

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 184**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2007 E 07791749 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2053123**

54 Título: **Procedimiento de proliferación de células LAK**

30 Prioridad:

01.08.2006 JP 2006209979

15.02.2007 JP 2007035134

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

28.02.2014

73 Titular/es:

NAI INC. (100.0%)

5-12, Kita aoyama 1-chome, Minato-ku

Tokyo 107-0061, JP

72 Inventor/es:

WATARAI, SHINOBU y

NISHIKAWA, SHIGERU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 445 184 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

Procedimiento de proliferación de células LAK

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento para la proliferación de células LAK, y un kit de cultivo celular para su uso en la proliferación de células LAK.

10 Antecedente de la técnica

Generalmente se conoce en la técnica que un procedimiento de tratamiento, tal como una terapia quirúrgica eliminando un área afectada por una lesión, una quimioterapia administrando agentes contra el cáncer, y una terapia por radiación aplicando radiación a un área afectada por una lesión, se puede utilizar como un medio para tratar cánceres y/o tumores.

Sin embargo, estas terapias implican algunas desventajas para los pacientes tales como una carga física importante y efectos adversos asociados con los agentes químicos o la radiación ionizante. Así, desde los años 80, como cuarta terapia, se investiga una terapia que utiliza linfocitos autólogos activados, tal como la terapia con LAK (linfocitos citolíticos activados por linfoquinas) y la terapia CTL (linfocitos T citotóxicos), y que se han llegado a utilizar para tratar enfermedades cancerosas humanas (véase, Documento no patente1).

En la técnica, la expresión "terapia LAK" se refiere a un procedimiento para tratar un cáncer en un paciente utilizando la inmunidad ejercida por linfocitos autólogos del paciente, que se hicieron proliferar y se activaron *ex vivo*. Específicamente "terapia LAK" es un procedimiento para tratar un cáncer mediante las etapas siguientes: (1) extracción de sangre de un paciente que padece un cáncer, y aislamiento de una fracción que contiene los linfocitos; (2) proliferación y activación de los linfocitos cultivando así la fracción aislada en un medio de cultivo suplementado con interleucina-2 y anticuerpos anti-CD3 durante aproximadamente dos semanas; (3) lavado de la suspensión celular obtenida que contiene una cantidad de linfocitos, eliminando la interleucina-2, el anticuerpo anti-CD3, y el medio de cultivo de las células, y suspendiendo los linfocitos obtenidos en una solución apropiada (tal como solución salina fisiológica para infusión que contenga una albúmina) para preparar una formulación celular, y (4) administración de la formulación celular para devolver los linfocitos activados al cuerpo del paciente. También, la terapia CTL es un procedimiento que utiliza linfocitos T citotóxicos, en lugar de células LAK, después de la proliferación y activación de los linfocitos T citotóxicos.

Otra terapia es una terapia que utiliza linfocitos autólogos activados que se ha mejorado en varios puntos. Por ejemplo, cultivando una suspensión celular que contiene los linfocitos autólogos en un medio de cultivo suplementado con mitógenos de células T (tales como la concanavalina A) y citoquinas (tales como la interleucina 7), en lugar de un anticuerpo anti-CD3. Se ha desarrollado en la técnica (véase, Documentos patentes 1 y 2) un procedimiento para tratar eficazmente el cáncer por proliferación / activación específica de células T tipo $\gamma\delta$ (que están implicadas directamente en la inmunidad mediada por células), en vez de activar todos los linfocitos. También se ha descrito un procedimiento para preparar células LAK a partir de las PBMC obtenidas de gatos infectados con VIF, en las que las PBMC se tratan primero con 5 microgramos/ml de ConA durante 24 h y luego se lavan antes de tratarse con IL-2 a 2 U/ml (Documento no patente 2).

En la técnica, la terapia que utiliza linfocitos autólogos activados (tal como la terapia LAK o la terapia CTL) se ha intentado aplicar en enfermedades distintas del cáncer (tales como enfermedades inmunológicas o enfermedades infecciosas), como se describe en los Documentos Patentes 1 y 2.

