se inicia en condiciones de alta densidad que la cantidad (número) de células respecto de un área de cultivo en un equipo de cultivo celular [es decir, área (cm²) de un área de superficie del equipo en contacto con el medio] es 1×10^6 células/cm² o más, y la concentración de células es 1×10^6 células/ml o más. Cuando el cultivo se lleva a cabo en condiciones por debajo de este nivel celular, una relación de expansión [una relación del número de células después de la expansión respecto al número de células antes de la expansión (número de células después de la expansión/número de células antes de la expansión)] se hace muy bajo, requiriendo de esta manera un periodo de cultivo a largo plazo antes de obtener los linfocitos citotóxicos en una gran cantidad. Por tanto, en general, actualmente se preparan un gran número de linfocitos, por ejemplo, iniciando el cultivo usando un equipo de cultivo celular pequeño, y después de ello usando un equipo de cultivo de gran escala por pasos, o un método de aumentar el número de equipos de cultivo celular y repitiendo procedimientos de dilución. Como se ha descrito anteriormente, se requieren una pluralidad de sistemas de cultivo en la expansión normal del linfocito citotóxico.

Según el método descrito aquí, incluso cuando se inicia con una cantidad pequeña de células, la célula se puede cultivar con una gran relación de expansión independientemente del tamaño del equipo de cultivo celular. Por tanto, se hace innecesario un procedimiento complicado tal como un intercambio del equipo de cultivo celular y los procedimientos de dilución como se describen anteriormente. En otras palabras, según el método descrito aquí, la expansión del linfocito citotóxico se puede llevar a cabo de forma satisfactoria mediante procedimientos de cultivo que usan un equipo de cultivo celular, es decir un sistema de cultivo. Por tanto, el método como se describe aquí es un método para preparar un linfocito citotóxico que excluye el paso de dilución o el paso de intercambiar un equipo de cultivo celular. En especial, cuando se expande una célula LAK según el método descrito aquí, la célula LAK se puede expandir añadiendo una célula que puede formar una célula LAK y un medio a un equipo de cultivo celular de gran volumen, y añadiendo solo IL-2 al mismo en pasos posteriores. La invención es muy útil en el aspecto de que se puede obtener una gran cantidad de células LAK mediante un procedimiento sencillo. Aquí, el fragmento de fibronectina se puede usar preferiblemente como el ingrediente eficaz de la presente invención a ser usado desde el punto de vista de obtener una mayor relación de expansión. Como se describe anteriormente, según el método descrito aquí, se puede obtener una cantidad necesaria del linfocito citotóxico en un periodo de tiempo más corto.

Por ejemplo, cuando se inicia al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico a un número bajo de células en un equipo de cultivo celular que contiene un medio en presencia del ingrediente eficaz descrito aquí, se puede llevar a cabo la inducción, mantenimiento o expansión usando una cantidad de células que satisface las condiciones seleccionadas de las siguientes (a) y (b) al inicio del cultivo:

(a) la relación de la cantidad de células respecto al área de cultivo en el equipo de cultivo celular a ser usado es preferiblemente de 1 a 5×10^5 células/cm², más preferiblemente de 10 a 1×10^5 células/cm², en especial preferiblemente de 1×10^2 hasta 5×10^4 células/cm²; y

(b) la concentración de las células en el medio es preferiblemente de 1 hasta 5×10^5 células/ml, más preferiblemente de 10 hasta 1×10^5 células/ml, en especial preferiblemente de 1×10^2 hasta 5×10^4 células/ml.

ES 2 356 814 T3

La cantidad de células usada aquí se refiere al número de linfocitos citotóxicos y/o células precursoras.

Además, en el método descrito aquí, se puede ejemplificar un método que comprende llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en un sistema de cultivo, que excluye el paso de intercambio de un equipo de cultivo celular o el paso del procedimiento de dilución.

El método descrito aquí se explicará tomando como ejemplo la preparación de CTL.

La inducción de CTL se lleva a cabo incubando (cultivando) una célula precursora capaz de diferenciarse a CTL junto con una célula presentadora de antígeno apropiada en presencia del ingrediente eficaz mencionado anteriormente en, por ejemplo, cualquier medio, para dar al CTL una capacidad de reconocer el antígeno deseado. La célula precursora no está particularmente limitada, siempre que la célula precursora sea una célula que está en una fase antes de que la célula se transforme en CTL y destinada a diferenciarse a CTL, e incluye, por ejemplo, célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), célula indiferenciada, célula de memoria, célula mononuclear de sangre de cordón umbilical, célula troncal hematopoyética y similares. La célula presentadora de antígeno no está particularmente limitada, siempre que la célula tenga la capacidad de presentar un antígeno a ser reconocido por la célula T. Por ejemplo, aquí se puede usar una célula mononuclear, célula B, célula T, macrófago, célula dendrítica, fibroblasto o similar a la que se permite presentar un antígeno deseado.

Las condiciones de cultivo como se divulgan aquí para una célula precursora o similar durante la preparación de CTL se pueden, por ejemplo, ajustar según condiciones conocidas en general [véase, por ejemplo, Carter J. *et al.*, *Immunology* **57**(1), 123-129 (1986)].

Además, la célula se puede cocultivar con una célula alimentadora apropiada. Cuando se cocultiva el CTL con la célula alimentadora, se desea que el medio sea uno adecuado para el mantenimiento y crecimiento tanto del CTL como de la célula alimentadora. Como medio, se puede usar un medio comercialmente disponible.

La célula alimentadora usada para el método descrito aquí no está particularmente limitada, siempre que la célula alimentadora estimule el CTL de forma cooperativa con un anticuerpo anti-CD3 para activar el receptor de células T. Por ejemplo, se usan aquí PBMC o célula B transformada con el virus de Epstein-Barr (célula B-EBV). Normalmente, se usa una célula alimentadora después de eliminar su capacidad de proliferación por medio de irradiación o similar. Por cierto, el contenido de la célula alimentadora en el medio se puede determinar según condiciones conocidas. Por ejemplo, el contenido es preferiblemente de $1 \times 10^{5-7}$ células/ml.

Aquí se usa particularmente una célula no infectada por virus, por ejemplo, una célula diferente de célula B-EBV como célula alimentadora. Usando la célula no infectada con virus, se puede eliminar la posibilidad de que la célula B-EBV se mezcle con un CTL expandido, haciendo de esta manera posible aumentar la seguridad en tratamientos médicos que utilizan CTL, tal como la inmunoterapia adoptiva.

La célula presentadora de antígeno se puede preparar añadiendo un péptido antigénico a una célula que tiene una capacidad presentadora de antígeno, dejando de esta manera que la célula presente el péptido antigénico en su superficie [véase, por ejemplo, Bendnarek M. A. *et al.*, *J. Immunol.* **147**(12), 4047-4053 (1991)]. Además, en el caso donde una célula que tiene capacidad de presentar antígeno tiene capacidad de procesar un antígeno, se añade un antígeno a la célula, de modo que se incorpore el antígeno en la célula y se procese en la misma, y se presentan los péptidos antigénicos fragmentados en la superficie de la célula. Por cierto, cuando se añade un péptido antigénico a una célula que tiene capacidad de presentar antígenos se usa un péptido antigénico que se ajusta a la restricción de MHC de la célula presentadora de antígeno usada y el CTL a ser inducido.

Por cierto, el antígeno usado aquí no está particularmente limitado e incluye, por ejemplo, antígenos exógenos tales como bacterias y virus, antígenos endógenos tales como antígenos asociados a tumor (antígenos cancerosos) y similares.

Es preferible que la célula presentadora de antígeno se haga aquí no proliferativa. Para hacer la célula no proliferativa, la célula se puede, por ejemplo, someter a irradiación con rayos X o similar, o a un tratamiento con un agente tal como mitomicina.

Las condiciones comunes para incubar (cocultivar) aquí una célula precursora capaz de diferenciarse a CTL junto con una célula presentadora de antígeno en presencia de un ingrediente eficaz seleccionado de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos para inducir CTL pueden ser condiciones conocidas [véase, por ejemplo, Bendnarek M. A. *et al.*, *J. Immunol.* **147**(12), 4047-4053 (1991)]. Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas y se pueden usar las condiciones normalmente usadas para el cultivo celular. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en condiciones de 37°C en presencia de CO₂ al 5% y similares. El cocultivo normalmente se lleva a cabo durante alrededor de 2 horas hasta alrededor de 15 días, tiempo durante el cual la célula presentadora de antígeno se puede intercambiar una recién preparada para reestimulación. Además, se puede intercambiar el medio con uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados.

El CTL así obtenido mediante el método descrito aquí tiene una capacidad de específicamente reconocer el antígeno deseado, por ejemplo destruyendo específicamente una célula que tiene el antígeno mediante su actividad citotóxica.

Esta actividad citotóxica del CTL se puede evaluar por un método conocido. Por ejemplo, se puede evaluar la actividad citotóxica del CTL contra una célula diana marcada con una sustancia radioactiva, una sustancia fluorescente o similar determinando la radioactividad o intensidad fluorescente atribuida a la célula diana destruida por el CTL. Además, se puede detectar determinando la cantidad de una citoquina tal como GM-CSF o IFN- γ liberado de forma específica de antígeno del CTL o una célula diana. Además de ellos, la actividad citotóxica se puede confirmar directamente usando un complejo péptido antigénico-MHC en el que el péptido está marcado con un pigmento fluorescente o similar. En este caso, por ejemplo, se pone en contacto el CTL con un primer marcador fluorescente acoplado con un anticuerpo específico de CTL y después con un complejo péptido antigénico-MHC en el que el péptido está acoplado con un segundo marcador fluorescente, y se detecta la presencia de una célula doblemente marcada mediante análisis de FACS (separación celular activada por fluorescencia), mediante lo cual se puede evaluar la actividad citotóxica del CTL.

Por cierto, el método descrito aquí para expandir CTL no está particularmente limitado, siempre que el ingrediente eficaz anteriormente mencionado exista en el sistema de cultivo usado en el método. También se abarca un método como se describe aquí en el que el método se lleva a cabo mediante la existencia del ingrediente eficaz anteriormente mencionado en el sistema de cultivo en un método convencional para la expansión de CTL diferente de los descritos anteriormente, es decir, el cultivo de una célula precursora o similar se lleva a cabo en presencia del ingrediente eficaz descrito aquí (por ejemplo, añadiendo el ingrediente eficaz anteriormente mencionado a un medio a ser usado en el cultivo).

A continuación se explicará en detalle el método para cultivar una célula LAK.

El cultivo de la célula LAK se lleva a cabo incubando una célula que puede formar una célula LAK junto con IL-2, en presencia del ingrediente eficaz anteriormente mencionado. La célula que puede formar una célula LAK incluye, pero no está particularmente limitada a, por ejemplo, célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), célula NK, célula mononuclear de sangre de cordón umbilical, célula troncal hematopoyética, componentes sanguíneos que contienen estas células y similares.

Además, las condiciones generales para cultivar una célula LAK se pueden ajustar según condiciones conocidas [por ejemplo, véase, *Saibo Kogaku (Cell Technology)*, **14(2)**, 223-227 (1995); *Saibo Baiyo (Cell Culture)* **17(6)**, 192-195 (1991); *THE LANCET*, **356**, 802-807 (2000); *Current Protocols in Immunology, suplemento 17*, UNIDAD 7.7]. Las condiciones de cocultivo no están particularmente limitadas y se pueden emplear las condiciones normalmente usadas para el cultivo celular. Por ejemplo, el cultivo se puede llevar a cabo en condiciones de 37°C en presencia de CO₂ al 5% y similares. Este cocultivo normalmente se lleva a cabo durante alrededor de 2 horas hasta alrededor de 15 días. Además, se puede intercambiar el medio con uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados.

De la misma manera que esos para los mencionados anteriormente inducción, mantenimiento o expansión del CTL o la célula LAK, como para TIL, se puede preparar un grupo de células que tenga un alta actividad citotóxica cultivando las células en presencia de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.

No hay limitación particular en los procedimientos de activación de estas células siempre que fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos coexista con las mismas, y los procedimientos se pueden llevar a cabo usando un medio apropiado para el cultivo o activación de las células mencionadas anteriormente. Respecto a la cantidad de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos usados, el método de añadir el componente y similar, se pueden seleccionar los apropiados según el método mencionado anteriormente.

Según el método anteriormente mencionado descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico, se obtiene un linfocito citotóxico en el que se mantiene la actividad citotóxica a un nivel alto, el nivel de expresión de IL-2R aumenta significativamente y se mejora la relación de una célula CD8 positiva, linfocito tóxico que es adecuado para su uso en medicina. Según esto, aquí se proporcionan además un método para aumentar la expresión de un receptor de interleuquina-2 en un linfocito citotóxico, que comprende el paso de llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un ingrediente eficaz descrito aquí; un método para mejorar una relación de célula CD8 positiva en un linfocito citotóxico, que comprende el paso de llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un ingrediente eficaz descrito aquí; y un método para mejorar o mantener una actividad citotóxica en un linfocito citotóxico, que comprende el paso de llevar a cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un ingrediente eficaz descrito aquí.

