

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 447**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2003 E 10185168 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2305793**

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

30 Prioridad:

25.03.2002 JP 2002084414

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

21.02.2013

73 Titular/es:

**TAKARA BIO INC. (100.0%)
4-1, Seta 3-chome
Otsu-shi, Shiga 520-2193, JP**

72 Inventor/es:

**IDENO, MITSUKO;
KATO, IKUNOSHIN y
SAGAWA, HIROAKI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 396 447 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.

10 **Antecedentes técnicos**

10 Un cuerpo vivo está protegido de sustancias exógenas principalmente mediante una respuesta inmune, y se ha establecido un sistema inmunitario por varias células y los factores solubles producidos por las mismas. 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.

20 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 LTC), que muestran principalmente una actividad citotóxica. El LTC, 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 leucocitario 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 los LTC 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 los LTC.

35 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* LTC capaces de reaccionar específicamente 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 LTC.

45 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.

50 Para mantener y aumentar una actividad citotóxica específica de antígeno del LTC, 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 LTC. Sin embargo, en este método el número de LTC finalmente obtenido normalmente puede disminuir, de modo que no se puede obtener un número suficiente de células.

55 Como método para preparar una célula 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)].

60 A continuación, respecto a la preparación del LTC específico de antígeno, se ha descrito un método para aislar y expandir un clon de LTC 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 (Acm anti-CD3) e IL-2 [Riddell S. A. et al., *J. Immunol. Methods*, **128(2)**, 189-201 (1990)].

65 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 LTC específicos de antígeno y T_H en un periodo de tiempo corto. 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 LTC específicos 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).

5 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 las PBMC para reducir la cantidad de PMBC usadas.

10 La célula citolítica 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 la célula 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
15 hacia varias células cancerosas y otras dianas. La célula LAK también se usa en la inmunoterapia adoptiva de la misma manera que el LTC mencionado anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, la utilización de IL-2 es esencial en el paso de obtener un linfocito citotóxico, por ejemplo, LTC, 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 para un linfocito. Desde estos puntos de vista, es importante mejorar la expresión de IL-2R en la superficie celular. Además, en la inducción del LTC, es importante mejorar una eficacia para inducir una célula precursora de LTC sometida a estimulación por un antígeno como LTC, es decir, mejorar una proporción (relación) de la célula CD8 positiva en un grupo de células después de la inducción.

25 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 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 central es RGDS. Además, existe una región denominada III-CS 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)). Mizobata S. et al., *British Journal of Cancer*, **74**, 1598-1604, (1996) describe el uso de linfocitos citotóxicos tratados con fibronectina en inmunoterapia adoptiva.

45 **Divulgación de la invención**

La presente 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 presente invención se refiere a:

- 50 [1] un método para preparar un linfocito citotóxico o una preparación de linfocitos, 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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10,
- 55 [2] el método según [1], en donde el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 está inmovilizado en una fase sólida,
- [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] el 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 cualquiera de 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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10,
- [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 consiste en la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en un equipo de cultivo celular que contiene un medio, en donde el método satisface cualquiera de las condiciones de:

(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 a 5×10^5 células/cm²; y

[7] (b) una concentración de células en un medio al inicio del cultivo que es de 1 a 5×10^5 células/ml, el método según el anterior [6], en donde el método excluye un paso de dilución o un paso de intercambio del equipo de cultivo celular,

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

10 [9] el método según el anterior [8], en donde el gen exógeno se transduce usando retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus simio; y

[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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.

Breve descripción de las figuras

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

Mejor manera para llevar a cabo la invención

25 La presente invención se ha completado por los descubrimientos 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.

30 Dicho sea de paso, la preparación de un linfocito citotóxico como se usa en el presente documento se refiere a un paso que abarca un paso que comprende 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 preparado según la presente invención también se denomina cultivo de un linfocito citotóxico.

La invención se explicará específicamente a continuación.

35 (1) Fibronectina y fragmento de la misma usados en el presente documento

40 La fibronectina y un fragmento de la misma como se menciona en el presente documento 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 en el presente documento 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 en el presente documento solos o en mezcla de tipos plurales.

45 La información útil respecto a los fragmentos de fibronectina que se puede usar en el presente documento 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.

50 El fragmento de fibronectina 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 en la lista de secuencias), III-9 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias), III-10 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias), III-12 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias), III-13 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias), III-14 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias), y CS-1 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 en la lista de secuencias) (véase la figura 1).

60 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 en la presente invención 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 en la presente invención 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.

5 Además, el fragmento de fibronectina se ejemplifica mediante un polipéptido seleccionado de C-274 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 en la lista de secuencias), H-271 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias), H-296 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en la lista de secuencias), CH-271 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 en la lista de secuencias), CH-296 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 en la lista de secuencias) o C-CS1 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 en la lista de secuencias).

10 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
15 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 de la lista de secuencias), CHV-90 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 de la lista de secuencias) o CHV-92 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 de la lista de secuencias), 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 de la lista de secuencias) o CHV-181 (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 de la lista de secuencias), 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.

20 Además, se puede usar en el presente documento 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 explicados posteriormente. Por ejemplo, H-275-Cys (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19 de la lista de secuencias) es un fragmento que tiene un dominio de unión
25 a heparina de la fibronectina y un residuo de cisteína en C-terminal.

El fragmento usado en el presente documento puede ser los 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 descritos en el presente documento.

30 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, asparragina, glutamina; 4) serina, treonina; 5) lisina, arginina; 6) fenilalanina, tirosina. La delección, adición o inserción de aminoácidos es delección, adición o inserción en los aminoácidos que tienen características similares a las características de los alrededores del sitio objeto en el polipéptido dentro del intervalo que las características de los alrededores del sitio objeto no cambian sustancialmente.

35 Además, la frase "que tiene una función equivalente" se refiere a la 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 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.

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

5 Por cierto, como la fibronectina por sí, de forma similar, se puede usar en el presente documento 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).