Sin embargo, hay algunos problemas a resolver tales como los siguientes. Primero, como la proteína CD3 que se utiliza como inmunógeno para obtener un anticuerpo anti-CD3 varía según la especie que la origina (tales como un perro, un gato, animales domésticos, y un ser humano), los anticuerpos anti-CD3 se tienen que preparar para cada especie a tratar. Además, los anticuerpos anti-CD3, especialmente los anticuerpos anti-CD3 que se utilizan últimamente en la técnica para seres humanos, son muy caros. Por lo tanto, se considera que la terapia que utiliza los linfocitos autólogos activados (tales como terapia LAK o terapia CTL) es difícil de aplicar en animales no humanos, desde el punto de vista económico.

También se considera como un problema el que, como las células T tipo $\gamma\delta$, incluso en las células T tipo $\gamma\delta$ en proliferación, no han demostrado una especificidad antigénica o restricción MHC, las células T tipo $\gamma\delta$ no son útiles para la terapia que utiliza los linfocitos autólogos activados (tales como terapia LAK o terapia CTL).

Documento Patente 1: Anuncio Nacional de Patente Japonesa N° 2002-528115 (JP-2002-528115-W)

Documento Patente 1: Anuncio Nacional de Patente Japonesa N° 2003-529363 (JP-2003-529363 -W)

Documento no Patente 1 [hecha la búsqueda el 27 de junio de 2006], en internet <URL: <http://www.j-immunother.com/treatment/02Treatment.html>>

Documento no Patente 2: Zhao y col., 1995, Journal of Leukocyte Biology, 58:423-431

Divulgación de la invención**Problemas a resolver por la invención**

- 5 La presente solicitud pretende proporcionar un procedimiento de tratamiento eficaz para varios cánceres, enfermedades de inmunodeficiencia e infecciones, y un procedimiento de proliferación / activación de células asociado con el mismo, que se pueda llevar a cabo a tal bajo coste que los procedimientos se puedan aplicar a animales no humanos.

Medios para resolver los problemas

La característica principal de la presente invención la suplementación a un medio de cultivo de una lectina vegetal (tal como la concanavalina A) y un factor de crecimiento que tenga una actividad similar a la interleucina-2, después de cultivar las células obtenidas de un espécimen de partida.