También se proporciona aquí un agente para aumentar la expresión de IL-2R en una superficie celular, que comprende como un ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. El agente potenciador comprende el ingrediente eficaz mismo y además otro ingrediente opcional, por ejemplo, un medio, una proteína y una citoquina (preferiblemente IL-2) que son apropiados para activar una célula, y otros componentes deseados. Además, el medio que contiene el agente potenciador anteriormente mencionado se puede emplear como medio para aumentar la expresión de IL-2R en un linfocito citotóxico. El medio anteriormente mencionado opcionalmente contiene componentes básicos para el cultivo celular. Aquí, el agente potenciador y el medio para aumentar la expresión de IL-2R anteriormente mencionados se puede preparar usando el ingrediente eficaz descrito aquí según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz descrito aquí y similar en el agente potenciador o el medio para aumentar la expresión de IL-2R mencionado anteriormente no está particularmente limitado, siempre que se obtengan los efectos deseados descritos aquí. Por ejemplo, el contenido se puede determinar de forma apropiada según el conte-

ES 2 356 814 T3

nido del ingrediente eficaz y similar en el medio anteriormente mencionado usado en el método descrito aquí según se desee. Además, el agente potenciador anteriormente mencionado se puede administrar directamente a un cuerpo vivo, por lo que se puede aumentar la expresión de IL-2R en una célula en un cuerpo vivo.

5 También se proporciona aquí un agente para mejorar una relación de una célula CD8 positiva en una población de linfocitos cultivados, caracterizado en que el agente comprende como ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. El agente que mejora la relación comprende el ingrediente eficaz mismo y además otro ingrediente opcional, por ejemplo, un medio, una proteína y una citoquina (preferiblemente IL-2) que son apropiados para activar una célula, y otros componentes deseados. Además, se puede emplear el medio que contiene
10 el agente que mejora la relación anteriormente mencionado como medio para mejorar una relación de una célula CD8 positiva en un linfocito citotóxico. El medio anteriormente mencionado opcionalmente contiene componentes básicos para el cultivo celular. Aquí, el agente que mejora la relación y el medio para mejorar la relación anteriormente mencionados se pueden preparar usando el ingrediente eficaz descrito aquí según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz descrito aquí y similar en el agente que mejora la relación o el medio para mejorar una relación
15 de una célula CD8 positiva mencionado anteriormente se puede determinar de forma apropiada según se desee de la misma manera que en el caso del agente anteriormente mencionado para expresar IL-2R y similar. Además, el agente que mejora la relación anteriormente mencionado se puede administrar directamente a un cuerpo vivo, por lo que se puede mejorar la relación de un linfocito citotóxico en un cuerpo vivo.

20 También se proporciona aquí un agente para mejorar o mantener una actividad citotóxica en un linfocito citotóxico, caracterizado en que el agente comprende como un ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos. El agente de mejora o mantenimiento comprende el ingrediente eficaz mismo y además otro ingrediente opcional, por ejemplo, un medio, una proteína y una citoquina (preferiblemente IL-2) que son adecuados para activar una célula, y otros componentes deseados. Además, el medio que contiene el agente de mejora o mantenimiento anteriormente mencionado se puede emplear como medio para mejorar o mantener una actividad citotóxica
25 en un linfocito citotóxico. El medio anteriormente mencionado opcionalmente contiene componentes básicos para el cultivo celular. Aquí, el agente de mejora o mantenimiento y el medio para mejora o mantenimiento anteriormente mencionados se pueden preparar usando el ingrediente eficaz descrito aquí según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz descrito aquí en el agente de mejora o mantenimiento y el medio para la mejora o mantenimiento
30 mencionado anteriormente no está particularmente limitado, siempre que se obtengan los efectos deseados descritos aquí. Por ejemplo, el contenido se puede determinar de forma apropiada según el contenido del ingrediente eficaz en el medio anteriormente mencionado usado en el método descrito aquí según se desee. Además, el agente de mejora o mantenimiento anteriormente mencionado se puede administrar directamente a un cuerpo vivo, por lo que se puede mejorar o mantener la actividad del linfocito citotóxico en un cuerpo vivo.

35 Además, el agente potenciador de la expresión, el agente que mejora la relación y el agente para la mejora o mantenimiento de una actividad citotóxica mencionado anteriormente puede estar en la forma en que los componentes se inmovilizan a una fase sólida apropiada, por ejemplo, un equipo de cultivo celular tal como una placa de petri, una botella o una bolsa (incluyendo tanto los de un sistema abierto como de sistema cerrado) y un soporte de cultivo celular tal como bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio.

Normalmente, en el cultivo que contiene linfocito obtenido usando el método para preparar un linfocito citotóxico como se describe anteriormente, se mezclan células diferentes del linfocito citotóxico tal como células T cooperadoras en el mismo. Sin embargo, puesto que los linfocitos que tienen actividad citotóxica están contenidos en una gran
45 cantidad en el cultivo que contiene linfocitos obtenido aquí, las células en el cultivo se pueden recoger del cultivo mediante centrifugación o similar, y usar directamente como un linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí. Además, si el ingrediente eficaz anteriormente mencionado o similar está inmovilizado a un equipo de cultivo celular o similar, no hay riesgo de mezcla del componente o similar en el linfocito citotóxico resultante.

50 Además, una población (o cultivo) celular rica en un linfocito citotóxico se puede separar adicionalmente del cultivo mediante un método conocido, y usarse aquí como un linfocito citotóxico. En otras palabras, el método para preparar un linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí puede comprender el paso de seleccionar una población celular rica en un linfocito citotóxico del cultivo obtenido por el método.

55 El método de seleccionar una población celular rica en un linfocito citotóxico no está particularmente limitado. El método se ejemplifica mediante, por ejemplo, un método que comprende recoger de forma selectiva solo la célula deseada del cultivo usando un equipo o soporte de cultivo celular al que está unido un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular expresado en la superficie de la célula deseada, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD8, o un método usando un citómetro de flujo. El soporte anteriormente mencionado se ejemplifica mediante bolas magnéticas o una
60 columna. Además, la población celular rica en la célula deseada se puede obtener eliminando mediante adsorción las células diferentes de la célula deseada del cultivo. Por ejemplo, se puede eliminar la célula T cooperadora del cultivo de linfocitos usando un anticuerpo contra un antígeno de superficie celular expresado en la superficie de la célula T cooperadora, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD4. En este paso, también se puede usar un citómetro de flujo. La población celular en el linfocito citotóxico obtenida de esta manera tiene una actividad citotóxica más potente,
65 comparada con la de una población celular recogida de forma no selectiva de un cultivo, de modo que la población celular se puede usar en especial preferiblemente en el campo médico.

Además, aquí se proporciona el linfocito citotóxico obtenido por el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico. El linfocito, en especial CTL, tiene una actividad citotóxica alta, que tiene una característica de hay poca disminución de la actividad citotóxica, incluso cuando el linfocito se somete a cultivo o expansión continuos durante un largo periodo de tiempo. Además, aquí se proporciona un medicamento (agente terapéutico) que comprende el linfocito como ingrediente eficaz. En especial, el agente terapéutico mencionado anteriormente, que comprende el linfocito se usa de forma adecuada en inmunoterapia adoptiva. En la inmunoterapia adoptiva, el linfocito citotóxico que tiene una actividad citotóxica adecuada para tratar un paciente se administra al paciente mediante, por ejemplo, administración intravenosa. El agente terapéutico se puede preparar, por ejemplo, mezclando el linfocito preparado por el método descrito aquí como un ingrediente eficaz con, por ejemplo, un soporte orgánico o inorgánico conocido adecuado para la administración no oral, un excipiente, un agente estabilizante y similar, según un método conocido en el campo farmacéutico. Por cierto, se pueden determinar de forma apropiada varias condiciones para el agente terapéutico, tal como el contenido de linfocito como se describe aquí en el agente terapéutico y la dosis del agente terapéutico, según la inmunoterapia adoptiva conocida.

El método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico puede comprender además el paso de transducir un gen exógeno en el linfocito. En otras palabras, aquí se proporciona un método para preparar un linfocito citotóxico, que comprende además el paso de transducir un gen exógeno en un linfocito citotóxico. Aquí, el término "exógeno" se refiere a los que son exógenos a un linfocito en el que se transduce el gen.

Al llevar a cabo el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico, en especial el método para expandir un linfocito citotóxico, la capacidad de replicación del ADN del linfocito cultivado aumenta. Por tanto, al incluir el paso de transducir un gen en el método descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico se espera un aumento en el método de transducción génica.

Los métodos de transducir un gen exógeno no están particularmente limitados, y se puede seleccionar un método apropiado de un método conocido para transducir un gen. El paso de transducir un gen se puede llevar a cabo en cualquier punto determinado durante la preparación de un linfocito citotóxico. Por ejemplo, es preferible llevar a cabo el paso de forma simultánea con cualquier paso de los anteriormente mencionados de inducción, mantenimiento y/o expansión del linfocito o después del paso, desde el punto de vista de eficacia de trabajo.

Como el método anteriormente mencionado para transducir un gen, se puede emplear aquí cualquiera de los métodos usando un vector vírico y métodos sin usar el vector. Los detalles de esos métodos ya se han publicado en numerosas referencias.

El vector vírico anteriormente mencionado no está particularmente limitado, y se usa un vector vírico conocido normalmente usado en los métodos para transducir un gen, por ejemplo, vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico, vector de virus adenoasociado, vector de virus simio, vector del virus vaccinia, vector de virus Sendai o similar. En especial preferiblemente, como el vector vírico se usa retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus simio. Como el vector vírico anteriormente mencionado, son preferibles los que carecen de capacidad de replicación de modo que el vector vírico no se puede auto-replicar en una célula infectada.

El vector retrovírico se usa para el propósito de terapia génica o similar porque se puede incorporar de forma estable un gen exógeno insertado en el vector en el ADN cromosómico en la célula en la que se va a transducir el vector. Puesto que el vector tiene una eficacia de infección alta en la célula durante mitosis y proliferación, la transducción génica se lleva a cabo preferiblemente en el método para preparar un linfocito citotóxico, por ejemplo, el paso de expansión.

Como el método para transducir un gen sin usar un vector vírico, se puede emplear, pero no particularmente limitado a, por ejemplo, un método que usa un soporte tal como liposoma o ligando-polilisina, método del fosfato de calcio, método de electroporación, método de bombardeo de partículas o similar. En este caso, se transduce un gen exógeno incorporado en ADN plasmídico o ADN lineal.

El gen exógeno a ser transducido en un linfocito citotóxico descrito aquí no está particularmente limitado, y se puede seleccionar un gen arbitrario que se desea transducir en la célula anteriormente mencionada. Como el gen descrito anteriormente, además de un gen que codifica una proteína (por ejemplo, una enzima, una citoquina, un receptor o similar), por ejemplo, se puede usar un gen que codifica un ácido nucleico antisentido o una ribozima. Además, se puede transducir de forma simultánea un gen marcador apropiado que sea capaz de seleccionar una célula en la que se transduce un gen.

El gen exógeno mencionado anteriormente se puede, por ejemplo, insertar en un vector, un plásmido o similar, de modo que el gen exógeno se exprese bajo el control de un promotor apropiado, y usar. Además, para alcanzar una transcripción eficaz de un gen, puede existir en un vector otro elemento regulador que coopere con el promotor o un sitio de inicio de la transcripción, por ejemplo, una secuencia potenciadora o una secuencia terminadora. Además, para el propósito de insertar un gen exógeno en un cromosoma de un linfocito en el que el gen se transduce por recombinación homóloga, por ejemplo, se puede organizar un gen exógeno entre secuencias flanqueantes que comprenden secuencias de nucleótidos que tiene cada una homología a las secuencias de nucleótidos localizadas en ambos lados del sitio de inserción diana deseado del gen en el cromosoma. El gen exógeno a ser transducido puede ser uno natural o uno generado de forma artificial, o puede ser uno en el que se unen moléculas de ADN que tienen orígenes diferentes por un medio conocido tal como ligación. Además, el gen exógeno puede ser uno que tenga una secuencia en la que se introduce una mutación en una secuencia natural dependiendo de su fin.

ES 2 356 814 T3

Según el método descrito aquí, por ejemplo, se transduce en un linfocito citotóxico un gen que codifica una enzima asociada con la resistencia a un fármaco usado para el tratamiento de un paciente con cáncer o similar, dando de esta manera al linfocito resistencia al fármaco. Si se usa el linfocito citotóxico como se ha descrito anteriormente, se pueden combinar inmunoterapia adoptiva y terapia con fármacos y, por tanto, se pueden obtener efectos terapéuticos mayores. El gen de resistencia a fármaco se ejemplifica mediante, por ejemplo, un gen de multiresistencia a fármacos.