10 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 en 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
 15 fragmento mencionado anteriormente C-274 (SEQ ID NO: 8) se puede obtener según el método descrito en la patente en EE UU No. 5.102.988. Además, se puede obtener un fragmento C-CS1 (SEQ ID NO: 13) según el método 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)
 20 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 el documento WO 97/18318.

25 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 tiene cada microorganismo según un método conocido.

30 FERM BP-2264 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica H-271, fecha de depósito: 30 de enero, 1989);
 FERM BP-2800 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica CH-296, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);
 FERM BP-2799 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica H-271, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);
 FERM BP-7420 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica H-296, fecha de depósito: 12 de mayo, 1989);
 FERM BP-1915 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica C-274, fecha de depósito: 17 de junio, 1988);
 35 FERM BP-5723 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica C-CS1, fecha de depósito: 5 de marzo, 1990);
 FERM P-12182 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica CHV-89, fecha de depósito: 8 de abril, 1991) y
 FERM P-12183 (*Escherichia coli* que tiene un plásmido que codifica CHV-179, fecha de depósito: 8 de abril, 1991).

40 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 el 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 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
 45 diferente de la región que muestra el efecto por el método de la presente invención dependiendo de las circunstancias de su uso. Por estas razones, se puede usar preferiblemente en el presente documento 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
 50 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 usado en el presente documento 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.

55 (2) Método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención

El método para preparar el linfocito citotóxico de la presente invención se explicará concretamente a continuación. El método de la presente invención es un método para preparar linfocitos citotóxicos que comprende el paso de llevar a
 60 cabo al menos cualquiera de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia del fragmento de fibronectina mencionado anteriormente, que es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.

El "linfocito citotóxico" como se usa en el presente documento significa un grupo de células que contienen un
 65 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 en la presente invención abarca cualquiera de inducción a partir de una célula precursora que puede formar el linfocito de la presente invención 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.

5 El linfocito citotóxico preparado según la presente invención incluye, pero no está particularmente limitado a, por ejemplo, célula T citotóxica (LTC), célula citolítica activada por linfoquinas (célula LAK), linfocito infiltrante en tumores (TIL), célula NK y similares, cada uno tiene una actividad citotóxica específica de antígeno.

10 En la presente invención, la célula precursora 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 como célula precursora en la presente invención. 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 para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención, 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.

20 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 un fragmento de fibronectina o una mezcla de tales fragmentos.

25 En el método de la presente invención, 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 de la presente invención.

30 Por ejemplo, en el método de la presente invención, 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 en la presente invención 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.

35 El medio usado en el método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención 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, en la presente invención 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.

45 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.

50 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.

60 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 que se va a colocar 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.

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

10 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 las 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
- 15 (D) una sustancia capaz de regular una señal emitida por la unión de un factor de crecimiento a un receptor de factor de crecimiento.

20 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.

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

35 En la presente invención, 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 que se va a usar, 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 µg/ml, más preferiblemente desde 0,1 hasta 1000 µg/ml, incluso más preferiblemente desde 1 hasta 100 µg/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.

50 Una vez que varios componentes mencionados anteriormente o el ingrediente eficaz de la presente invención 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 de la presente invención solamente separando el linfocito de la fase sólida, de modo que se pueda prevenir la contaminación del ingrediente eficaz en el linfocito.

55 Cuando el ingrediente eficaz de la presente invención 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 que se va a colocar en el equipo de modo que el medio tenga una proporción similar a una concentración deseada en un caso donde el ingrediente eficaz se use disolviendo el ingrediente eficaz en un medio tras colocar el medio en el equipo. 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 que se va a colocar 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 no está particularmente limitada, siempre que se obtengan los efectos deseados.

65

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.

5 Cuando se determina el nivel de expresión de IL-2R para el linfocito citotóxico obtenido mediante el método de la presente invención, 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, el nivel de expresión de IL-2R se puede determinar por un método conocido, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-2R.

10 Como se ha descrito anteriormente, el linfocito citotóxico obtenido por el método de la presente invención 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 de la presente invención es un grupo de células que tiene una función alta.

15 Además, puesto que el linfocito citotóxico obtenido por el método de la presente invención tiene un nivel de expresión aumentado de IL-2R, el linfocito citotóxico tiene una sensibilidad aumentada a una 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).

20 Además, en el linfocito citotóxico obtenido por el método de la presente invención, 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 la 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 de la presente invención mientras que la célula CD8 positiva 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 LTC, 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 de la presente invención es muy útil en la preparación de un linfocito citotóxico.

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

40 Además, el linfocito citotóxico, en especial LTC, preparado según el método de la presente invención tiene una característica excelente de que no hay disminución drástica en la 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 LTC inducido puede proliferar y expandirse estimulando el LTC 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.

50 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, las células se pueden cultivar en las condiciones de 37°C y en presencia de CO₂ al 5% y similares. Además, el medio se puede intercambiar por uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados. El medio que se va a usar y otros componentes simultáneamente usados con el mismo y similares son iguales a los mencionados anteriormente.

60 Una de las características principales del mantenimiento y expansión del linfocito citotóxico en el método de la presente invención reside en que el método comprende respectivamente cultivo y expansión continuos del linfocito citotóxico en un medio en presencia del ingrediente eficaz de la presente invención, es decir, un fragmento de fibronectina como un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 o una mezcla de fibronectina/fragmentos de fibronectina. 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, como una forma de realización del método de la presente invención, el método comprende expandir un linfocito citotóxico.

Para expandir un linfocito citotóxico según los métodos de la presente invención, las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas y se pueden usar condiciones normales usadas para cultivo de células. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en las condiciones de 37°C y en presencia de CO₂ al 5% y similares. Además, el medio se puede intercambiar por uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados. El medio que se va a usar y otros componentes simultáneamente usados con el mismo y similares son iguales a los mencionados anteriormente.