Breve descripción de los dibujos

- [FIG. 1] La FIG. 1 es un gráfico que muestra el efecto de las diferencias de concentración de concanavalina A en un medio de cultivo sobre la proliferación de las células T tipo aβ.
- 20 [FIG. 2] La FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto de la presencia o ausencia de concanavalina A en un medio de cultivo sobre la expresión del receptor interleucina-2 en la superficie de los linfocitos periféricos caninos.
- [FIG. 3] La FIG. 3 es un gráfico que muestra el efecto de las diferencias de la concentración de suero en un medio de cultivo sobre la proliferación de las células T tipo aβ.
- 25 [FIG. 4] La FIG. 4 es un gráfico que muestra el efecto de las diferencias de concentración de interleucina-2 en un medio de cultivo sobre la proliferación de las células T tipo aβ.
- [FIG. 5] La FIG. 5 es un gráfico que muestra el resultado del cultivo de las células T tipo aβ obtenidas de diferentes perros en presencia del suero autólogo de cada perro.
- 30 [FIG. 6] La FIG. 6 es un gráfico que muestra el resultado del cultivo de las células T tipo aβ obtenidas de diferentes perros en presencia de suero fetal bovino.
- [FIG. 7] La FIG. 7 es un gráfico que muestra el resultado del cultivo de las células T tipo aβ obtenidas de diferentes gatos en presencia del suero autólogo de cada gato o suero fetal bovino.
- [FIG. 8] La FIG. 8 muestra los histogramas de citometría de flujo medida antes y después de la proliferación de las células.
- 35 [FIG. 9] La FIG. 9 es un gráfico que muestra el resultado de la citotoxicidad de los linfocitos periféricos de perro cultivados en un medio de cultivo suplementado con concanavalina A e interleucina-2 contra las células de melanoma humano.
- [FIG. 10] La FIG. 10 es una fotografía de la electroforesis que muestra el efecto del cultivo de los linfocitos periféricos de perro en un medio de cultivo suplementado con concanavalina A e interleucina-2 sobre la actividad de la granzima B de transcripción del ARNm.
- 40 [FIG. 11] La FIG. 11 es un gráfico que muestra la citotoxicidad de los linfocitos periféricos contra las células de melanoma humano, en la que los linfocitos periféricos se obtuvieron por las siguientes etapas de: cultivo de los linfocitos periféricos de perro en un medio de cultivo suplementado con concanavalina A e interleucina-2, transferencia de los linfocitos periféricos de perro cultivados al perro en el que se originaron los linfocitos, y obtención de linfocitos periféricos del perro transferido.
- 45 [FIG. 12] La FIG. 12 muestra fotografías que muestran los cambios de un sitio afectado del perro que padece cáncer, al que se le ha sometido al procedimiento de tratamiento de la presente invención. Es esta figura, la FIG. 12(a) es una fotografía del sitio afectado antes del tratamiento y la FIG. 12 (b) es una fotografía del sitio afectado después del tratamiento.
- 50 [FIG. 13] La FIG. 13 muestra fotografías que muestran los cambios de un sitio afectado del perro que padece demodicosis canina (acarasis demodécica), que se ha sometido al procedimiento de tratamiento de la presente invención. En esta figura, FIG. 13(a) es una fotografía del sitio afectado antes del tratamiento, y la FIG. 13(b) es una fotografía del sitio afectado después del tratamiento.
- 55 [FIG. 14] La FIG. 14 muestra fotografías que muestran los cambios de otras zonas afectadas del mismo perro de la FIG. 13. En esta figura, la FIG. 14(a) es una fotografía del sitio afectado antes del tratamiento, y la FIG. 14(b) es una fotografía del sitio afectado después del tratamiento.

Explicación de los números de referencia

- 60 1: Tumor
2, y 3: sitios afectados

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 65 1. Procedimiento para la proliferación de células LAK

Un procedimiento para la proliferación de células LAK de la presente invención comprende la siguiente etapa de (1) una etapa de proliferación / activación cultivando las células de un espécimen de partida en un medio de cultivo suplementado con al menos una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tenga una actividad similar a la interleucina-2 y haciendo proliferar y activando las células como se expone en las reivindicaciones. Las etapas respectivas de la presente invención se ilustran en detalle a continuación.

(1) Etapa de recolección

Esta etapa pretende recolectar un espécimen de partida que contenga células T tipo aβ de un animal.

(a) Animal

El término “animal” se refiere a un perro o un gato, y la expresión “animal no humano” se refiere a un animal mamífero distinto de un ser humano.

(b) Especimen de partida

Un fluido corporal o un tejido que contenga células T tipo aβ o las células progenitoras de las mismas se pueden utilizar como “un espécimen de partida” para su uso en la proliferación. Específicamente, un ejemplo de un espécimen de partida incluye sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea, tejido linfático, epitelio, timo, hígado, bazo, tejido canceroso, tejido infectado, tejido de un ganglio linfático, tejido embrionario, o fracciones de los mismos. Especialmente, se utilizan preferentemente fracciones de sangre como espécimen de partida, considerando que tienen una alta densidad de células T tipo aβ y la facilidad de obtener la misma.

(c) Recolección

Cualquier procedimiento conocido se puede utilizar para recolectar un espécimen de partida. Específicamente, por ejemplo, en el caso en el que el espécimen de partida sea un fluido corporal, el espécimen de partida se puede recolectar dejando el fluido corporal obtenido de un sujeto utilizando una jeringa de inyección, sobre una solución que tenga la gravedad específica adecuada y disponiendo las fracciones apropiadamente por medio de un procedimiento de centrifugación en gradiente de densidad. Señalar que, en el caso de que el espécimen de partida esté enriquecido con glóbulos rojos sanguíneos que tienen una gravedad específica similar a la de las células T tipo aβ, específicamente en el caso de que se utilice sangre periférica como espécimen de partida, se puede obtener una concentración de células T tipo aβ mayor destruyendo con antelación los glóbulos rojos utilizando una solución tampón tal como la solución tampón NH₄Cl. Además, en caso de que se utilice sangre periférica como espécimen de partida, se tienen que añadir al espécimen de partida, heparina, ácido cítrico, y otros para evitar la coagulación.