Por otra parte, al contrario de la forma de realización anteriormente mencionada, se transduce en un linfocito citotóxico un gen de modo que de sensibilidad contra un fármaco particular, dando de esta manera sensibilidad contra el fármaco. En este caso, se puede eliminar el linfocito después de ser trasplantado a un cuerpo vivo administrando el fármaco. El gen para dar sensibilidad contra un fármaco se ejemplifica mediante, por ejemplo, un gen de timidina quinasa.

15 Ejemplos

La invención se describirá de forma más concreta por medio de los ejemplos.

20 Ejemplo de preparación 1

Preparación de un fragmento de fibronectina

(1) Preparación de un fragmento de fibronectina

H-271, un fragmento derivado de fibronectina humana, se preparó de *Escherichia coli* HB101/pHD101 (FERM BP-2264) según el método descrito en la patente de EE UU No. 5.198.423.

Además, H-296, CH-271 y CH-296, fragmentos derivados de fibronectina humana, se prepararon cada uno de un cultivo obtenido cultivando *Escherichia coli* HB101/pHD102 (FERM BP-7420), *Escherichia coli* HB101/pCH101 (FERM BP-2799) o *Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800), según el método descrito en el boletín mencionado anteriormente.

C-274, un fragmento derivado de fibronectina humana, se preparó de un cultivo obtenido cultivando *Escherichia coli* JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) según el método descrito en la patente de EE UU No. 5.102.988.

C-CS1, un fragmento derivado de fibronectina humana, se preparó de un cultivo obtenido cultivando *Escherichia coli* HB101/pCS25 (FERM BP-5723) según el método descrito en el boletín de patente japonesa No. 3104178.

CHV-89 y CHV-179, fragmentos derivados de fibronectina humana, se prepararon cada uno de un cultivo obtenido cultivando *Escherichia coli* HB101/pCHV89 (FERM P-12182) o *Escherichia coli* HB101/pCHV179 (FERM P-12183), según el método descrito en el boletín de patente japonesa No. 2729712.

Además, CHV-90 un fragmento derivado de fibronectina humana, se preparó según el método descrito en el boletín de patente japonesa No. 2729712. En concreto, se construyó un plásmido pCHV90 según los procedimientos descritos en el boletín, y después de ello se cultivó un transformante que lleva el plásmido y se preparó CHV90 del cultivo.

CHV-181, un fragmento derivado de fibronectina humana, se preparó construyendo el plásmido (pCHV181) que comprende un ADN que codifica CHV-181 según el método descrito en el documento WO 97/18318, cultivando después de ello *Escherichia coli* HB101/pCHV181 en la que se había introducido el plásmido, y preparando el fragmento del cultivo de la misma manera que para CHV-179 anterior.

(2) Preparación de CHV-92

Como para pCHV181, un plásmido para expresar el anteriormente mencionado polipéptido CHV-181, se construyó un plásmido CHV92 que tenía la delección de una región que codifica una región III-13 en la región que codifica CHV-181. Los procedimientos de delección se realizaron según procedimientos para deleccionar una región codificante III-14 de un plásmido pCHV179, que se describen en el boletín de patente japonesa No. 2729712.

Se cultivó *Escherichia coli* HB101 (*Escherichia coli* HB101/pCHV92) transformada con el plásmido anteriormente mencionado pCHV92, y los procesos de purificación se llevaron a cabo según el método de purificar el polipéptido CHV-89 descrito en el boletín de patente japonesa No. 2729712, para obtener una preparación de CHV-92 purificada del cultivo resultante.

ES 2 356 814 T3

(3) Preparación de H-275-Cys

Se construyó un plásmido para expresar el polipéptido H-275-Cys según los siguientes procedimientos. En concreto, se preparó un plásmido pCH102 de *Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800). Se llevó a cabo PCR usando un cebador 12S que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 20 y un cebador 14A que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 21 con el plásmido anterior como molde, para dar un fragmento de ADN de alrededor de 0,8 kb, que codifica un polipéptido de unión a heparina de fibronectina. El fragmento de ADN resultante se digirió con NcoI y BamHI (ambas fabricadas por Takara Bio Inc.) y después de ello se ligó con pTV118N (fabricado por Takara Bio Inc.) digerido con NcoI y BamHI, para construir un plásmido pRH1.

Se digirió un vector plasmídico pINIII-ompA₁ [Ghrayeb J. *et al.*, *EMBO J.*, **3**(10), 2437-2442 (1984)] con BamHI y HincII (fabricadas por Takara Bio Inc.) para recoger un fragmento de ADN de alrededor de 0,9 kb, que contiene una región terminadora de lipoproteína. Este fragmento se mezcló y ligó con el plásmido pRH1 anteriormente mencionado que se había digerido con BamHI y HincII, para dar un plásmido pRH1-T que contenía un promotor *lac*, un fragmento de ADN que codifica un polipéptido de unión a heparina y un terminador de lipoproteína en este orden.

La reacción para PCR se llevó a cabo usando un cebador Cys-A que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 22 y un cebador Cys-S que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 23 con este plásmido pRH1-T como molde. Después de ello, el fragmento de ADN amplificado recogido se digirió con NotI (fabricada por Takara Bio Inc.), y el fragmento de ADN además se auto-ligó. Se digirió un ADN cíclico así obtenido con SpeI y ScaI (fabricadas por Takara Bio Inc.) para dar un fragmento de ADN de 2,3 kb, y el fragmento resultante se mezcló y ligo con un fragmento de ADN de 2,5 kb obtenido digiriendo el plásmido pRH1-T con SpeI y ScaI (fabricadas por Takara Bio Inc.), para dar un plásmido pRH-Cys. El plásmido codifica un polipéptido H-275-Cys en el que se añadieron cuatro aminoácidos Met-Ala-Ala-Ser en un extremo N-terminal del anteriormente mencionado H-271, y se añadió una Cys adicional al C-terminal del H-271.

El polipéptido H-275-Cys se preparó mediante el siguiente método. Se cultivo *Escherichia coli* HB101 transformada con el plásmido mencionado anteriormente pRH-Cys (*Escherichia coli* HB101/pRH-Cys) durante la noche a 37°C en 120 ml de medio LB. Las células recogidas del medio de cultivo se resuspendieron en 40 ml de un tampón para rotura (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,5), y la suspensión se sometió a tratamiento ultrasónico para romper las células. El sobrenadante obtenido por centrifugación se sometió a una columna HiTrap-heparina (fabricada por Pharmacia) que se había equilibrado con un tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). La fracción no adsorbida en la columna se lavó con el mismo tampón, y después de ello se llevó a cabo la elución con un tampón de purificación que tenía un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 1 M. El eluato se analizó mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida, y se recogieron las fracciones correspondientes a un peso molecular de H-275-Cys para dar una preparación purificada de H-275-Cys.

Ejemplo 1

Relación de células CD8 positivas en CTL

(1) Aislamiento y almacenamiento de PBMC

Se recogió el componente sanguíneo de un donante individual humano normal que tenía HLA-A2.1, obtenido con consentimiento informado. El componente sanguíneo recogido se diluyó 2 veces con PBS(-), se aplicó sobre Ficoll-paque (fabricado por Pharmacia) y se centrifugó a 500 x g durante 20 minutos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la capa intermedia se recogieron con una pipeta y se lavaron. Las PBMC recogidas se resuspendieron en una solución de almacenamiento de SBF al 90% (fabricado por Bio Whittaker)/DMSO al 10% (fabricado por SIGMA) y se almacenaron en nitrógeno líquido. Durante la inducción de CTL, estas PBMC almacenadas se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se lavaron con medio RPMI 1640 (fabricado por Bio Whittaker) que contenía Dnasa 10 µg/ml (fabricada por Calbiochem). Después de ello, se calculó el número de células vivas por el método de tinción con azul de tripan y las células se sometieron a cada experimento.

(2) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se realizó modificando parcialmente el método de Bednarek *et al.* [*J. Immunology*, **147**(12), 4047-4053 (1991)]. En concreto, las PBMC preparadas en el punto (1) del ejemplo 2 se resuspendieron en medio RPMI 1640 (fabricado por Bio Whittaker) que contenía suero humano de tipo AB al 5%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM (todos los anteriores están fabricados por Bio Whittaker), HEPES 10 mM (fabricado por nakalai tesque), estreptomycin-penicilina al 1% (fabricado por Gibco BRL) (de aquí en adelante simplemente denominado "5HRPMI") de modo que tuviera una concentración de 1 a 4 x 10⁶ células/ml. Después de ello, la suspensión se puso en una placa de cultivo de 24 pocillos (fabricada por Falcon) en un volumen de 1 ml/pocillo, y las células se incubaron en un incubador de tipo húmedo con CO₂ al 5% a 37°C durante 1,5 horas para separar los monocitos adherentes a plástico. Después de ello, las células no adherentes se recogieron usando medio RPMI 1640 y se almacenaron en hielo como células respondedoras. A los monocitos separados se añadieron 0,5 ml de 5HRPMI que contenía como péptido antigénico 5 µg/ml del péptido

epítipo derivado de proteína del virus de la gripe (péptido de unión a A2.1 derivado de la proteína de matriz de SEQ ID NO: 24) y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de microglobulina $\beta 2$ (fabricada por Scrips). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después de ello las células a irradiación con rayos X (5500R) para dar células presentadoras de antígeno. La solución peptídica se eliminó por succión de cada uno de los pocillos, y los pocillos se lavaron con medio RPMI 1640. Después de ello, las células respondedoras previamente almacenadas en hielo se aspiraron en 5HRPMI para tener una concentración de 0,5 a 2×10^6 células/ml, y la suspensión se añadió a las células presentadoras de antígeno en una cantidad de 1 ml por pocillo. A este tiempo, se añadió cada fragmento de fibronectina (de aquí en adelante denominado "FNfr") descrito en el ejemplo de preparación 1 de modo que se tuviera una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se fijó un grupo sin adición de FNfr como control. La placa se cultivó a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. El segundo día desde el inicio del cultivo, se añadió 1 ml de 5HRPMI que contenía IL-2 60 U/ml (fabricada por Shionogi & Co. Ltd.) y FNfr 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a cada pocillo (el control contenía solo IL-2). Además, el quinto día, se retiró la mitad del sobrenadante del cultivo, y se añadió al mismo a cada 1 ml de medio que contenía IL-2 y FNfr (el control contenía solo IL-2), los mismos que los mencionados anteriormente. El séptimo día, se prepararon células presentadoras de antígeno de la misma manera que antes, y después de ello las células respondedoras que se habían cultivado durante una semana se resuspendieron en 5HRPMI para tener una concentración de 0,5 a 2×10^6 células/ml. La suspensión se añadió a las células presentadoras de antígeno preparadas en una cantidad de 1 ml/pocillo para reestimar las células. A este tiempo, se añadió FNfr de modo que tuviera una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (siendo el control sin adición). El segundo día desde la reestimulación, se añadió a cada pocillo 1 ml de 5HRPMI que contenía IL-2 60U/ml y FNfr 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (el control contenía solo IL-2). Además, el quinto día, se retiró la mitad del sobrenadante del cultivo, y se añadió al mismo 1 ml del medio que tenía el mismo contenido que el de antes de la retirada. El cultivo se siguió durante dos días adicionales, induciendo con ello CTL.

(3) Determinación para la actividad citotóxica de CTL

Se evaluó la actividad citotóxica de los CTL preparados en el punto (2) del ejemplo 1 el decimocuarto día después del inicio de la inducción mediante un método de determinación para la actividad citotóxica usando calceína-AM [R. Lichtenfels *et al.*, *J. Immunological Methods*, **172(2)**, 227-239 (1994)]. Se resuspendieron células B transformadas con EBV que tenían HLA-A2.1 (nombre de las células: 221A2.1), que se cultivaron durante la noche junto con un péptido de epítipo o en ausencia del péptido de epítipo, en medio RPMI 1640 que contenía SBF al 5% (fabricado por Bio Whittaker) de modo que tuvieran una concentración de 1×10^6 células/ml. Después de ello, se añadió calceína-AM (fabricada por Dotite) a la suspensión para dar una concentración final de 25 μM y las células se cultivaron a 37°C durante 1 hora. Las células se lavaron con un medio que no contenía calceína-AM y después de ello se mezclaron con células K562 (ATCC CCL-243) en una cantidad de 20 veces la de las células, para dar células diana marcadas con calceína. Las células K562 se usaron para excluir actividad citotóxica no específica por células NK mezcladas en las células respondedoras.