Según el método para la expansión de la presente invención, por ejemplo, en el caso de expansión de LTC, se pueden obtener un LTC 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 aproximadamente 200 veces cultivando la célula durante 7 días, y en aproximadamente 1000 veces cultivando la célula durante 9 días. Además, el linfocito citotóxico así obtenido, especialmente LTC, 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 de la presente invención como se han descrito anteriormente se pueden confirmar determinando la actividad citotóxica que posee el LTC o similar expandido por el método de la presente invención, según el método descrito en los ejemplos mostrados posteriormente.

Además, el método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención 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 que se van a usar, 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 1×10^5 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 de la presente invención, 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 de la presente invención, 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 de la presente invención 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 de la presente invención, 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 presente 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 que se va a usar desde el punto de vista de obtener una mayor relación de expansión. Como se describe anteriormente, según el método de la presente invención, 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 de la presente invención, se puede llevar a cabo la inducción, mantenimiento o expansión usando una cantidad de la célula 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 que se va a usar 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.

La cantidad de células usada en el presente documento se refiere al número de linfocitos citotóxicos y/o células precursoras.

Además, en el método de la presente invención, 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 de la presente invención se explicará tomando como ejemplo la preparación de LTC.

La inducción de LTC se lleva a cabo incubando (cultivando) una célula precursora capaz de diferenciarse a LTC junto con una célula presentadora de antígeno apropiada en presencia del ingrediente eficaz mencionado anteriormente en, por ejemplo, cualquier medio, para dar al LTC 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 LTC y destinada a diferenciarse a LTC, 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 que sea reconocido por la célula T. Por ejemplo, en la presente invención 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.

En la presente invención, las condiciones de cultivo para una célula precursora o similar durante la preparación de LTC se pueden, por ejemplo, ajustar según condiciones generalmente conocidas [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 LTC con la célula alimentadora, se desea que el medio sea uno adecuado para el mantenimiento y crecimiento tanto del LTC como de la célula alimentadora. Como medio, se puede usar un medio comercialmente disponible.

La célula alimentadora usada para el método de la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la célula alimentadora estimule el LTC de forma cooperativa con un anticuerpo anti-CD3 para activar el receptor de células T. En la presente invención, por ejemplo, se usan 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 las condiciones conocidas. Por ejemplo, el contenido es preferiblemente de $1 \times 10^{5-7}$ células/ml.

Particularmente preferido es el uso de 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 LTC expandido, haciendo posible de esta manera aumentar la seguridad en tratamientos médicos que utilizan LTC, 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 el antígeno se incorpore 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 al LTC que se va a inducir.

Por cierto, el antígeno usado en la presente invención 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.

En la presente invención, es preferible que la célula presentadora de antígeno se haga 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.

En la presente invención, las condiciones comunes para incubar (cocultivar) una célula precursora capaz de diferenciarse a LTC 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 LTC pueden ser condiciones conocidas [véase, por ejemplo, Bendnarek M. A. et al., *J. Immunol.* **147**(12), 4047-4053 (1991)]. Las condiciones de cocultivo 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 aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 15 días, tiempo durante el cual la célula presentadora de antígeno se puede intercambiar con una recién preparada para la reestimulación. Además, se puede intercambiar el medio con uno reciente a los intervalos de tiempo apropiados.

El LTC así obtenido mediante el método de la presente invención tiene una capacidad de reconocer específicamente el antígeno deseado, por ejemplo destruyendo específicamente una célula que tiene el antígeno mediante su actividad citotóxica. Esta actividad citotóxica del LTC se puede evaluar por un método conocido. Por ejemplo, se puede evaluar la actividad citotóxica del LTC contra una célula diana marcada con una sustancia radioactiva, una sustancia fluorescente o similar determinando la radioactividad o intensidad fluorescente atribuida a la célula destruida por el LTC. Además, se puede detectar determinando la cantidad de una citoquina tal como GM-CSF o IFN- γ liberada de forma específica de antígeno del LTC 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 LTC con un primer marcador fluorescente acoplado con un anticuerpo específico de LTC 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 LTC.

Por cierto, el método para expandir el LTC de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que el ingrediente eficaz anteriormente mencionado exista en el sistema de cultivo usado en el método. El método de la presente invención también se puede llevar a cabo mediante la existencia del ingrediente eficaz anteriormente mencionado en el sistema de cultivo en un método convencional para la expansión de LTC diferente de los descritos anteriormente, es decir, el cultivo de una célula precursora o similar se lleva a cabo en presencia del ingrediente eficaz de la presente invención (por ejemplo, añadiendo el ingrediente eficaz anteriormente mencionado a un medio que se va a usar 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 las 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 aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 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 LTC o la célula LAK, como para TIL, se puede preparar un grupo de células que tenga una alta actividad citotóxica cultivando las células en presencia de un fragmento de fibronectina como un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 o una mezcla del mismo con fibronectina y/u otros fragmentos. En la presente invención, no hay limitación particular en los procedimientos de activación de estas células siempre que un fragmento como un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 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 usada, el método de añadir el componente y similar, se pueden seleccionar los apropiados según el método mencionado anteriormente.

Según el método anteriormente mencionado para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención, se puede obtener 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, como una forma de realización del método de la presente invención, 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 polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 (ingrediente eficaz de la presente invención); 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 polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 (ingrediente eficaz de la presente invención); 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 polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 (ingrediente eficaz de la presente invención).

También se proporciona 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 divulgado en el presente documento según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz divulgado en el presente documento 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 en el presente documento. Por ejemplo, el contenido se puede determinar de forma apropiada según el contenido del ingrediente eficaz y similar en el medio anteriormente mencionado usado en el método divulgado en el presente documento 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.

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 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 mencionado se pueden preparar usando el ingrediente eficaz divulgado en el presente documento según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz divulgado en el presente documento y similar en el agente que mejora la relación o el medio para mejorar una relación 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.