Además, en el caso en el que se utilice un tejido como espécimen de partida, el espécimen de partida se puede recolectar por medio de las siguientes etapas: tratando con tripsinización una porción del tejido escindido de un sujeto por operación quirúrgica, para digerir las moléculas de adhesión intercelular, dispersando así las células obtenidas en un medio de cultivo y preparar una suspensión celular, poniendo una capa de la suspensión celular sobre una solución que tiene una gravedad específica apropiada, y ordenando las fracciones adecuadamente por medio de un procedimiento de centrifugación en gradiente de densidad.

(d) Otros

Las células T tipo aβ se pueden hacer proliferar eficaz y de manera dominante por un procedimiento conocido de recolección de un espécimen de partida enriqueciendo previamente de células T tipo aβ usando un procedimiento de centrifugación. Ejemplos de procedimientos conocidos incluyen un procedimiento para enriquecer solo células T tipo aβ aplicando la suspensión celular a una cromatografía de afinidad de anticuerpo inmovilizado o un procedimiento para eliminar solamente las células T tipo γδ de la suspensión celular.

(2) Etapa de Proliferación / activación

La etapa de “proliferación / activación” es una etapa de proliferación / activación de células del espécimen de partida recolectado en un medio de cultivo suplementado con al menos una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tenga actividad similar a la interleucina-2.

En el contexto de la presente invención, el término “proliferación” significa cultivar una célula *in vitro*. Además, el término “cultivo” significa colocar una célula en un medio de cultivo suplementado con fuentes de nutrientes y otras, que son necesarias para la supervivencia de las células, y permitiendo a las células crecer en número. Además, el término “activación” significa regulación de una función de las células tal que las funciones de las células se activan estimulando las células; más específicamente, el término “activación” significa la inducción o aumento de una actividad antitumoral, una actividad contra enfermedades inmunológicas, o una actividad de las células contra enfermedades infecciosas.

(a) Lectina vegetal

La expresión “una lectina vegetal” significa una proteína con una unión glucídica, derivada de una planta; específicamente, la “lectina vegetal” incluye pero sin limitación, concanavalina A, fitohemaglutinina, mitógeno de “porkweed”, y otros. Considerando el coste y la disponibilidad de la lectina, preferentemente se utiliza la concanavalina A como lectina vegetal. Además, la concentración de concanavalina A en el cultivo varía de 1 µg/ml a 15 µg/ml, más preferentemente varía de 5 µg/ml a 10 µg/ml.

(b) Factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2

La expresión “un factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2” significa cualquier compuesto que tenga una capacidad similar a la de interleucina-2 para proliferar las células T tipo αβ. Específicamente, el “factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2” incluye, pero sin limitación, la misma interleucina-2 y un equivalente funcional, tal como una interleucina-2 modificada por sustitución de aminoácidos, una interleucina-2 digerida parcialmente, una interleucina-2 mimética, y otros. También, siempre y cuando un compuesto satisfaga las condiciones descritas anteriormente, no hay necesidad de limitar el origen de los factores de crecimiento tales como la interleucina-2 y otros. Por ejemplo, en la presente invención, es posible utilizar el factor de crecimiento derivado de un ser humano, un perro, un gato, un animal doméstico, y otros. Entre estos, se utiliza como factor de crecimiento preferentemente la interleucina-2 humana debido a su disponibilidad. La concentración del factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2 varía preferentemente entre 1 U/ml a 1000 U/ml, más preferentemente, varía de 500 U/ml a 750 U/ml.