Los CTL de memoria preparados en el punto (2) del ejemplo 1 se diluyeron por pasos con 5HRPMI de modo que tuvieran una concentración de 1×10^5 a 9×10^6 células/ml como células efectoras. Después de ello, cada una de las diluciones se echó en un pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos en una cantidad de 100 μl /pocillo. Se añadieron a los mismos las células diana marcadas con calceína preparadas para tener una concentración de 1×10^5 células/ml en una cantidad de 100 μl /pocillo. La placa que contenía la suspensión de células anterior se centrifugó a 400 x g durante 1 minuto y después de ello se incubó en un incubador de tipo húmedo de CO₂ a 37°C durante 4 horas. Después de 4 horas, se recogieron 100 μl de sobrenadante del cultivo de cada pocillo y se determinó la cantidad de calceína liberada (intensidad de fluorescencia) en el sobrenadante del cultivo usando un lector de fluorescencia de placas (485 nm/538 nm). La actividad citotóxica de los CTL se calculó mediante la siguiente ecuación 1:

Ecuación 1

$$\text{Actividad citotóxica (\%)} = \frac{[(\text{Valor determinado en cada pocillo} - \text{cantidad liberada mínima}) / (\text{cantidad liberada máxima} - \text{cantidad liberada mínima})] \times 100}{}$$

En la ecuación anterior, la cantidad liberada mínima es la cantidad de calceína liberada en el pocillo que contiene solo células diana y células K562, que muestra la cantidad de calceína liberada de forma natural por las células diana. Además, la cantidad liberada máxima se refiere a la cantidad de calceína liberada cuando las células se rompen por completo añadiendo el 0,1% del tensioactivo Triton X-100 (fabricado por nakalai tesque) a las células diana. Como resultado, la actividad citotóxica se indujo de forma inmediata después de la inducción, pero apenas había diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

(4) Determinación de la relación de contenido de células CD8 positivas en una población celular de CTL

Se fijaron los CTL que se prepararon en el punto (2) del ejemplo 1 en una cantidad de 2×10^5 células con PBS (fabricado por Nissui) que contenía paraformaldehído al 1% (fabricado por nakalai tesque), y después se lavaron con PBS. Las células fijadas se resuspendieron en 100 μl de PBS que contenía BSA al 1% (fabricado por SIGMA), se añadió a las mismas IgG1 de ratón marcada con FITC o anticuerpo anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC (ambos fabricados por DAKO) y después de ello la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Después de la

ES 2 356 814 T3

incubación, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron de nuevo en PBS que contenía paraformaldehído al 1%. Las células se sometieron a citometría de flujo usando FACS Vantage (fabricado por Becton Dickinson) y se determinó la relación de contenido de las células CD8 positivas. Los resultados se muestran en la tabla 1.

5

TABLA 1

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células CD8 positivas (%)
Control (sin adición de FNfr)	60,2
CH-296	88,8
15 CH-271	65,7
H-271	81,4
C-274	86,2
20 H-275-Cys	79,0
CHV-89	70,2
CHV-90	77,0
25 CHV-181	73,1
Control (sin adición de FNfr)	33,0
30 H-296	40,1
C-CS1	41,6
CHV-92	44,0
35 CHV-179	37,8

40 Como se muestra en la tabla 1, en el grupo con adición de varios fragmentos de fibronectina durante la inducción de CTL, la relación de las células CD8 positivas el decimocuarto día después del inicio de la inducción de los CTL es alta, comparada con la del control sin adición de estos fragmentos de fibronectina. En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían inducir con proliferación significativa de células CD8 positivas por la copresencia del fragmento de fibronectina.

45

Ejemplo 2

Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2

50

(1) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

55

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

60

(2) Determinación de la relación de expresión del receptor de interleuquina-2 en CTL

65

Se determinó la relación de la expresión del receptor de interleuquina-2 (IL-2R) en los CTL que se prepararon en el punto (1) del ejemplo 2 el decimocuarto día desde el inicio de la inducción según el método descrito en el punto (4) del ejemplo 1. Aquí, en este procedimiento, se cambió un anticuerpo de ratón anti-CD8 humano marcado con FITC por un anticuerpo de ratón anti-IL-2R (CD25) humano marcado con FITC (fabricado por DAKO). Los resultados se muestran en la tabla 2.

ES 2 356 814 T3

TABLA 2

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células de expresión positiva de IL-2R (%)
Control (sin adición de FNfr)	29,8
CH-296	65,9
H-296	59,4
H-271	54,6
C-274	61,5
H-275-Cys	78,2
CHV-89	82,3
CHV-90	48,3
CHV-92	55,6
CHV-179	50,3
CHV-181	44,8
Control (sin adición de FNfr)	46,9
CH-271	60,9
C-CS1	72,3

Como se muestra en la tabla 2, en todos los CTL inducidos con adición de varios fragmentos de fibronectina, se observó un aumento en la relación de la expresión de IL-2R en la población celular. En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían inducir con aumento del nivel de expresión de IL-2R llevando a cabo la inducción en copresencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 3

Expansión de CTL

(1) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

(2) Expansión de CTL

Los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 3 se lavaron con 5HRPMI y después se hizo una suspensión que tenía una concentración de 3×10^4 células/ml. Por otra parte, se sometieron PBMC alogénicas que no tenían HLA-A2.1 que se recogieron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1 a irradiación por rayos X (3300R) y las células se lavaron con el medio y después se hizo una suspensión que tenía una concentración de 2 a 5×10^6 células/ml. Se resuspendieron estos CTL (3×10^4 células) y PBMC alogénicas (de 4 a 10×10^6 células) en 10 ml de 5HRPMI o medio RPMI 1640 (fabricado por Bio Whittaker) que contenía SBF Hyclone al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM (todos fabricados por Bio Whittaker), HEPES 10 mM (fabricado por nakalai tesque) y estreptomycin-penicilina al 1% (fabricado por Gibco BRL) (de aquí en adelante simplemente denominado 10HycloneRPMI) y se añadió al mismo un anticuerpo anti-CD3 (fabricado por Janssen-Kyowa) de modo que diera una concentración final de 50 ng/ml. La mezcla se colocó en una botella de 12,5 cm² (fabricada por Falcon) y las células se cultivaron en un incubador de tipo húmedo de CO₂ a 37°C durante 14 días. Durante el cultivo, se añadió FNfr de modo que tuviera una concentración final de 10 µg/ml que era la misma que la añadida durante la inducción de los CTL. Además, no se añadió FNfr a un grupo control en el que la inducción se llevó a cabo sin la adición de FNfr. La estimulación por un péptido no se añadió en absoluto durante este cultivo. El primer día después del inicio de la expansión, se añadió IL-2 de modo que tuviera una concentración final de 120 U/ml. Además, el cuarto día y

ES 2 356 814 T3

5 sucesivos después del inicio del cultivo se llevaron a cabo procedimientos de retirar la mitad del sobrenadante del cultivo y después de ello añadir 5 ml de 5HRPMPi que contenía IL-2 60 U/ml o 10HycloneRPMi a cada botella cada 2 a 3 días. Durante el cultivo, se añadió al medio FNfr a la misma concentración para el grupo con adición de FNfr. El decimocuarto día después del inicio de la expansión, se determinó la actividad citotóxica de los CTL de la misma manera que el punto (3) del ejemplo 1. El grado en que se mantiene la actividad citotóxica antes de la expansión se calculó como “mantenimiento de la actividad citotóxica (%)”.

El “mantenimiento de la actividad citotóxica (%)” se calculó según la siguiente ecuación 2:

10 Ecuación 2

$$\text{Mantenimiento de la actividad citotóxica (\%)} = \left[\frac{\text{Actividad citotóxica (\%)} \text{ después de la expansión}}{\text{actividad citotóxica (\%)} \text{ antes de la expansión}} \right] \times 100$$

15

Los resultados de la determinación se muestran en la tabla 3. En la tabla, un cociente E/T significa un cociente del número de células efectoras (E) respecto al número de las células diana (T).

20

TABLA 3

Medio	Fragmento de fibronectina	Mantenimiento de actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 3
5HRPMPi	Control (sin adición de FNfr)	17,3
	CH-271	53,5
	H-296	49,3
	C-CS1	49,3
	CHV-92	66,2
10HycloneRPMi	Control (sin adición de FNfr)	48,1
	CH-271	250,8
	H-296	162,3
	H-271	72,2
	C-CS1	100,2
	CHV-92	157,8
Medio	Fragmento de fibronectina	Mantenimiento de actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 10
10HycloneRPMi	Control (sin adición de FNfr)	46,3
	CHV-89	69,0
	CHV-90	75,6
Medio	Fragmento de fibronectina	Mantenimiento de actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 3
10HycloneRPMi	Control (sin adición de FNfr)	70,4
	CH-296	113,5
10HycloneRPMi	Control (sin adición de FNfr)	79,3
	CHV-179	190,0
	CHV-181	94,5

65

ES 2 356 814 T3

Como se muestra en la tabla 3, los CTL del grupo con adición de varios fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión mantuvieron una actividad citotóxica específica alta incluso después de la expansión durante 14 días comparada con la del control sin adición del fragmento de fibronectina. En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían expandir en un estado en el que se mantenía una alta actividad citotóxica durante un periodo de tiempo largo llevando a cabo la inducción y la expansión en copresencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 4

10 *Expresión de IL-2R en una población celular después de la expansión de CTL*

(1) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

15 La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

20 (2) *Determinación de la relación de la expresión del receptor de interleuquina-2 en CTL expandidos*

Los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 4 se expandieron de la misma que en el punto (2) del ejemplo 3. Se determinó la relación de células con expresión positiva de IL-2R para los CTL después de la expansión así obtenida de la misma manera que el punto (2) del ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R (%)
Control (sin adición de FNfr)	19,5
CH-271	45,3
H-296	47,7
40 H-271	48,3
C-274	53,5
C-CS	39,7
45 CHV-891	28,6
CHV-90	60,0
CHV-179	53,7
50 CHV-181	50,3
Control (sin adición de FNfr)	26,8
CH-296	36,1
55 Control (sin adición de FNfr)	18,4
H-275-Cys	56,5
CHV-92	59,9

60 Como se muestra en la tabla 4, en todos los grupos con adición de varios fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión de CTL, se observó un aumento en la relación de células que expresan IL-2R en la población celular.

65 En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían expandir con aumento en el nivel de expresión de IL-2R llevando a cabo la inducción y expansión de los CTL en presencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 5

Inducción y expansión de CTL en presencia de fibronectina

5 (1) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC aisladas y almacenadas según el método descrito en el punto (1) del ejemplo 1. Durante la inducción, se añadió fibronectina (fabricada por Calbiochem) en lugar de FNfr de modo que se tuviera una concentración final de 10 µg/ml (el control es sin adición). La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se determinó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de fibronectina durante la inducción.

15 (2) *Determinación de la relación de expresión de receptor de interleuquina-2 en CTL*

Se determinó la relación de células con expresión positiva de IL-2R para los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 5 de la misma manera que el punto (2) del ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

Fibronectina	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R (%)
Control (sin adición de fibronectina)	34,0
Fibronectina	64,6

35 Como se muestra en la tabla 5, en CTL inducidos en presencia de fibronectina, se observó un aumento en el nivel de expresión de IL-2R en la población celular.

40 En otras palabras, se aclaró que se podían inducir CTL con aumento en el nivel de expresión de IL-2R llevando a cabo la inducción de los CTL en presencia de fibronectina.

(3) *Expansión de CTL*

45 Se expandieron los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 5 de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Durante la expansión, al grupo con adición de fibronectina durante la inducción, se añadió fibronectina (fabricada por Calbiochem) de modo que se tuviera una concentración final de 10 µg/ml (un control sin adición). La actividad citotóxica de los CTL obtenidos se determinó de la misma manera que la del punto (3) del ejemplo 1, y se calculó el grado en que se mantiene la actividad citotóxica antes de la expansión como “mantenimiento de la actividad citotóxica (%)”.

Los resultados de la determinación se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

Fibronectina	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 3
Control (sin adición de fibronectina)	48,1
Fibronectina	148,9

ES 2 356 814 T3

Como se muestra en la tabla 6, el grupo en el que la inducción y la expansión de los CTL se llevaron a cabo en presencia de fibronectina mantuvieron una alta actividad citotóxica. Por otra parte, la actividad citotóxica del control sin adición de fibronectina durante la inducción y expansión de los CTL claramente disminuyó. En otras palabras, se aclaró los CTL se podían expandir en un estado en el que se mantenía una actividad citotóxica específica durante un periodo de tiempo largo añadiendo fibronectina durante la inducción y la expansión de los CTL.

Ejemplo 6

10 *Expansión de CTL en presencia de un fragmento de fibronectina (FN) inmovilizado*

(1) *Inmovilización de un fragmento de FN*

Se inmovilizó un fragmento de fibronectina en un equipo de cultivo celular (recipiente) usado en el siguiente experimento. En concreto, se añadió PBS que contenía varios fragmentos de fibronectina (concentración final: 10 µg/ml) en una cantidad de 1 a 2 ml a una placa de cultivo de 24 pocillo y a una botella de 12,5 cm². La placa y la botella se sometieron a incubación a temperatura ambiente durante 5 horas y después se almacenaron a 4°C hasta su uso. Además, la placa y la botella se lavaron dos veces con PBS antes de usar.

20 (2) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo según el método descrito en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC aislados y almacenados según el método descrito en el punto (1) del ejemplo 1. Durante la inducción, se usó una placa con FNfr inmovilizado como equipo de cultivo celular (para control, se usó una placa sin tratamiento de inmovilización). La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la inmovilización de FNfr a la placa durante la inducción.