También se proporciona 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 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 la mejora o el mantenimiento anteriormente mencionados se pueden preparar usando el ingrediente eficaz divulgado en el presente documento según un método conocido. El contenido del ingrediente eficaz divulgado en el presente documento en el agente de mejora o mantenimiento y el medio para la mejora o mantenimiento mencionado anteriormente no está particularmente limitado, siempre que se obtengan los efectos deseados descritos en el presente documento. 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 divulgado en el presente documento 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.

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 mencionados anteriormente pueden 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 cantidad en el cultivo que contiene linfocitos obtenido en el presente documento, 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 proporcionado en el presente documento.

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.

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

10 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 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 rica en el linfocito citotóxico obtenida de esta manera tiene una actividad citotóxica más potente, 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.

25 Además, se divulga un linfocito citotóxico que se obtiene por el método para preparar un linfocito citotóxico mencionado anteriormente. El linfocito, en especial LTC, tiene una actividad citotóxica alta, que tiene una característica de poca disminución de la actividad citotóxica, incluso cuando el linfocito se somete al cultivo o expansión continuos durante un largo periodo de tiempo. Además, se divulga 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 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 divulgado en el presente documento 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 del linfocito divulgado en el presente documento en el agente terapéutico y la dosis del agente terapéutico, según la inmunoterapia adoptiva conocida.

40 El método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención puede comprender además el paso de transducir un gen exógeno en el linfocito. En otras palabras, una forma de realización de la presente invención 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.

45 Al llevar a cabo el método para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención, 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 para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención, se espera un aumento en el método de transducción génica.

50 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.

55 Como el método anteriormente mencionado para transducir un gen, se puede emplear de la presente invención 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.

60 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 autorreplicar en una célula infectada.

65

El vector retrovítico 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 que se va a transducir en un linfocito citotóxico en la presente invención 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 fin 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 que se va a transducir 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.

Según el método de la presente invención, 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 al 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.

Ejemplos

La presente invención se describirá de forma más concreta por medio de los ejemplos, sin que se limite por ningún medio el ámbito de la presente invención a los mismos.

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 en 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 en 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 tiene el plásmido y se preparó CHV90 a partir 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 a partir 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.

(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 de la lista de secuencias y un cebador 14A que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 21 de la lista de secuencias con el plásmido anterior como molde, para dar un fragmento de ADN de aproximadamente 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 pNIII-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 aproximadamente 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 de la lista de secuencias y un cebador Cys-S que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 23 de la lista de secuencias 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 autoligó. 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 de 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

5 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 LTC, estas PBMC
10 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 tripán y las células se sometieron a cada experimento.

15 (2) Inducción de LTC de memoria anti-virus de la gripe

La inducción de LTC 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
25 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 a cada uno de 5HRPMI que contenía como péptido antigénico 5 µg/ml del péptido epitopo 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 de la lista de secuencias) y 1 µg/ml de microglobulina β2 (fabricada por Scrips). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después de ello las células se sometieron 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 x 10⁶ células/ml, y la suspensión se añadió a las células presentadoras de antígeno en una cantidad de 1 ml por pocillo. En este momento, 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 µg/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 µg/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 uno 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 x 10⁶ células/ml. La suspensión se añadió a las células presentadoras de antígeno preparadas en una cantidad de 1 ml/pocillo a cada uno para reestimar las células. En este momento, se añadió FNfr de modo que tuviera una concentración final de 10 µg/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 60 U/ml y FNfr 10 µg/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 LTC.

(3) Determinación para la actividad citotóxica de LTC

Se evaluó la actividad citotóxica de los LTC 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 epitopo o en ausencia del péptido de epitopo, en medio RPMI 1640 que contenía SBF al 5% (fabricado por Bio Whittaker) de modo que tuvieran una concentración de 1 x 10⁶ células/ml. Después de ello, se añadió calceína-AM (fabricada por Dotite) a la suspensión de modo que tuviera 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.

65

Los LTC 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 μ l/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 μ l/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 μ l 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 LTC se calculó mediante la siguiente ecuación 1:

Ecuación 1: 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 LTC

Se fijaron los LTC 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 μ l 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 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.

Tabla 1

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

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

Ejemplo 2. Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 expresión del receptor de interleuquina-2 en LTC

Se determinó la relación de la expresión del receptor de interleuquina-2 (IL-2R) en los LTC 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.

Tabla 2

Fragmento de fibronectina	Relación de contenido de células con 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 LTC 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 LTC 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 LTC

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 LTC

Los CTL preparados en el punto (1) del ejemplo 3 se lavaron con 5HRPMLI y después se hizo una suspensión que tenía una concentración de 3×10^4 células/ml. Por otra parte, PBMC alogénicas que no tenían HLA-A2.1 que se recogieron de la misma manera que en el punto (1) del ejemplo 1 se sometieron 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 LTC (3×10^4 células) y las PBMC alogénicas (de 4 a 10×10^6 células) en 10 ml de 5HRPMLI 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 además 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 LTC. 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 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 5HRPMLI 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 LTC 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:

Ecuación 2: Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) =
 [Actividad citotóxica (%) después de la expansión/actividad citotóxica (%) antes de la expansión] x 100

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

Tabla 3

Medio	Fragmento de fibronectina	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/D = 3
5HRPMI	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 la actividad citotóxica (%) Cociente E/D = 10
10HycloneRPMI	Control (sin adición de FNfr)	46,3
	CHV-89	69,0
	CHV-90	75,6

Medio	Fragmento de fibronectina	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/D = 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

Como se muestra en la tabla 3, los LTC 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 LTC 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 la copresencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 4. Expresión de IL-2R en una población celular después de la expansión de los LTC

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 la expresión del receptor de interleuquina-2 en los LTC expandidos

Los LTC preparados en el punto (1) del ejemplo 4 se expandieron de la misma manera que en el punto (2) del ejemplo 3. Se determinó la relación de células con expresión positiva de IL-2R para los LTC 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
H-271	48,3
C-274	53,5
C-CS1	39,7
CHV-891	28,6
CHV-90	60,0
CHV-179	53,7
CHV-181	50,3
Control (sin adición de FNfr)	26,8
CH-296	36,1
Control (sin adición de FNfr)	18,4
H-275-Cys	56,5
CHV-92	59,9

5 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 los LTC, se observó un aumento en la relación de células que expresan IL-2R en la población celular.