(c) Proliferación y activación

(c1) Medio de cultivo

Cualquier medio de cultivo conocido (sin limitación alguna) tal como un medio de cultivo disponible comercialmente (tal como, pero sin limitación, medio de cultivo RPMI 1640 disponible en Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) se puede utilizar como medio de cultivo en la presente invención, siempre y cuando el medio de cultivo esté suplementado con una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tenga una actividad similar a la interleucina-2. Se puede utilizar un medio de cultivo libre de suero en la técnica. Sin embargo, para favorecer la proliferación celular, se utiliza preferentemente un medio de cultivo que contenga suero. Se puede utilizar como suero cualquier suero disponible comercialmente, tal como suero fetal bovino. También se puede utilizar el suero derivado homogéneamente de una especie animal de la que se ha recolectado el espécimen de partida o su suero autólogo. En el caso de que el suero se añada al medio de cultivo, la cantidad del aditivo preferentemente varía de un 1 % por peso a un 20 % por peso de la cantidad de medio de cultivo, y, más preferentemente, varía del 2 % por peso al 5 % por peso de la cantidad de medio de cultivo.

(c2) Procedimiento de cultivo

El cultivo celular se puede llevar a cabo utilizando un procedimiento general de cultivo para el cultivo de una célula animal, es decir, colocando un recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo en la incubadora de CO₂. Se puede utilizar como recipiente de cultivo cualquier recipiente de cultivo conocido, incluyendo, como ejemplos, una placa de cultivo celular, un plato de cultivo celular, un matraz de cultivo celular, un frasco rotatorio, una bolsa de cultivo permeable a gases y otros.

La concentración de CO₂ en la incubadora de CO₂ varía preferentemente de un 1-10 %, y, más preferentemente varía de un 3-7 %. La temperatura en la incubadora de CO₂ preferentemente varía entre 30-40 °C y, más preferentemente, varía entre 35-38 °C.

No hay necesidad de limitar el periodo de cultivo, siendo similar al caso de un cultivo celular animal normal. Para la proliferación y activación de las células, el periodo de cultivo varía preferentemente entre aproximadamente 2 días-20 días, y más preferentemente, varía entre aproximadamente 7 días-14 días. Es posible, durante el periodo de cultivo, observar en el microscopio el estado de las células para contar el número de células, añadir un medio de cultivo fresco o constituyentes específicos del mismo al medio de cultivo, dependiendo del estado de las células cultivadas, y en algunos casos, cambiar el medio de cultivo o pasar las células proliferadas a un medio de cultivo recién preparado en otro recipiente de cultivo.

2. Suspensión celular y formulación celular

La suspensión celular en la que las células T tipo αβ de un espécimen de partida proliferaron o se activaron (enriquecieron) utilizando el procedimiento para hacer proliferar las células LAK descrito anteriormente en la sección 1, se pueden utilizar entonces en varios tipos de experimentos como suspensión celular. Después de eliminar de la suspensión celular el medio de cultivo, y la lectina vegetal y el factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2 contenidos en el mismo (etapa de eliminación), las células recolectadas se resuspenden en una solución apropiada y a una densidad celular apropiada (etapa de producción) para preparar una formulación celular.

La etapa de eliminación y la etapa de producción se describen posteriormente en detalle.

La formulación celular obtenida de esta forma contiene las células que se han hecho proliferar por un procedimiento de proliferación de células LAK de la presente invención. De manera que la formulación celular se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad, sin necesidad de limitar la forma, el espécimen de partida, la especie animal de la que se obtiene el espécimen de partida, el tipo de solución para su uso en la resuspensión, ni otros.

(3) Etapa de eliminación

Después de completar la etapa de proliferación / activación, para prevenir una reacción inmune adversa no deseada que potencialmente se puede generar contra el medio de cultivo o la lectina vegetal, se pueden utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos para eliminar el medio de cultivo o la lectina vegetal por recolección únicamente de las células contenidas en el cultivo y lavando el medio de cultivo adherido a la superficie de las células.