30 (3) *Expansión de CTL*

Se expandieron los CTL preparados en el punto (2) del ejemplo 6 de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Durante la expansión, se usaron botellas con varios FNfr inmovilizados a las mismas como equipos de cultivo celular (para control, se usó una placa sin tratamiento de inmovilización). Además, se usó como medio 10Hy-cloneRPMI.

Se evaluó el grado en que se mantiene la actividad citotóxica de los CTL así expandidos comparado con la de antes de la expansión como “mantenimiento de la actividad citotóxica (%)”.

40 Los resultados de la determinación se muestran en la tabla 7.

TABLA 7

Fibronectina	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 3
Control (sin inmovilización de FNfr)	48,1
CH-271	95,4
H-296	95,0
H-271	133,9
C-CS1	73,8
55 H-275-Cys	137,7
CHV-92	92,7
Control (sin inmovilización de FNfr)	18,7
60 CH296	67,4
C-CS1	78,5
CHV-89	90,8
CHV-90	73,0
65 CHV-179	112,5
CHV-181	25,6

ES 2 356 814 T3

Como se muestra en la tabla 7, en el grupo en el que se usó equipo de cultivo (placa, botella) con el fragmento de fibronectina inmovilizado durante la inducción y la expansión de los CTL, los CTL mantuvieron una actividad citotóxica específica alta incluso después de la expansión. Por otra parte, en el control en el que se usó equipo de cultivo sin inmovilización con el fragmento de fibronectina durante la inducción y expansión de los CTL, la actividad citotóxica claramente disminuyó. En otras palabras se aclaró que los CTL se podían expandir en un estado en el que se mantuviera una alta actividad citotóxica durante un periodo de tiempo largo, comparable a la del fragmento disuelto en el medio, usando el fragmento de fibronectina inmovilizado.

10 Ejemplo 7

Relación de contenido de células CD8 positivas en una población celular después de la expansión de CTL

(1) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

15 La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

(2) Determinación de la relación de contenido de células CD8 positivas en CTL expandidos

25 Se expandieron los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 7 de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Se determinó la relación de contenido de células CD8 positivas para los CTL después de la expansión así obtenidos de la misma manera que en el punto (4) del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 8.

30 TABLA 8

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células CD8 positivas (%)
Control (sin adición de FNfr)	40,9
CH-296	85,1
CH-271	72,1
H-271	83,9
Control (sin adición de FNfr)	75,4
H-296	87,2
C-CS1	86,5
Control (sin adición de FNfr)	33,4
CHV-90	72,9
CHV-92	51,6
CHV-179	57
CHV-181	63,5

Como se muestra en la tabla 8, en todos los grupos con adición de varios fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión de los CTL, se observó un aumento en la relación del contenido de células CD8 positivas en la población celular después de la expansión.

En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían expandir con proliferación significativa de células CD8 positivas llevando a cabo la inducción y la expansión de CTL en presencia del fragmento de fibronectina.

65

ES 2 356 814 T3

Ejemplo 8

Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2 en CTL inducidos en presencia de un fragmento de fibronectina inmovilizado

5

(1) *Inmovilización del fragmento de FN*

Se inmovilizó un fragmento de fibronectina a un equipo de cultivo (recipiente) de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 6.

10

(2) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo según el método descrito en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC aisladas y almacenadas según el método descrito en el punto (1) del ejemplo 1. Durante la inducción, se usó una placa con FNfr inmovilizado preparada en el punto (1) del ejemplo 8 como equipo de cultivo (para control, se usó una placa sin tratamiento de inmovilización). La actividad citotóxica de los CTL después de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la inmovilización de FNfr a la placa durante la inducción.

20

(3) *Expansión de CTL*

Se expandieron los CTL preparados en el punto (2) del ejemplo 8 de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Durante la expansión, se usó una botella con FNfr inmovilizado a la misma preparada en el punto (1) del ejemplo 8 como equipos de cultivo (para control, se usó una placa sin tratamiento de inmovilización). Además, como medio se usó 10HycloneRPMI.

25

Se determinó la relación de células con expresión positiva de IL-2R de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 2 para los CTL antes y después de la expansión así obtenida.

30

Los resultados de determinación se muestran en la tabla 9

35

TABLA 9

40

45

50

55

60

65

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R antes de la expansión (%)	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R después de la expansión (%)
Control (sin inmovilización de FNfr)	14,4	6,8
CH-296	68,1	34,0
CH-271	28,3	14,7
H-296	21,3	22,9
C-274	30,3	20,5
C-CS1	56,8	34,1
H-275-Cys	43,6	17,2
CHV-89	34,6	36,8
CHV-90	47,3	29,1
CHV-92	37,2	13,0
CHV-179	52,3	16,3
CHV-181	37,4	18,3

ES 2 356 814 T3

5 Como se muestra en la tabla 9 para CTL, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo (placa, botella) con el fragmento de fibronectina inmovilizado durante la inducción y la expansión de CTL, se observó un aumento en la relación de expresión de IL-2R comparada con la del grupo control tanto antes como después de la expansión. En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían expandir manteniendo un nivel de expresión alto de IL-2R, comparable al del fragmento disuelto en el medio, usando el fragmento inmovilizado de fibronectina.

Ejemplo 9

10 *Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2 en la superficie de células CD8 positivas*

(1) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

15 La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de FNfr durante la inducción.

20 (2) *Determinación de la relación de expresión del receptor de interleuquina-2 en CTL*

25 Se determinó la relación de la expresión del receptor de interleuquina-2 (IL-2R) en los CTL (en especial en la superficie de células CD8 positivas) preparados en el punto (1) del ejemplo 9 el decimocuarto día desde el inicio de la inducción según el método descrito en el punto (4) del ejemplo 1. Aquí, en este procedimiento, se usó un anticuerpo de ratón anti-CD8 humano marcado con FITC como anticuerpo primario, y se usó un anticuerpo de ratón anti-IL-2R (CD25) humano marcado con PE (fabricado por DAKO) como anticuerpo secundario. Los resultados se muestran en la tabla 10.

30 **TABLA 10**

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de población celular positiva doble CD8/IL-2R (%)
Control (sin adición de FNfr)	30,7
CH-296	56,8

45 Como se muestra en la tabla 10, en los CTL inducidos con adición de varios fragmentos de fibronectina, se observó un aumento en la relación de expresión de IL-2R en la población de células CD8 positivas. En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían inducir con aumento en el nivel de expresión de IL-2R en la superficie de células CD8 llevando a cabo la inducción en copresencia del fragmento de fibronectina.

50 Ejemplo 10

Relaciones de contenido de células CD8 positivas en una población celular antes y después de la expansión de CTL (Comparación de fibronectina con fragmentos de fibronectina)

55 (1) *Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe*

60 La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de fibronectina y FNfr durante la inducción.

65

ES 2 356 814 T3

(2) Determinación de la relación de contenido de células CD8 positivas en CTL expandidos

Los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 10 se expandieron de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Se determinó la relación de contenido de células CD8 positivas para los CTL antes y después de la expansión así obtenida de la misma manera que en el punto (4) del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 11.

TABLA 11

	Relación de contenido de células CD8 positivas antes de la expansión (%)	Relación de contenido de células CD8 positivas después de la expansión (%)
Control (Sin adición de FNfr)	50,5	31,2
Fibronectina	67,3	22,5
H-271	75,1	51,3
CHV-90	71,3	43,5

Como se muestra en la tabla 11, en todos los grupos con adición de varios fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión de CTL, se observó un aumento en la relación de contenido de células CD8 positivas en la población celular antes de la expansión y después de la expansión comparada con la del grupo control.

En otras palabras, se aclaró que se podían expandir favorablemente CTL con proliferación significativa de células CD8 positivas tanto antes de la expansión como después de la expansión llevando a cabo la inducción y expansión de CTL en presencia del fragmento de fibronectina comparado con la de fibronectina por si.

Ejemplo 11

Inducción de la expresión de IL-2R en una población celular antes y después de la expansión de CTL (Comparación de fibronectina con fragmentos de fibronectina)

(1) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de fibronectina y FNfr durante la inducción.

(2) Determinación de la relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R en CTL expandidos

Los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 11 se expandieron de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Se determinó la relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R para los CTL antes y después de la expansión así obtenida de la misma manera que en el punto (4) del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 12.

ES 2 356 814 T3

TABLA 12

	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R antes de la expansión (%)	Relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R después de la expansión (%)
5		
10		
15	Control (Sin adición de FNfr)	34,0
20	Fibronectina	15,3
	H-271	64,6
		50,6
		76,8

Como se muestra en la tabla 12, en todos los grupos con adición de fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión de CTL, se observó un aumento en la relación de contenido de células con expresión positiva de IL-2R en la población celular antes de la expansión y después de la expansión comparada con la del grupo control. Esta relación aumentada fue significativamente alta comparada con el grupo con la adición de fibronectina.

En otras palabras, se aclaró que se podían expandir favorablemente CTL con proliferación significativa de células con expresión positiva de IL-2R tanto antes de la expansión como después de la expansión llevando a cabo la inducción y expansión de CTL en presencia del fragmento de fibronectina comparado con la de fibronectina por si.

Ejemplo 12

Expansión de CTL (Comparación de fibronectina con fragmento de fibronectina)

(1) Inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe

La inducción de CTL de memoria anti-virus de la gripe se llevó a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 1 usando las PBMC que se aislaron y almacenaron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1. La actividad citotóxica de los CTL el decimocuarto día después del inicio de la inducción se evaluó de la misma manera que en el punto (3) del ejemplo 1. Como resultado, apenas hubo diferencias en la actividad citotóxica por la presencia o ausencia de la adición de fibronectina y FNfr durante la inducción.

(2) Expansión de CTL

Se expandieron los CTL preparados en el punto (2) del ejemplo 12 de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Además, se usó como medio 10HycloneRPMI.

Se evaluó el grado en que se mantuvo la actividad citotóxica de los CTL así expandidos comparada con la de antes de la expansión como "mantenimiento de la actividad citotóxica (%)".

Los resultados de la determinación se muestran en la tabla 13.

TABLA 13

	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/T = 3
60	Control (Sin adición de FNfr)
65	Fibronectina
	CH-271

ES 2 356 814 T3

Como se muestra en la tabla 13, los CTL del grupo con adición de fragmento de fibronectina durante la inducción y la expansión mantuvieron una actividad citotóxica específica alta incluso después de la expansión durante 14 días comparada con la del grupo control sin adición de fragmento de fibronectina. Además, su actividad era significativamente alta comparada con el grupo con la adición de fibronectina.

En otras palabras, se aclaró que los CTL se podían expandir favorablemente en un estado en el que se mantenía la alta actividad citotóxica durante un periodo de tiempo largo llevando a cabo la inducción y la expansión en copresencia del fragmento de fibronectina comparado con esa en copresencia de la fibronectina por sí.

Ejemplo 13

Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK (células citolíticas activadas por linfoquinas)

(1) Inmovilización de anticuerpo anti-CD3 humano y FN o fragmento de FN

Se inmovilizaron un anticuerpo anti-CD3 humano y fibronectina o fragmento de FN a un equipo de cultivo (recipiente) usado en el siguiente experimento. En concreto, se añadieron 1 ml (en el caso de una placa de 24 pocillos) o 2 ml (en el caso de una botella de 12,5 cm²) de PBS que contenía anticuerpo anti-CD3 humano (fabricado por Janssen-Kyowa) (concentración final 5 µg/ml) a una placa de cultivo de 24 pocillos o una botella de 12,5 cm² (fabricadas por Falcon). Durante la adición, se añadieron fibronectina o cada uno de los fragmentos de fibronectina (FNfr) enumerados en el ejemplo de preparación 1 al grupo con adición de fibronectina o fragmentos de FN de modo que se tuviera una concentración final de 10 µg/ml (en el caso de una placa de 24 pocillos) o 25 µg/ml (en el caso de una botella de 12,5 cm²). Como control, también se fijó un grupo sin adición de fibronectina y FNfr.

Después de incubar estos equipos de cultivo a temperatura ambiente durante 5 horas, los equipos de cultivo se almacenaron a 4°C hasta su uso. Inmediatamente antes de usar, se eliminó por aspiración el PBS que contenía el anticuerpo y FNfr de estos equipos de cultivo, y después de ello cada pocillo se lavó dos veces con PBS y después una vez con medio XVIVO20 (fabricado por Bio Whittaker) que contenía suero humano de tipo AB al 5% (fabricado por Bio Whittaker) y estreptomycin-penicilina al 1% (fabricado por Gibco BRL) (de aquí en adelante simplemente denominado 5HXVIVO20) y los equipos de cultivo se sometieron a cada experimento.