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

Ejemplo 5. Inducción y expansión de LTC en presencia de fibronectina

15 (1) Inducción de LTC de memoria anti-virus de la gripe

20 La inducción de LTC 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 LTC 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.

25 (2) Determinación de la relación de expresión de receptor de interleuquina-2 en los LTC

Se determinó la relación de células con expresión positiva de IL-2R para los LTC 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

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

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

(3) Expansión de LTC

40 Se expandieron los LTC 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 LTC 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.

5

Tabla 6

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

10

Como se muestra en la tabla 6, el grupo en el que la inducción y la expansión de los LTC 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 LTC claramente disminuyó. En otras palabras, se aclaró los LTC 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 LTC.

Ejemplo 6. Expansión de LTC en presencia de un fragmento de fibronectina (FN) inmovilizado

15

(1) Inmovilización de un fragmento de FN

20

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 pocillos 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.

25

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

30

La inducción de LTC 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 como equipo de cultivo (para control, se usó una placa sin tratamiento de inmovilización). La actividad citotóxica de los LTC 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.

35

(3) Expansión de los LTC

40

Se expandieron los LTC 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 (para control, se usó una botella sin tratamiento de inmovilización). Además, como medio se usó 10HycloneRPMI.

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

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

45

Tabla 7

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

CHV-181

25,6

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 LTC, los LTC 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 LTC, la actividad citotóxica claramente disminuyó. En otras palabras se aclaró que los LTC 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.

Ejemplo 7. Relación de contenido de células CD8 positivas en una población celular después de la expansión de los LTC

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 los LTC expandidos

Se expandieron los LTC 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 LTC 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.

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 LTC, 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 LTC se podían expandir con proliferación significativa de células CD8 positivas llevando a cabo la inducción y la expansión de los LTC en presencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 8. Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2 en LTC inducidos en presencia de un fragmento de fibronectina inmovilizado

(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.

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

La inducción de LTC 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 LTC 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.

(3) Expansión de los LTC

Se expandieron los LTC 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 uso una placa sin tratamiento de inmovilización). Además, como medio se usó 10HycloneRPMI.

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 LTC antes y después de la expansión así obtenida.

Los resultados de determinación se muestran en la tabla 9

Tabla 9

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

Como se muestra en la tabla 9 para los LTC, 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 los LTC, 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 LTC 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. Inducción de la expresión del receptor de interleuquina-2 en la superficie de células CD8

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 expresión del receptor de interleuquina-2 en los LTC

Se determinó la relación de la expresión del receptor de interleuquina-2 (IL-2R) en los LTC (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.

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

Como se muestra en la tabla 10, en los LTC 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 LTC 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 la copresencia del fragmento de fibronectina.

Ejemplo 10. Relaciones de contenido de células CD8 positivas en una población celular antes y después de la expansión de los LTC (Comparación de fibronectina con fragmento de fibronectina)

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 CD8 positivas en los LTC expandidos

Los LTC 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 LTC 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 los LTC, 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 los LTC 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 los LTC 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 los LTC (Comparación de fibronectina con fragmento de fibronectina)

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

La inducción de LTC 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 LTC 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 los LTC expandidos

Los LTC 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 LTC 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.

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 (%)
Control (Sin adición de FNfr)	34,0	15,3
Fibronectina	64,6	50,6

H-271	76,6	76,8
-------	------	------

5 Como se muestra en la tabla 12, en todos los grupos con adición de fragmentos de fibronectina durante la inducción y la expansión de los LTC, 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.

10 En otras palabras, se aclaró que se podían expandir favorablemente los LTC 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 los LTC en presencia del fragmento de fibronectina comparado con la de fibronectina por si.

Ejemplo 12. Expansión de LTC (Comparación de fibronectina con fragmento de fibronectina)

15 (1) Inducción de LTC de memoria anti-virus de la gripe

20 La inducción de LTC 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 LTC 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 los LTC

25 Los LTC preparados en el punto (2) del ejemplo 12 se expandieron 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 LTC así expandidos comparada con la de antes de la expansión como "mantenimiento de la actividad citotóxica (%)".

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

Tabla 13

	Mantenimiento de la actividad citotóxica (%) Cociente E/D = 3
Control (Sin adición de FNfr)	48,1
Fibronectina	148,9
CH-271	250,8

35 Como se muestra en la tabla 13, los LTC 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.

40 En otras palabras, se aclaró que los LTC 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 si.

Ejemplo 13. Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK (células citolíticas activadas por linfoquinas)

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

50 Se inmovilizaron un anticuerpo anti-CD3 humano y fibronectina o un 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 su uso, 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.

5 (2) Inducción y cultivo de células LAK

10 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 1×10^6 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 14

Número de días cultivados	FN/fragmento de FN	Nivel de expansión (veces)
7 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×103
	Fibronectina	×233
	CH-296	×218
	H-296	×247
9 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×250
	Fibronectina	×1190
	CH-296	×1286
	H-296	×1075
11 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×576
	Fibronectina	×2304
	CH-296	×1728
	H-296	×2088
	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×660
	C-CS1	×1170
15 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×1980
	Fibronectina	×3348
	CH-296	×5364
	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×2906
	C-CS1	×5117

25 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 incluso en 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. Determinación de la relación de proliferación en un sistema de cultivo de células LAK

35 (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. 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.