Específicamente, un procedimiento para la eliminación del medio de cultivo o la lectina vegetal incluye un procedimiento que comprende las etapas de centrifugación del recipiente de cultivo para precipitar las células, descarga del medio de cultivo por decantación y resuspensión de las células en una solución tamponada o procedimientos que utilizan columnas de centrifugación. El procedimiento para eliminar el medio de cultivo o la lectina vegetal también incluye un procedimiento que utilice perlas magnéticas sobre las que se inmoviliza un anticuerpo contra células T tipo $\alpha\beta$ o por una técnica de cromatografía de afinidad, un procedimiento para aislar solo las células utilizando una combinación de un anticuerpo fluorescente contra las células T tipo $\alpha\beta$ y una técnica de citometría de flujo.

(4) Etapa de producción

Después de eliminar el medio de cultivo, se puede utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos, tales como un procedimiento que comprende la adición de una solución apropiada al matraz de cultivo que contiene las células y resuspender las células por mezclado por remolino, para suspender las células recolectadas en una solución apropiada a una apropiada densidad celular.

Se puede utilizar cualquiera de las soluciones conocidas como solución para suspender las células, siempre y cuando las soluciones se puedan utilizar para mantener la capacidad de las células LAK y no produzca ninguna reacción inmune adversa tal como un rechazo inmunológico en un animal no humano al que se le administre la formulación celular que contiene esta solución. Específicamente, la solución puede incluir, como ejemplo, una solución de infusión habitual (tal como una solución para infusión que contenga albúmina, vitaminas, glucosa y otros), o el medio de cultivo que contenga un suero autólogo. La densidad celular en la solución varía dependiendo del espécimen de partida, de la especie animal de la cual se recogieron las células, y tipo de solución que se utilice en la resuspensión. En la presente invención, se utilizan preferentemente para la producción de una formulación celular las células a una densidad que varía entre 1×10^5 células /ml – 1×10^7 células/ml, más preferentemente, a una densidad que varía de 1×10^6 células/ml – 6×10^6 células/ml.

3. Procedimiento de tratamiento

También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar un animal no humano que padece cánceres o tumores, enfermedades de inmunodeficiencia o enfermedades infecciosas mediante la administración de una cantidad eficaz de una formulación celular, especialmente una cantidad eficaz de formulación celular originada a partir de un espécimen de partida del animal no humano, para un animal no humano del que se ha recogido un espécimen de partida (es decir, una etapa de administración). Los procedimientos de tratamiento per se no se reivindican. La cantidad eficaz significa una cantidad total de la formulación celular necesaria para el resultado deseado (tal como una cura completa de una enfermedad) y se puede definir basándose en, por ejemplo, el número de células que se administran en una única dosis, el número de dosis al día, o los días de dosificación en un mes.

(5) Etapa de administración

(a) Detalles de la administración

La administración de las células se puede conseguir por cualquiera de los procedimientos conocidos, siempre y cuando el procedimiento conocido pueda suministrar una formulación celular dentro del cuerpo de un animal no humano, especialmente en un vaso sanguíneo, por infusión o inyección. La infusión se utiliza preferentemente para suministrar una gran cantidad de células LAK en el cuerpo de un animal no humano.

La dosis que se aplica para su uso en infusión varía dependiendo de la especie animal del sujeto, el tipo de enfermedad a tratar, etc. Las células se administran preferentemente a una dosis de 1×10^6 células – 5×10^7 células por 1 kg de peso corporal, más preferentemente a una dosis de 5×10^6 células – 1×10^7 células por 1 kg de peso corporal. La frecuencia de administración de las células también varían dependiendo de la especie animal del sujeto,

el tipo de enfermedades que se van a tratar. En la presente invención, la administración de las células se consigue preferentemente por la administración de las células con una frecuencia de una vez/10 días – una vez/14 días o dos veces/mes – tres veces/mes, y más preferentemente, a una frecuencia de una vez / 7 días – una vez / 8 días o cuatro veces/mes – cinco veces/mes.

5

(b) Alcance de las enfermedades a tratar

Los cánceres o tumores a tratar por este procedimiento de tratamiento pueden incluir, pero sin limitación, cánceres o tumores tales como cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer hepático, cáncer pancreático, cánceres de colon y recto, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de vejiga, leucemia, sarcoma osteogénico, tumor cerebral y otros.