(2) Inducción y cultivo de células LAK

Las PBMC que se prepararon en el punto (1) del ejemplo 1 se resuspendieron en 5HXVIVO20 de modo que se tuviera una concentración de 0,5 a 1 x 10⁶ células/ml, y después de ello la suspensión se colocó en una placa con el anticuerpo anti-CD3 humano inmovilizado, o una placa con el anticuerpo anti-CD3 humano y fibronectina o FNfr inmovilizados preparadas en el punto (1) del ejemplo 13 en un volumen de 1 ml/pocillo y se añadió a la misma IL-2 (fabricada por Shionogi & Co., Ltd.) de modo que se tuviera una concentración final de 1000 U/ml. Estas placas se sometieron a cultivo a 37°C en CO₂ al 5% (día cero de cultivo). El segundo y tercer días desde el inicio del cultivo, se añadió 5HXVIVO20 que contenía IL-2 1000 U/ml en un volumen de 1 ml/pocillo. El cuarto día desde el inicio del cultivo, se transfirió un medio de cultivo adecuadamente diluido con 5HXVIVO20 a una botella nueva en la que no había nada inmovilizado y se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. Se siguió con el cultivo, el medio de cultivo se diluyó adecuadamente con 5HXVIVO20 cada 2 o 3 días de la misma manera que el quinto día desde el inicio del cultivo y se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 300 a 500 U/ml. Del séptimo al decimoquinto día desde el inicio del cultivo, se contó el número de células vivas mediante el método de tinción de azul de tripán y se calculó como nivel de expansión comparando el número con el número de células al inicio del cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 14.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 356 814 T3

TABLA 14

5	Número de días cultivados	FN/fragmento de FN	Nivel de expansión (veces)
	7 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x103
10		Fibronectina	x233
		CH-296	x218
		H-296	x247
15	9 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x250
		Fibronectina	x1190
		CH-296	x1286
20		H-296	x1075
	11 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x576
		Fibronectina	x2304
25		CH-296	x1728
		H-296	x2088
		Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x660
30		C-CS1	x1170
	15 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x1980
		Fibronectina	x3348
35		CH-296	x5364
		Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x2906
40		C-CS1	x5117

Como se muestra en la tabla 14, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado en una fase temprana de la inducción de células LAK, el nivel de expansión de las células LAK es alto comparado con la del grupo control. Además, el nivel de expansión del grupo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado fue mayor que el grupo que usaba el equipo de cultivo con fibronectina inmovilizada el decimoquinto día desde el inicio del cultivo. Por tanto, se aclaró que en el caso donde la expansión se lleva a cabo durante un periodo de tiempo largo, la inducción y cultivo de células LAK se llevan a cabo adecuadamente en incluso un nivel de expansión mayor por la copresencia del fragmento de fibronectina en una fase temprana de la inducción de células LAK comparada con la de fibronectina por sí.

Ejemplo 14

55 *Determinación de la relación de proliferación en un sistema de cultivo de células LAK*

(1) Inducción y cultivo de células LAK

60 La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 13. Se calculó la relación de proliferación de las células desde el cuarto día al séptimo día desde el inicio del cultivo durante esta fase. Los resultados se muestran en la tabla 15.

65

ES 2 356 814 T3

TABLA 15

Número de células al inicio del cultivo	Fragmento de fibronectina	Relación de proliferación del 4° día al 7° día (veces)
5 x 10 ⁵ células/ml	Control (sin inmovilización de FNfr)	2,7 veces
	CH-296	16,9 veces
1 x 10 ⁶ células/ml	Control (sin inmovilización de FNfr)	33,5 veces
	H-296	49,5 veces
1 x 10 ⁶ células/ml	Control (sin inmovilización de FNfr)	6,2 veces
	CH-296	20,4 veces
1 x 10 ⁶ células/ml	Control (sin inmovilización de FNfr)	23,5 veces
	H-296	43,5 veces

Como se muestra en la tabla 15, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado en una fase temprana de la inducción de células LAK, la relación de proliferación de células LAK del cuarto día al séptimo día del inicio del cultivo es alta comparada con la del grupo control. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK a una velocidad de proliferación más rápida por la copresencia del fragmento de fibronectina en una fase temprana de la inducción de células LAK.

Ejemplo 15

Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK (Inducción y cultivo de células LAK a partir de un bajo número de células)

(1) Inducción y cultivo de células LAK

La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 13. Durante esta fase la concentración de células al inicio del cultivo se ajustó de modo que se tuviera una concentración de 2 x 10⁵ a 1 x 10⁶ células/ml (de 1 x 10⁵ a 5 x 10⁵ células/cm²). El decimoquinto día desde el inicio del cultivo, se contó el número de células vivas por el método de tinción con azul de tripán, y se calculó el nivel de expansión comparado con el del número de células al inicio del cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 16.

TABLA 16

Número de células al inicio del cultivo	Fragmento de fibronectina	Nivel de expansión (veces)
2 x 10 ⁵ céls/ml (1 x 10 ⁵ céls/cm ²)	Control (sin inmovilización de FNfr)	x48,6
	CH-296	x1004
5 x 10 ⁵ céls/ml (2,5 x 10 ⁵ céls/cm ²)	Control (sin inmovilización de FNfr)	x438
	CH-296	x1094
1 x 10 ⁶ céls/ml (5 x 10 ⁵ céls/cm ²)	Control (sin inmovilización de FNfr)	x1020
	CH-296	x1476

Como se muestra en la tabla 16, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo inmovilizado con cada uno de los fragmentos de fibronectina durante la inducción de células LAK, se obtuvo un alto nivel de expansión el decimoquinto día desde el inicio del cultivo, independientemente del número de células al inicio del cultivo. Por el contrario, en

ES 2 356 814 T3

el grupo control el nivel de expansión el decimoquinto día desde el inicio del cultivo fue bajo cuando el número de células al inicio del cultivo era bajo. En otras palabras, se aclaró que las células LAK se podían inducir y cultivar a un nivel de expansión alto por la copresencia del fragmento de fibronectina durante la inducción de células LAK a partir de un bajo número de células, independientemente del número de células al inicio del cultivo.

5

Ejemplo 16

10 *Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK (Inducción y cultivo de células LAK a partir de un bajo número de células/Cultivo sin procedimientos de dilución)*

(1) Inducción y cultivo de células LAK

15 Las PBMC que se prepararon en el punto (1) del ejemplo 1 se resuspendieron en 5HXVIVO20 de modo que se tuviera una concentración de 1×10^4 células/ml, y después de ello la suspensión se colocó en una placa con el anticuerpo anti-CD3 humano inmovilizado, o una placa de 6 pocillos con el anticuerpo anti-CD3 humano y fibronectina o FNfr inmovilizados preparadas de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 13 en un volumen de 1 ml/pocillo. Se añadieron a la misma cuatro mililitros de 5HXVIVO20 (1×10^3 células/cm²), y se añadió a la misma IL-2 (fabricada por Shionogi & Co., Ltd.) de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. Estas placas se sometieron a 20 cultivo a 37°C en CO₂ al 5% (día cero de cultivo). El segundo, tercer y cuarto días desde el inicio del cultivo, se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. Se siguió con el cultivo, y se añadió IL-2 cada dos o tres días de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml desde el séptimo día y siguientes desde el inicio del cultivo. Durante la adición, no se llevó a cabo el procedimiento de dilución del medio de cultivo.

25 El decimoquinto día desde el inicio del cultivo se contó el número de células vivas por el método de tinción de azul de tripán y se calculó como un nivel de expansión comparando el número con el número de células al inicio del cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 17.

30

TABLA 17

Número de días cultivados	FN/fragmento de FN	Nivel de expansión (veces)
15 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	x15
	Fibronectina	x628
	CH-296	x773
	H-296	x960

45

50 Como se muestra en la tabla 17, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado durante la inducción de células LAK a partir del número bajo de células, se obtuvo un alto nivel de expansión el decimoquinto día desde el inicio del cultivo, sin requerir el procedimiento de dilución de las células durante el curso de la inducción. Además, este nivel de expansión fue alto incluso cuando se comparó con el grupo que usaba el equipo de cultivo con fibronectina inmovilizada. Por el contrario, en el grupo control las células apenas proliferaron incluso el decimoquinto día desde el inicio del cultivo. En otras palabras, se aclaró que las células LAK se podían inducir y cultivar a un nivel de expansión alto por la copresencia de fibronectina o del fragmento de fibronectina, preferiblemente el fragmento de fibronectina, durante la inducción de células LAK a partir de un bajo número de células, sin requerir el procedimiento de dilución.

55

Ejemplo 17

60 *Inducción de la expresión de IL-2R en células LAK*

(1) Inducción y cultivo de células LAK

65 La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 13.

ES 2 356 814 T3

(2) Determinación de la relación de la expresión de IL-2R en células LAK

Se determinó la relación de la expresión de IL-2R en las células LAK que se sometieron a inducción y cultivo en el punto (1) del ejemplo 17 según el método descrito en el punto (2) del ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 18. En la tabla, se muestra la relación del contenido de las células de expresión positiva de IL-2R (%) como relación de la expresión de IL-2R (%).

TABLA 18

Número de días cultivados	FN/fragmento de FN	Relación de la expresión de IL-2R (%)
4 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	86,5
	Fibronectina	97,2
	CH-296	97,6
	H-296	97,7
7 días	C-CS1	94,9
	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	59,3
	Fibronectina	77,6
	CH-296	90,4
30	H-296	89,1
	C-CS1	65,8

Como se muestra en la tabla 18, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado en una fase temprana de la inducción de células LAK, se obtuvo una relación alta de expresión de IL-2R en la superficie de células LAK. Además, esta relación de la expresión de IL-2R fue alta incluso cuando se comparó con el grupo que usaba el equipo de cultivo con fibronectina inmovilizada. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con una relación de expresión de IL-2R que era favorablemente mayor que la de la fibronectina por sí por la copresencia del fragmento de fibronectina durante la inducción de células LAK.

Ejemplo 18

Inducción de la expresión de IL-2R en células LAK

(1) Inducción y cultivo de células LAK

La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 13.

(2) Determinación de la relación de la expresión de IL-2R en células LAK

Se determinó la relación de la expresión de IL-2R en las superficies de células CD4 y células CD8 en las células LAK que se indujeron y cultivaron en el punto (1) del ejemplo 18 el séptimo día según el método descrito en el punto (2) del ejemplo 9. Aquí, en este procedimiento, se usó un anticuerpo de ratón anti-CD4 humano marcado con FITC o un anticuerpo de ratón anti-CD8 humano marcado con FITC como anticuerpo primario, y se usó un anticuerpo de ratón anti-IL-2R (CD25) humano marcado con PE como anticuerpo secundario. Los resultados se muestran en la tabla 19.

ES 2 356 814 T3

TABLA 19

	Relación de contenido de células positivas dobles CD4/IL-2R (%)	Relación de contenido de células positivas dobles CD8/IL-2R (%)
5		
10		
	Control (Sin inmovilización de FN/FNfr)	20,5 49,4
15	CH-296	41,2 61,6
	C-CS1	24,4 54,6

20
25 Como se muestra en la tabla 19, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado en una fase temprana de la inducción de células LAK, se pudo inducir una relación alta de expresión de IL-2R en la superficie de células LAK (tanto células CD4 positivas como CD8 positivas) durante el cultivo. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con una relación alta de expresión de IL-2R en las superficies celulares tanto de células CD4 positivas como CD8 positivas por la copresencia del fragmento de fibronectina durante la inducción de células LAK.

30 Ejemplo 19

Relación de contenido de células CD8 positivas en una población de células LAK

(1) Inducción y cultivo de células LAK

35 La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 13.

(2) Determinación de la relación de contenido de una población de células CD8 positivas en células LAK

40 Se determinó la relación de contenido de células CD8 positivas en las células LAK que se indujeron y cultivaron en el punto (1) del ejemplo 19 el decimoquinto día según el método descrito en el punto (4) del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 20.

TABLA 20

	Relación de contenido de células CD8 positivas (%)
50	
	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)
55	42,9
	CH-296
	72,1
	H-296
	76,0

60 Como se muestra en la tabla 20, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo con cada uno de los fragmentos de fibronectina inmovilizado en una fase temprana de inducción de células LAK, se pudo inducir una alta relación de contenido de células CD8 positivas en células LAK durante el cultivo. En otras palabras, se aclaró que las células LAK se podían inducir y cultivar con una alta relación de contenido de células CD8 positivas en células LAK por la copresencia del fragmento de fibronectina durante la inducción de las células LAK.