Tabla 15

Número de células al inicio del cultivo	Fragmento de fibronectina	Relación de proliferación del 4° día al 7° día (veces)
5×10^5 células/ml	Control (sin inmovilización de FNfr)	2,7 veces

	CH-296	16,9 veces
	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
	Control (sin inmovilización de FNfr)	23,5 veces
	H-296	43,5 veces

5 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 de 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.

10 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

15 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 del 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)	×48,6
	CH-296	×1004
5 x 10 ⁵ céls/ml (2,5 x 10 ⁵ céls/cm ²)	Control (sin inmovilización de FNfr)	×438
	CH-296	×1094
1 x 10 ⁶ céls/ml (5 x 10 ⁵ céls/cm ²)	Control (sin inmovilización de FNfr)	×1020
	CH-296	×1476

20 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 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.

30 Ejemplo 16. 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

35 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 x 10⁴ 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 x 10³ 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 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.

45 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.

50

Tabla 17

Número de días cultivados	FN/fragmento de FN	Nivel de expansión (veces)
15 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	×15
	Fibronectina	×628
	CH-296	×773
	H-296	×960

5 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 las células LAK a partir de un bajo número de células, sin requerir el procedimiento de dilución.

Ejemplo 17. Inducción de la expresión de IL-2R en células LAK

15 (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.

20 (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
	C-CS1	94,9
7 días	Control (sin inmovilización de FN/FNfr)	59,3
	Fibronectina	77,6
	CH-296	90,4
	H-296	89,1
	C-CS1	65,8

30 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 durante el cultivo. 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

35 (1) Inducción y cultivo de células LAK

40 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

45 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.

Tabla 19

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

5 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 inmovilizados 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.

Ejemplo 19. Relación de contenido de células CD8 positivas en una población de células LAK

15 (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.

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

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

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

30 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.

Ejemplo 21. Determinación del nivel de expansión en un sistema de cultivo de células LAK

35 (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 1×10^6 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 una 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) preparadas 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 8º día desde el inicio del cultivo	Nivel de expansión (veces)
A	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	×80
		Anti-CD3	Anti-CD3	×38
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	×1452
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	×1620
	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	×2700	
B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	×710
		Anti-CD3	Anti-CD3	×2363
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Ninguna	×504
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3	×5468
	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	×14243	
C	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	×1805
		Anti-CD3	Anti-CD3	×4200
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	×35700
		H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296

5

Tabla 22

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9º día desde el inicio del cultivo	Nivel de expansión (veces)
B	Control (sin inmovilización de FNfr)	Anti-CD3	Ninguna	×2074
		Anti-CD3	Anti-CD3	×2880
	CH-296	Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	×38400
	CH-271	Anti-CD3+CH-271	Anti-CD3+CH-271	×12672
	H-296	Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	×67584
	H-271	Anti-CD3+H-271	Anti-CD3+H-271	×8755
	C-274	Anti-CD3+C-274	Anti-CD3+C-274	×8525
	C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	×9677
	CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	×10138
	CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	×8294
	CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	×5760

10 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.

15

Ejemplo 21. Determinación de la relación de proliferación en un sistema de cultivo de células LAK

20 (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. 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.

25

Tabla 23

Donante	Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 8º día desde el inicio del cultivo	Relación de proliferación del 11º al 15º días (veces)
A	Control (sin inmovilización de FNfr) CH-296	Anti-CD3	Ninguna	6,7 veces
		Anti-CD3	Anti-CD3	8,3 veces
		Anti-CD3+CH-296	Ninguna	2,6 veces
B	Control (sin inmovilización de FNfr) CH-296	Anti-CD3	Ninguna	7,4 veces
		Anti-CD3	Anti-CD3	17,5 veces
		Anti-CD3+CH-296	Ninguna	0,9 veces
C	Control (sin inmovilización de FNfr) CH-296 H-296	Anti-CD3	Ninguna	5,2 veces
		Anti-CD3	Anti-CD3	22,2 veces
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	94,0 veces
		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 9º día desde el inicio del cultivo	Relación de proliferación del 11º al 15º días (veces)
B	Control (sin inmovilización de FNfr) CH-296 CH-271 H-296 H-271 C-274 C-CS1 CHV-90 CHV-179 CHV-181	Anti-CD3	Ninguna	5,7 veces
		Anti-CD3	Anti-CD3	15,6 veces
		Anti-CD3+CH-296	Anti-CD3+CH-296	55,6 veces
		Anti-CD3+CH-271	Anti-CD3+CH-271	25,0 veces
		Anti-CD3+H-296	Anti-CD3+H-296	88,9 veces
		Anti-CD3+H-271	Anti-CD3+H-271	23,8 veces
		Anti-CD3+C-274	Anti-CD3+C-274	61,7 veces
		Anti-CD3+C-CS1	Anti-CD3+C-CS1	28,0 veces
		Anti-CD3+CHV-90	Anti-CD3+CHV-90	44,0 veces
		Anti-CD3+CHV-179	Anti-CD3+CHV-179	32,7 veces
		Anti-CD3+CHV-181	Anti-CD3+CHV-181	41,7 veces

5 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
10 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.

15 Ejemplo 22. 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 la del punto (1) del ejemplo 20.

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

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
25 (%) se muestra como relación de expresión de IL-2R (%).

Tabla 25

Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9º 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-296	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-296	89,6

Tabla 26

Fragmento de fibronectina	Estimulación el día 0 desde el inicio del cultivo	Estimulación el 9º 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

- 5 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-2 en la superficie de las 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 expresión de IL-2R 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 las células LAK con una relación mayor de la expresión de IL-2R mediante estimulación usando el fragmento de fibronectina en una fase temprana y una fase intermedia de la inducción de las células LAK.