10

Las enfermedades de inmunodeficiencia a tratar con este procedimiento de tratamiento pueden incluir pero sin limitación, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, miastenia gravis, anemia maligna, tiroiditis crónica (enfermedad de Hashimoto), SIDA, y otras.

15

Las enfermedades infecciosas a tratar con este procedimiento de tratamiento pueden incluir, pero sin limitación, enfermedades infecciosas víricas (tales como virus del moquillo canino, virus de la rabia, parvovirus, virus de la inmunodeficiencia felina), enfermedades infecciosas bacterianas, enfermedades infecciosas por protozoos (tales como filariasis y toxoplasmosis), enfermedades infecciosas por ácaros (tales como demodicosis canina (acarosis demodécica) y sarna otodéctica), y otras.

20

4. Kit de proliferación

Cada uno de los componentes necesarios para la proliferación de las células (tales como la lectina vegetal, el factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2, el medio de cultivo, un recipiente de cultivo celular) que se utilizan en el procedimiento de proliferación de células LAK de la invención se pueden conseguir por separado en varios vendedores. De manera alternativa, es posible combinar estos componentes con antelación para preparar un kit de proliferación, con el fin de aliviar a los expertos en la técnica de la carga de tener que conseguir cada componente separadamente y para conseguir más fácilmente la proliferación de las células.

30

La invención del kit de proliferación incluye una amplia variedad de kits tales como un kit sencillo que contiene la lectina vegetal y un factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2 que son necesarios, como se expone en las reivindicaciones, o un kit que contiene el medio de cultivo, y otros componentes tales como otros factores de crecimiento además de una lectina vegetal y un factor de crecimiento necesarios. El kit de proliferación se puede preparar no solo por combinación de los componentes descritos anteriormente sino también haciendo algunas modificaciones más.

35

Un factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2 se disuelve en una solución, tal como agua, solución salina fisiológica, solución tampón de fosfato, o el medio de cultivo, y se congela en pequeños recipientes que contienen cada uno una dosis individual para su conservación, los cuales se descongelarán antes de su uso. El procedimiento para preservar el factor de crecimiento descrito anteriormente puede eliminar la etapa de medición del factor de crecimiento que tiene actividad similar a la interleucina-2.

40

Además, el medio de cultivo suplementado con una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2 en un medio de cultivo se congela en pequeños recipientes para su conservación, que pueden descongelarse después para su uso. Por medio de tal procedimiento de conservación, es posible eliminar casi todos los preparativos relativos a la proliferación o activación de las células.

45

A partir de ahora en el presente documento, la invención se ilustra en detalle mediante Ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos solamente sirven para ilustrar la invención descrita en el presente documento y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

50

Ejemplos

55

Ejemplo 1

En este ejemplo, se investigaron las condiciones óptimas para la proliferación de células LAK utilizando la concanavalina A como lectina vegetal y la interleucina-2 como factor de crecimiento con actividad similar a la interleucina-2.

60

1. Optimización de la concentración de Concanavalina A

(1) Recolección del espécimen de partida

65

Se extrajeron 30 ml de sangre completa de la vena cervical de un beagle (6 años de edad), en una jeringa de

inyección (se inhibió la coagulación de la sangre con heparina). Luego, la sangre entera recogida se sometió a centrifugación, un volumen del aglomerado de sangre periférica extraída se combinó con 10 volúmenes de cualquiera de las soluciones (a) solución tamponada de NH_4Cl (NH_4Cl : 0,83 g/100 ml de agua destilada), (b) solución Tris básica (20,6 g/100 ml de agua destilada, pH 7,2), o (c) una solución esterilizada por filtración de la mezcla de las soluciones (a) y (b) con una relación 9:1, y luego la suspensión así obtenida se colocó en hielo durante 5 minutos (agitando de vez en cuando), y se destruyeron así los glóbulos rojos contenidos en la sangre completa.