ES 2 356 814 T3

Ejemplo 21

Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK

5 (1) *Inducción y cultivo de células LAK*

Las PBMC que se prepararon en el punto (1) del ejemplo 1 se resuspendieron en 5HXVIVO20 de modo que se tuviera una concentración de 0,5 a 1 x 10⁶ células/ml, y después de ello la suspensión se colocó en una placa con el anticuerpo anti-CD3 humano inmovilizado, o una placa con el anticuerpo anti-CD3 humano y FNfr inmovilizados preparadas en el punto (1) del ejemplo 13 en un volumen de 1 ml/pocillo y se añadió a la misma IL-2 (fabricada por Shionogi & Co., Ltd.) de modo que se tuviera una concentración final de 1000 U/ml. Estas placas se sometieron a cultivo a 37°C en CO₂ al 5% (día cero de cultivo). El segundo y tercer días desde el inicio del cultivo, se añadió 5HXVIVO20 que contenía IL-2 1000 U/ml en un volumen de 1 ml/pocillo. El cuarto día desde el inicio del cultivo, se transfirió un medio de cultivo adecuadamente diluido con 5HXVIVO20 a una botella nueva en la que no había nada inmovilizado y se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. El octavo o noveno día desde el inicio del cultivo, un medio de cultivo diluido adecuadamente con 5HXVIVO20 se transfirió a un botella con el anticuerpo anti-CD3 humano inmovilizado o una botella con el anticuerpo anti-CD3 humano y FNfr inmovilizados (siempre que la concentración del anticuerpo anti-CD3 humano usado en la inmovilización fuera 0,5 µg/ml) preparada de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 13, y se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. El undécimo día o el duodécimo día desde el inicio del cultivo, se transfirió un medio de cultivo adecuadamente diluido otra vez con 5HXVIVO20 a una botella nueva en la que no había nada inmovilizado y se añadió IL-2 de modo que se tuviera una concentración final de 500 U/ml. El decimoquinto día desde el inicio del cultivo se contó el número de células vivas por el método de tinción de azul de tripán y se calculó como un nivel de expansión comparando el número con el número de células en el inicio del cultivo. Los resultados se muestran en las tablas 21 y 22. En la tabla, “donante” indica donantes de PBMC.

TABLA 21

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 8° día desde el inicio del cultivo	Nivel de expansión (veces)
A	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	x80
		Anti-CD3	Anti-CD3	x38
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	x1452
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	x1620
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	x2700
B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	x710
		Anti-CD3	Anti-CD3	x2363
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	x504
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	x5468
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	x14243
C	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	x1805
		Anti-CD3	Anti-CD3	x4200
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	x35700
	H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	x16950

65

ES 2 356 814 T3

TABLA 22

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9° día desde el inicio del cultivo	Nivel de expansión (veces)	
5					
10	B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	x2074
			Anti-CD3	Anti-CD3	x2880
15		CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	x38400
		CH-271	Anti-CD3+CH-271	Anti-CD3+CH-271	x12672
		H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	x67584
		H-271	Anti-CD3+H-271	Anti-CD3+H-271	x8755
20		C-274	Anti-CD3+C-274	Anti-CD3+C-274	x8525
		C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	x9677
		CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	x10138
25		CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	x8294
		CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	x5760

30 Como se muestra en las tablas 21 y 22, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo en el que se inmovilizaron repetidamente los fragmentos de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK, el nivel de expansión de células LAK es alto comparado con el del grupo control. Estas relaciones de expansión eran mucho mayores que el nivel de expansión en el grupo que usaba el equipo de cultivo en el que solo se inmovilizó repetidamente el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con un nivel mayor de expansión mediante estimulación usando el fragmento de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de las células LAK.

40 Ejemplo 21

Determinación de la relación de proliferación en un sistema de cultivo de células LAK

(1) *Inducción y cultivo de células LAK*

45 La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que la del punto (1) del ejemplo 20. Se calculó la relación de proliferación de las células desde el cuarto día al octavo día desde el inicio del cultivo y la relación de proliferación de las células desde el undécimo día al decimoquinto día desde inicio del cultivo durante los procedimientos. Los resultados se muestran en las tablas 23 y 24.

TABLA 23

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 8° día desde el inicio del cultivo	Relación de proliferación del 11° al 15° días (veces)	
55					
60	A	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	6,7 veces
			Anti-CD3	Anti-CD3	8,3 veces
65		CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	2,6 veces

ES 2 356 814 T3

			Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	5,5 veces
			Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	11,1 veces
5	B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	7,4 veces
			Anti-CD3	Anti-CD3	17,5 veces
10		CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	0,9 veces
			Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	19,8 veces
			Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	60,3 veces
15	C	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	5,2 veces
			Anti-CD3	Anti-CD3	22,2 veces
20		CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	94,0 veces
		H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	35,0 veces

TABLA 24

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9° día desde el inicio del cultivo	Relación de proliferación del 11° al 15° días (veces)	
35	B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	5,7 veces
			Anti-CD3	Anti-CD3	15,6 veces
40		CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	55,6 veces
		CH-271	Anti-CD3+CH-271	Anti-CD3+CH-271	25,0 veces
		H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	88,9 veces
45		H-271	Anti-CD3+H-271	Anti-CD3+H-271	23,8 veces
		C-274	Anti-CD3+C-274	Anti-CD3+C-274	61,7 veces
		C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	28,0 veces
50		CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	44,0 veces
		CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	32,7 veces
		CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	41,7 veces

Como se muestra en las tablas 23 y 24, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo en el que se inmovilizaron repetidamente cada uno de los fragmentos de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK, la relación de proliferación de células LAK fue alta en una fase posterior de la inducción comparada con la del grupo control. Estas relaciones de proliferación fueron mucho mayores que la relación de proliferación de células LAK en la fase posterior de la inducción en el grupo que usaba el equipo de cultivo en el que solo se inmovilizó repetidamente el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con una relación de proliferación mayor mediante estimulación usando el fragmento de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de las células LAK.

ES 2 356 814 T3

Ejemplo 22

Inducción de la expresión de IL-2R en células LAK

5 (1) *Inducción y cultivo de células LAK*

La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que la del punto (1) del ejemplo 20.

10

(2) *Determinación de la relación de expresión de IL-2R en células LAK*

15 Se determinó la relación de expresión de IL-2R en células LAK que se sometieron a inducción y cultivo en el punto (1) del ejemplo 22 el decimoquinto día según el método descrito en el punto (2) del ejemplo 2. Los resultados se muestran en las tablas 25 y 26. En las tablas, la relación de contenido de las células de expresión positiva de IL-2R (%) se muestra como relación de expresión de IL-2R (%).

20 TABLA 25

Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9° día desde el inicio del cultivo	Relación de expresión de IL-2R ()
Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	4,8
	Anti-CD3	Anti-CD3	32,6
CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	2,5
	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	72,3
	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-96	94,7
H-296	Anti-CD3+H-296	Ninguna	1,4
	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3	50,2
	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-96	89,6

40

TABLA 26

Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9° día desde el inicio del cultivo	Relación de expresión de IL-2R (%)
Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	4,8
	Anti-CD3	Anti-CD3	18,0
CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	84,0
CH-271	Anti-CD3+CH-271	Anti-CD3+CH-271	67,1
H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	79,9
H-271	Anti-CD3+H-271	Anti-CD3+H-271	51,6
C-274	Anti-CD3+C-274	Anti-CD3+C-274	66,4
C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	72,5
CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	52,6
CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	63,4
CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	68,3

65

ES 2 356 814 T3

Como se muestra en las tablas 25 y 26, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo en el que se inmovilizaron repetidamente cada uno de los fragmentos de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK, la relación de expresión de IL-2R en la superficie de células LAK el decimoquinto día desde inicio del cultivo fue alta comparada con la del control. Estas relaciones de expresión de IL-2R fueron mucho mayores que las relaciones de proliferación en el grupo que usaba el equipo de cultivo en el que solo se inmovilizó repetidamente el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con una relación de expresión de IL-2R mayor mediante estimulación usando el fragmento de fibronectina en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de las células LAK.

Ejemplo 23

Determinación de la relación de células CD8 positivas en células LAK

(1) Inducción y cultivo de células LAK

La inducción y el cultivo de células LAK se llevaron a cabo de la misma manera que la del punto (1) del ejemplo 20.

(2) Determinación de la relación de contenido de células CD8 positivas en una población de células LAK

Se determinó la relación de contenido de células CD8 positivas en la población de células LAK que se sometieron a inducción y cultivo en el punto (1) del ejemplo 23 el decimoquinto día según el método descrito en el punto (4) del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 27.

TABLA 27

Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 8° día desde el inicio del cultivo	Relación de contenido de células CD8 positivas (%)
Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	42,9
	Anti-CD3	Anti-CD3	55,2
	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	72,1
CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	85,2
	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-96	75,9
	Anti-CD3+H-296	Ninguna	76,0
H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3	82,0
	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-96	77,1
	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-96	77,1

Como se muestra en la tabla 27, en el grupo en que se usó el equipo de cultivo en el que se inmovilizaron repetidamente cada uno de los fragmentos de fibronectina y el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK, la relación de contenido de células CD8 positivas en la población de células LAK el decimoquinto día desde inicio del cultivo fue alta comparada con la del control. Estas relaciones de contenido de células CD8 positivas fueron mucho mayores que la relación de contenido de células CD8 positivas en el grupo que usaba el equipo de cultivo en el que solo se inmovilizó repetidamente el anticuerpo anti-CD3 en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de células LAK. En otras palabras, se aclaró que se podían inducir y cultivar células LAK con una relación de contenido de células CD8 positivas mayor mediante estimulación usando el fragmento de fibronectina en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de las células LAK.

Lista de secuencias. Texto libre

SEQ ID NO: 1; Región parcial de fibronectina llamada III-8.

SEQ ID NO: 2; Región parcial de fibronectina llamada III-9.

ES 2 356 814 T3

SEQ ID NO: 3; Región parcial de fibronectina llamada III-10.

SEQ ID NO: 4; Región parcial de fibronectina llamada III-12.

5 SEQ ID NO: 5; Región parcial de fibronectina llamada III-13.

SEQ ID NO: 6; Región parcial de fibronectina llamada III-14.

10 SEQ ID NO: 7; Región parcial de fibronectina llamada CS-1.

SEQ ID NO: 8; Fragmento de fibronectina llamado C-274.

SEQ ID NO: 9; Fragmento de fibronectina llamado H-271.

15 SEQ ID NO: 10; Fragmento de fibronectina llamado H-296.

SEQ ID NO: 11; Fragmento de fibronectina llamado CH-271.

20 SEQ ID NO: 12; Fragmento de fibronectina llamado CH-296.

SEQ ID NO: 13; Fragmento de fibronectina llamado C-CS1.

SEQ ID NO: 14; Fragmento de fibronectina llamado CHV-89.

25 SEQ ID NO: 15; Fragmento de fibronectina llamado CHV-90.

SEQ ID NO: 16; Fragmento de fibronectina llamado CHV-92.

30 SEQ ID NO: 17; Fragmento de fibronectina llamado CHV-179.

SEQ ID NO: 18; Fragmento de fibronectina llamado CHV-181.

SEQ ID NO: 19; Fragmento de fibronectina llamado H-275-Cys.

35 SEQ ID NO: 20; Cebador 12S

SEQ ID NO: 21; Cebador 14A.

40 SEQ ID NO: 22; Cebador Cys-A

SEQ ID NO: 23; Cebador Cys-S

SEQ ID NO: 24; Péptido diseñado basado en proteína de matriz derivada del virus de la gripe.

45

Aplicabilidad industrial

50 Según el proceso descrito aquí para preparar un linfocito citotóxico se obtiene un linfocito citotóxico en el que se mantiene una alta actividad citotóxica, el nivel de expresión de IL-2R aumenta significativamente y la relación de células CD8 positivas mejora. El linfocito se usa de forma adecuada, por ejemplo, en inmunoterapia adoptiva. Por tanto, se espera una gran contribución del proceso descrito aquí al campo médico.

55

60

65

ES 2 356 814 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar un linfocito citotóxico o una preparación de linfocitos citotóxicos en donde dicho método comprende el paso de llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 está inmovilizado en una fase sólida.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en donde la fase sólida es un equipo de cultivo celular o un soporte de cultivo celular.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en donde el equipo de cultivo celular es una placa de petri, una botella o una bolsa y el soporte de cultivo celular es bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio.
- 25 5. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico se lleva a cabo en un medio que contiene el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- 30 6. El método según la reivindicación 1 que comprende llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 en un equipo de cultivo celular que contiene un medio, en donde el método satisface cualquiera de las condiciones de:
- 35 (a) una relación de células al inicio del cultivo respecto a un área de cultivo en el equipo de cultivo es de 1 célula/cm² a 5 x 10⁵ células/cm²; y
- 40 (b) una concentración de células en un medio al inicio del cultivo es de 1 célula/ml a 5 x 10⁵ células/ml.
- 45 7. El método según la reivindicación 6, en donde el método excluye un paso de dilución o un paso de intercambio del equipo de cultivo.
- 50 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además el paso de transducir un gen exógeno en un linfocito citotóxico.
- 55 9. El método según la reivindicación 8, en donde el gen exógeno se transduce usando un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus simio.
- 60 10. Un método *in vitro* para aumentar la expresión del receptor de interlequina-2 de una célula, para mejorar una relación de células CD8 positivas en una población de linfocitos citotóxicos o para mejorar o mantener la actividad citotóxica en un linfocito citotóxico **caracterizado** en que el método comprende el paso de llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- 65

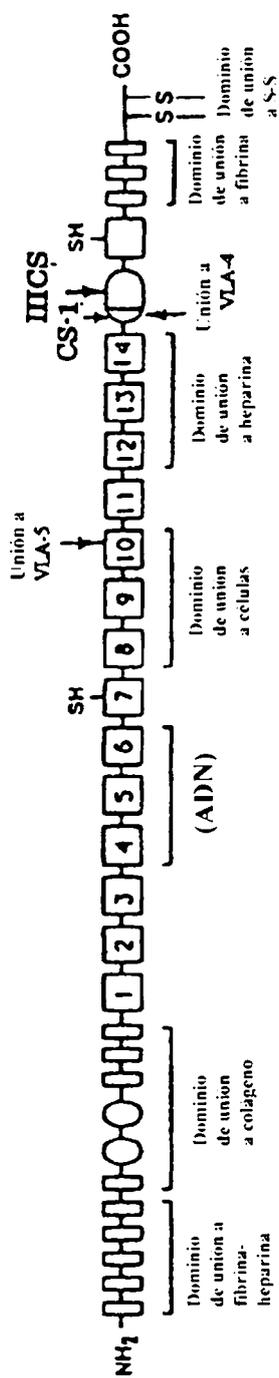


FIG. 1

- Secuencia de repetición de tipo I
- Secuencia de repetición de tipo II
- Secuencia de repetición de tipo III

ES 2 356 814 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TAKARA BIO INC.