15 Ejemplo 23. Determinación de la relación de células CD8 positivas en células LAK

(1) Inducción y cultivo de células LAK

20 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

25 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 8º 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
CH-296	Anti-CD3+CH296	Ninguna	72,1
	Anti-CD3+CH296	Anti-CD3	85,2
	Anti-CD3+CH296	Anti-CD3+CH-296	75,9
H-296	Anti-CD3+H296	Ninguna	76,0
	Anti-CD3+H296	Anti-CD3	82,0
	Anti-CD3+H296	Anti-CD3+H296	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.
 SEQ ID NO: 3; Región parcial de fibronectina llamada III-10.
 SEQ ID NO: 4; Región parcial de fibronectina llamada III-12.
 SEQ ID NO: 5; Región parcial de fibronectina llamada III-13.
 SEQ ID NO: 6; Región parcial de fibronectina llamada III-14.
 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.
 SEQ ID NO: 10; Fragmento de fibronectina llamado H-296.
 SEQ ID NO: 11; Fragmento de fibronectina llamado CH-271.
 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.
 SEQ ID NO: 15; Fragmento de fibronectina llamado CHV-90.
 SEQ ID NO: 16; Fragmento de fibronectina llamado CHV-92.
 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.
 SEQ ID NO: 20; Cebador 12S
 SEQ ID NO: 21; Cebador 14A.
 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.

Aplicabilidad industrial

Según el proceso descrito para preparar un linfocito citotóxico de la presente invención 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 una célula CD8 positiva 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.

Además, se describen los siguientes puntos:

1. Un método para preparar 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 fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
2. El método según el punto 1, en donde el linfocito citotóxico expresa altamente un receptor de interleuquina-2 comparado con un linfocito citotóxico obtenido llevando a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
3. El método según el punto 1, en donde el linfocito citotóxico contiene una célula CD8 positiva en una relación mayor comparado con un linfocito citotóxico obtenido llevando a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
4. El método según cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde el linfocito citotóxico mantiene altamente la actividad citotóxica, comparado con un linfocito citotóxico obtenido llevando a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión en ausencia de fibronectina, fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.

5. El método según cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde la fibronectina, fragmento de la misma o una mezcla de los mismos se inmoviliza a una fase sólida.
- 5 6. El método según el punto 5, en donde la fase sólida es un equipo de cultivo celular o un soporte de cultivo celular.
7. El método según el punto 6, en donde el equipo de cultivo celular es una placa petri, una botella o una bolsa, y el soporte de cultivo celular es bolas, una membrana o un portaobjetos de vidrio.
- 10 8. El método según cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico se lleva a cabo en un medio que contiene fibronectina, una fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 15 9. El método según cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1 a 7 de la lista de secuencias, o un polipéptido que tiene la sustitución, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, en donde el polipéptido tiene funciones equivalentes a las de dicho polipéptido.
- 20 10. El método según el punto 9, en donde el fragmento de fibronectina tiene actividad de adhesión celular y/o actividad de unión a heparina.
- 25 11. El método según el punto 9, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido seleccionado de polipéptidos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 8 a 19 de la lista de secuencias.
- 30 12. El método según el punto 1 que comprende llevar a cabo al menos uno de inducción, mantenimiento y expansión de un linfocito citotóxico en presencia de fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos en un equipo de cultivo celular que contiene un medio, en donde el método satisface cualquiera de estas condiciones:
 (a) una relación del número de células al inicio del cultivo respecto a un área de cultivo en el equipo de cultivo que es de 1 a 5×10^5 células/cm²; y
 (b) una concentración de células en un medio al inicio del cultivo que es de 1 a 5×10^5 células/ml.
- 35 13. El método según el punto 12, en donde el método excluye un paso de dilución o un paso de intercambio de un equipo de cultivo celular.
- 40 14. Un linfocito citotóxico obtenido mediante el método de cualquiera de los puntos 1 a 13.
- 45 15. Un medicamento que comprende como ingrediente eficaz un linfocito citotóxico obtenido mediante el método de cualquiera de los puntos 1 a 13.
16. Un agente para aumentar la expresión de un receptor de interleuquina-2 de una célula, caracterizado en que el agente comprende como ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 50 17. El agente según el punto 16, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1 a 7 de la lista de secuencias o un polipéptido que tiene la sustitución, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, en donde el polipéptido tiene funciones equivalentes a las de dicho polipéptido.
- 55 18. El agente según el punto 17, en donde el fragmento de fibronectina tiene actividad de adhesión celular y/o actividad de unión a heparina.
19. El agente según el punto 17, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido seleccionado de polipéptidos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 8 a 19 de la lista de secuencias.
- 60 20. Un agente para mejorar la relación de una célula CD8 positiva en un linfocito, caracterizado en que el agente comprende como ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 65 21. El agente según el punto 20, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1 a 7 de la lista de secuencias o un polipéptido que tiene la sustitución, delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la

secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, en donde el polipéptido tiene funciones equivalentes a las de dicho polipéptido.

- 5 22. El agente según el punto 21, en donde el fragmento de fibronectina tiene actividad de adhesión celular y/o actividad de unión a heparina.
- 10 23. El agente según el punto 21, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido seleccionado de polipéptidos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 8 a 19 de la lista de secuencias.
- 15 24. Un agente para mejorar o mantener la actividad citotóxica en un linfocito citotóxico, caracterizado en que el agente comprende como ingrediente eficaz fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 20 25. El agente según el punto 24, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 1 a 7 de la lista de secuencias o un polipéptido que tiene la sustitución, deleción, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, en donde el polipéptido tiene funciones equivalentes a las de dicho polipéptido.
- 25 26. El agente según el punto 25, en donde el fragmento de fibronectina tiene actividad de adhesión celular y/o actividad de unión a heparina.
- 30 27. El agente según el punto 25, en donde el fragmento de fibronectina es un polipéptido seleccionado de polipéptidos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 8 a 19 de la lista de secuencias.
- 35 28. Un método para aumentar la expresión de un receptor de interleuquina-2 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 fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 40 29. Un método para mejorar una relación de una célula CD8 positiva 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 fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
- 45 30. Un método 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 fibronectina, un fragmento de la misma o una mezcla de los mismos.
31. El método según cualquiera de los puntos 1 a 13, que comprende además el paso de transducir un gen exógeno en un linfocito citotóxico.
32. El método según el punto 31, en donde el gen exógeno se transduce usando retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados o virus simio.