5 <120> Proceso para la preparación de linfocito que tiene actividad citotóxica

<130> 03-021-PCT

10 <150> JP 2002-84414

<151> 2002-03-25

<160> 24

15

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Región parcial de fibronectina llamada III-8

<400> 1

30

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

35

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20

25

30

40

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35

40

45

45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50

55

60

50

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65

70

75

55

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr

80

85

<210> 2

<211> 90

60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Región parcial de fibronectina llamada III-9

ES 2 356 814 T3

<400> 2

5 Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala
 1 5 10 15
 10 Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr
 20 25 30
 15 Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro
 35 40 45
 20 Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr
 50 55 60
 25 Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu
 65 70 75
 30 Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr
 80 85 90

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Región parcial de fibronectina llamada III-10

<400> 3

45 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 50 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg
 20 25 30
 55 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val
 35 40 45
 60 Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser
 50 55 60
 65 Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
 65 70 75

ES 2 356 814 T3

<400> 5

```

5      Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
      1              5              10              15
      Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
      20              25              30
10     Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile
      35              40              45
      Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly
15     50              55              60
      Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn
      65              70              75
20     Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
      80              85

```

25 <210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Región parcial de fibronectina llamada III-14

35 <400> 6

```

40     Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro
      1              5              10              15
      Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
      20              25              30
45     Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
      35              40              45
50     Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr
      50              55              60
55     Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
      65              70              75
60     Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
      80              85              90

```

65 <210> 7

<211> 25

ES 2 356 814 T3

		65		70		75
5	His Glu Ser Thr	Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp				
		80		85		90
10	Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe					
		95		100		105
15	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg					
		110		115		120
20	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp					
		125		130		135
25	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr					
		140		145		150
30	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg					
		155		160		165
35	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp					
		170		175		180
40	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu					
		185		190		195
45	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg					
		200		205		210
50	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe					
		215		220		225
55	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
		230		235		240
60	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg					
		245		250		255
65	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg					
		260		265		270
	Thr Glu Ile Asp					

ES 2 356 814 T3

<210> 9

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado H-271

10

<400> 9

15		Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gln	Val	Thr	Pro
		1				5					10					15
		Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr
						20					25					30
20		Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
						35					40					45
		Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
25						50					55					60
		Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
						65					70					75
30		Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr
						80					85					90
		Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 356 814 T3

		95		100		105									
5	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
		110		115		120									
10	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr
		125		130		135									
15	Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile
		140		145		150									
20	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr
		155		160		165									
25	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Ser
		170		175		180									
30	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr
		185		190		195									
35	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile
		200		205		210									
40	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
		215		220		225									
45	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile
		230		235		240									
50	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala
		245		250		255									
55	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Lys
		260		265		270									
	Thr														

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado H-296

ES 2 356 814 T3

<400> 10

5	Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro			
	1	5	10	15
10	Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr			
		20	25	30
15	Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met			
		35	40	45
20	Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser			
		50	55	60
25	Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu			
		65	70	75
30	Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr			
		80	85	90
35	Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala			
		95	100	105
40	Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr			
		110	115	120
45	Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr			
		125	130	135
50	Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile			
		140	145	150
55	Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr			
		155	160	165
60	Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser			
		170	175	180
65	Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr			
		185	190	195

ES 2 356 814 T3

5 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 10 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240
 15 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255
 20 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 25 Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu
 275 280 285
 30 His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 290 295

35 <210> 11
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CH-271
 45 <400> 11

50 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 55 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 60 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 65 50 55 60

ES 2 356 814 T3

	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
5		65	70 75
	His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
10		80	85 90
	Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
15		95	100 105
	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
20		110	115 120
	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
25		125	130 135
	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
30		140	145 150
	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
35		155	160 165
	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
40		170	175 180
	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
45		185	190 195
	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
50		200	205 210
	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
55		215	220 225
	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
60		230	235 240
	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
65		245	250 255
	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
		260	265 270

ES 2 356 814 T3

5	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp	275	280	285
10	Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp	290	295	300
15	Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr	305	310	315
20	Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro	320	325	330
25	Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys	335	340	345
30	Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg	350	355	360
35	Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro	365	370	375
40	Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile	380	385	390
45	Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp	395	400	405
50	Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys	410	415	420
55	Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr	425	430	435
60	Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser	440	445	450
65	Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser	455	460	465

ES 2 356 814 T3

Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
 470 475 480
 5 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr
 485 490 495
 10 Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
 500 505 510
 15 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
 515 520 525
 20 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
 530 535 540
 25 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 545

30 <210> 12

<211> 574

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado CH-296

40 <400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 45 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 50 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 55 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 60 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

ES 2 356 814 T3

		80		85		90
5	Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe					
		95		100		105
10	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg					
		110		115		120
15	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp					
		125		130		135
20	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr					
		140		145		150
25	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg					
		155		160		165
30	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp					
		170		175		180
35	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu					
		185		190		195
40	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg					
		200		205		210
45	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe					
		215		220		225
50	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
		230		235		240
55	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg					
		245		250		255
60	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg					
		260		265		270
65	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp					
		275		280		285
70	Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp					
		290		295		300

ES 2 356 814 T3

	Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
5		305	310 315
	Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
10		320	325 330
	Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
15		335	340 345
	Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
20		350	355 360
	Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
25		365	370 375
	Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
30		380	385 390
	Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
35		395	400 405
	Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
40		410	415 420
	Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
45		425	430 435
	Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
50		440	445 450
	Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
55		455	460 465
	Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
60		470	475 480
	Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
65		485	490 495
	Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
		500	505 510

ES 2 356 814 T3

5 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
 515 520 525
 10 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
 530 535 540
 15 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu
 545 550 555
 20 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp
 560 565 570
 25 Val Pro Ser Thr

<210> 13
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado C-CS1
 <400> 13

35 Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 40 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 45 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 50 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 60 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 65 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105

ES 2 356 814 T3

	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
		110	115 120
5	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
		125	130 135
10	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
		140	145 150
15	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
		155	160 165
20	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
		170	175 180
25	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
		185	190 195
30	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
		200	205 210
35	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
		215	220 225
40	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
		230	235 240
45	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
		245	250 255
50	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
		260	265 270
55	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
		275	280 285
60	Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
		290	295 300
	Ser Thr		

<210> 14

65 <211> 367

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 356 814 T3

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-89

5 <400> 14

	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
10	1			5						10					15
	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
15				20						25					30
	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
20				35						40					45
	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
25				50						55					60
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
30				65						70					75
	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
35				80						85					90
	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
40				95						100					105
	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
45				110						115					120
	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
50				125						130					135
	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
55				140						145					150
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
60				155						160					165
	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
65				170						175					180

ES 2 356 814 T3

	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
5		185	190 195
	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
10		200	205 210
	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
15		215	220 225
	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
20		230	235 240
	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
25		245	250 255
	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
30		260	265 270
	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
35		275	280 285
	Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
40		290	295 300
	Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
45		305	310 315
	Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
50		320	325 330
	Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
55		335	340 345
	Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
60		350	355 360
	Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
65		365	

<210> 15

65 <211> 368

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 356 814 T3

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-90

5 <400> 15

	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
10	1				5					10					15
	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
15					20					25					30
	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
20					35					40					45
	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
25					50					55					60
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
30					65					70					75
	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
35					80					85					90
	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
40					95					100					105
	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
45					110					115					120
	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
50					125					130					135
	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
55					140					145					150
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
60					155					160					165
	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
65					170					175					180

ES 2 356 814 T3

	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
5		185	190 195
	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
10		200	205 210
	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
15		215	220 225
	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
20		230	235 240
	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
25		245	250 255
	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
30		260	265 270
	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn		
35		275	280 285
	Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp		
40		290	295 300
	Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
45		305	310 315
	Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
50		320	325 330
	Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu		
55		335	340 345
	Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu		
60		350	355 360
	Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
		365	

<210> 16

<211> 370

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 356 814 T3

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-92

5 <400> 16

	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
10	1				5					10					15
	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
15					20					25					30
	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
20					35					40					45
	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
25					50					55					60
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 356 814 T3

		65		70		75
5	His Glu Ser Thr	Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp				
		80		85		90
10	Ser Pro Thr Gly	Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe				
		95		100		105
15	Thr Val His Trp	Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg				
		110		115		120
20	Ile Arg His His	Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp				
		125		130		135
25	Arg Val Pro His	Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr				
		140		145		150
30	Pro Gly Thr Glu	Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg				
		155		160		165
35	Glu Glu Ser Pro	Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp				
		170		175		180
40	Val Pro Arg Asp	Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu				
		185		190		195
45	Leu Ile Ser Trp	Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg				
		200		205		210
50	Ile Thr Tyr Gly	Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe				
		215		220		225
55	Thr Val Pro Gly	Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys				
		230		235		240
60	Pro Gly Val Asp	Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg				
		245		250		255
65	Gly Asp Ser Pro	Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg				

ES 2 356 814 T3

		250		265		270									
5	Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp
		275		280		285									
10	Leu	Lys	Phe	Thr	Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp
		290		295		300									
15	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr
		305		310		315									
20	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro
		320		325		330									
25	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys
		335		340		345									
30	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
		350		355		360									
35	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Glu					
		365		370											

40 <210> 17
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-179

50

55

60

65

ES 2 356 814 T3

<400> 17

5	Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
	1	5	10 15
10	Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
		20	25 30
15	Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
		35	40 45
20	Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
		50	55 60
25	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
		65	70 75
30	His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
		80	85 90
35	Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
		95	100 105
40	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
		110	115 120
45	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
		125	130 135
50	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
		140	145 150
55	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
		155	160 165
60	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
		170	175 180
65	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
		185	190 195

ES 2 356 814 T3

	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
5		200	205 210
	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
10		215	220 225
	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
15		230	235 240
	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
20		245	250 255
	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
25		260	265 270
	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
30		275	280 285
	Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
35		290	295 300
	Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
40		305	310 315
	Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		
45		320	325 330
	Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
50		335	340 345
	Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
55		350	355 360
	Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu		
60		365	370 375
	Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln		
65		380	385 390

ES 2 356 814 T3

5 Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys
 395 400 405
 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
 410 415 420
 10 Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
 425 430 435
 15 Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro
 440 445 450
 20 Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 455

25

<210> 18

<211> 459

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-181

<400> 18

40

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15

45

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30

50

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45

55

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60

60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75

65

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90

ES 2 356 814 T3

	Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
5		95	100 105
	Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
10		110	115 120
	Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
15		125	130 135
	Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
20		140	145 150
	Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
25		155	160 165
	Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
30		170	175 180
	Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
35		185	190 195
	Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
40		200	205 210
	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
45		215	220 225
	Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
50		230	235 240
	Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
55		245	250 255
	Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
60		260	265 270
	Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
65		275	280 285
	Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
		290	295 300

ES 2 356 814 T3

Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
 305 310 315
 5
 Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
 320 325 330
 10
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 335 340 345
 15
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
 350 355 360
 20
 Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
 365 370 375
 25
 Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
 380 385 390
 30
 Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
 395 400 405
 35
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
 410 415 420
 40
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 45
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 50
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 455

<210> 19

55 <211> 276

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado H-275-Cys

65

ES 2 356 814 T3

<400> 19

	Met	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr
5	1				5					10					15
	Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn
10					20					25					30
	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys
15					35					40					45
	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser
20					50					55					60
	Val	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser
25					65					70					75
	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	Gln	Gly
30					80					85					90
	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg
35					95					100					105
	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Arg	Thr
40					110					115					120
	Lys	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala
45					125					130					135
	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Arg
50					140					145					150
	Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile
55					155					160					165
	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Val
60					170					175					180
	Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe
65					185					190					195
	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro
					200					205					210

ES 2 356 814 T3

Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly
 215 220 225
 5
 Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
 230 235 240
 10
 Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile
 245 250 255
 15
 Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
 260 265 270
 20
 Gly Arg Lys Lys Thr Cys
 275

25
 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 12S
 35
 <400> 20

40 **aaaccatggc agctagcgct attcctgcac caactgac** 38

<210> 21
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador 14A
 <400> 21

55 **aaaggatccc taactagtct ttttcttcc aatcag** 36

<210> 22
 <211> 40
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> Cebador Cys-A