Lista de secuencias

- 50 <110> TAKARA BIO INC.
- <120> Proceso para la preparación de linfocito que tiene actividad citotóxica
- <130> 03-021-PCT
- 55 <150> JP 2002-84414
<151> 25-03-2002
- <160> 24
- 60 <210> 1
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

<223> Región parcial de fibronectina llamada III-8

<400> 1

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

5

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región parcial de fibronectina llamada III-9

15 <400> 2

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

ES 2 396 447 T3

<210> 6
 <211> 90
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Región parcial de fibronectina llamada III-14

 10 <400> 6
 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
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
 35 40 45
 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr
 50 55 60
 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 80 85 90

15 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Región parcial de fibronectina llamada CS-1

 <400> 7
 Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His
 1 5 10 15
 Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 20 25

25 <210> 8
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Humana

 30 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado C-274

 <400> 8

ES 2 396 447 T3

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
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln

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

<210> 9
 <211> 271
 <212> PRT

5

ES 2 396 447 T3

<213> Humana

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado H-271

5

<400> 9

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
 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
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 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

	95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr			
	110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr			
	125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile			
	140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr			
	155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser			
	170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr			
	185	190	195
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
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile			
	230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala			
	245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys			
	260	265	270

Thr

<210> 10
 <211> 296
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado H-296

10 <400> 10

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
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
				50					55					60
Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
				65					70					75
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
				95					100					105
Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
				110					115					120
Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr
				125					130					135
Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile
				140					145					150
Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr
				155					160					165
Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Ser
				170					175					180
Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr
				185					190					195

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
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu
 275 280 285
 His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 290 295

<210> 11
 <211> 549
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CH-271

10 <400> 11
 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
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60

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

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

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

5 <210> 12
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CH-296

<400> 12
 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
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

ES 2 396 447 T3

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

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

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

Val Pro Ser Thr

<210> 13
 <211> 302
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Fragmento de fibronectina llamado C-CS1

<400> 13
 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
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105

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

Ser Thr

- 5 <210> 14
- <211> 367
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-89

<400> 14

5

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

	200		205		210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe					
	215		220		225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys					
	230		235		240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg					
	245		250		255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg					
	260		265		270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg					
	275		280		285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp					
	290		295		300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val					
	305		310		315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp					
	320		325		330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr					
	335		340		345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro					
	350		355		360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr					
	365				

<210> 15
 <211> 368
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-90

10 <400> 15

ES 2 396 447 T3

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

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
 275 280 285

Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp
 290 295 300

Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
 305 310 315

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro
 320 325 330

Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu
 335 340 345

Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
 350 355 360

Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 365

5 <210> 16
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-92

<400> 16

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

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 . 200 205 210

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp
 275 280 285

Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 290 295 300

Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
 305 310 315

Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro
 320 325 330

Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 335 340 345

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
 350 355 360

Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu
 365 370

5 <210> 17
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-179

<400> 17

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

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
 Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr
 425 430 435
 Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro
 440 445 450
 Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 455

<210> 18
 <211> 459
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado CHV-181

10 <400> 18

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

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

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

5 <210> 19
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de fibronectina llamado H-275-Cys

<400> 19

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

Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly
 215 220 225

Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
 230 235 240

Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile
 245 250 255

Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
 260 265 270

Gly Arg Lys Lys Thr Cys
 275

5 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 12S

<400> 20
aaaccatggc agctagcgct attcctgcac caactgac 38

15 <210> 21
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador 14A

<400> 21
aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag 36

25 <210> 22
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador Cys-A

<400> 22
aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggtct gtttcctgtg 40

35 <210> 23
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador Cys-S

<400> 23

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c

41

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido diseñado basado en proteína de matriz del virus de la gripe

<400> 24

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

15

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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 está inmovilizado en una fase sólida.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la fase sólida es un equipo de cultivo celular o un soporte de cultivo celular.
- 15 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.
- 20 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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.
- 25 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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 en un equipo de cultivo celular que contiene un medio, en donde el método satisface cualquiera de las condiciones de:
 - (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.
- 30 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 celular.
- 35 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.
9. El método según la reivindicación 8, en donde el gen exógeno se transduce usando retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus simio.
- 40 10. Un método in vitro para aumentar la expresión del receptor de interleuquina-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 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.
- 45

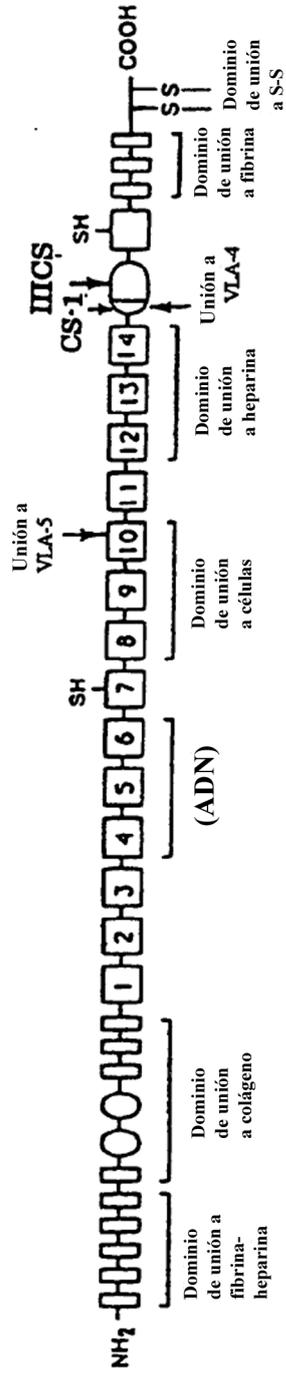


FIG. 1

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