Se vertieron 3 ml de cada una de las soluciones de gravedad específica (para el aislamiento de linfocitos caninos, Lympholyte disponible en Cedarlane) en dos tubos de centrifuga y la sangre completa que había sido destruida se puso lentamente en una capa sobre la solución sin romper la superficie de las soluciones. Los tubos de centrifuga que contenían las células se sometieron a centrifugación a temperatura ambiente a $800 \times g$ durante 20 minutos para recolectar las fracciones que contenían linfocitos utilizando una jeringa de inyección o una pipeta de Pasteur estéril.

Las células se lavaron suspendiendo las fracciones recolectadas en el medio de cultivo para preparar las suspensiones celulares, centrifugando así las suspensiones celulares así obtenidas a $300 \times g$ a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego descargando el sobrenadante por decantación. Después de lavar las células tres veces, las células lavadas se suspendieron en 5 ml del medio de cultivo (la densidad celular: $4,76 \times 10^7$ células/ml). Se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (disponible en Nissui Pharmaceutical Co, Ltd., a partir de ahora denominado como "el medio de cultivo") como medio de cultivo.

(2) Proliferación de las células

Las células en suspensión de los tubos de centrifuga se transfirieron a tubos de ensayo, a los que se había añadido medio de cultivo ajustando la densidad celular a 1×10^6 células/ml, después se añadió suero canino inactivado por calor (obtenido de un perro donante de sangre), inactivado a 56°C durante 30 minutos o suero fetal bovino inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos (Suero Fetal Bovino, disponible en JRH Biosciences), a las respectivas suspensiones celulares hasta una concentración final del 2 % o el 10 %, y finalmente, 2 ml de cada suspensión celular se sembraron en cada pocillo de dos placas de 6 pocillos (2×10^6 células/pocillo). A continuación, se añadieron concanavalina A (Concanavalina A, disponible en Elastin Products) a las suspensiones celulares respectivas en cada pocillo hasta una concentración final de 1, 5, 10 o 15 $\mu\text{g/ml}$ para preparar cuatro grupos con diferentes niveles de concentración de concanavalina A.

Luego, las placas se colocaron en una incubadora a 37°C humidificada y un 5 % de CO_2 para que comenzara la proliferación de las células. Se midieron el aumento o el descenso del número de las células desde el comienzo de la proliferación celular hasta el día 14, para calcular los valores medios de cada grupo con una concentración de ConA. El número de células se calculó por recuentos celulares obtenidos mezclando 20 μl de la suspensión y 20 μl de solución de azul tripán y calculando los recuentos celulares contenidos en 1 μl de la mezcla utilizando hematocitómetros (hematocitómetros de Burkert-Turk, disponibles en ERMA) y un microscopio.

(3) Resultados experimentales

Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 1 y la FIG. 1, preparada con los datos de la Tabla 1. Como está claro en la Tabla 1 y la FIG. 1 se encontró que 5 $\mu\text{g/ml}$ de concanavalina A era la concentración más adecuada de ConA.

[Tabla 1]

	1 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
Día 2	13	11	7,3	7,9
Día 4	6,9	4,6	6,1	5,9
Día 6	6,5	10	12	13
Día 8	9,8	29	22	18
Día 10	19	57	29	23
Día 12	18	53	53	46
Día 14	17	51	36	43
x 10^5 células / pocillo				

2. Cambio de los linfocitos por concanavalina A

Se determinó por citometría de flujo el efecto de la concanavalina A sobre las funciones de los linfocitos, específicamente el efecto sobre la expresión del receptor a de la interleucina-2 de la superficie de los linfocitos.

(1) Procedimiento experimental

Por el procedimiento similar al del Ejemplo 1, tres series (casos) de suspensiones celulares (de 5 ml cada una) se recolectaron de 3 perros (de 6 años de edad) (con una densidad celular: $2-4 \times 10^7$ células/ml). Se añadió el medio de cultivo a cada serie de suspensión celular así obtenida para ajustar la densidad celular a 5×10^5 células/ml. Se sembraron 2 ml de cada suspensión celular en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) y, luego, las suspensiones celulares se suplementaron con una concentración final de 5 µg/ml de concanavalina A, con una concentración final del 2 % de suero canino (obtenido de un donante de sangre canino), y una concentración final del 10 % de suero fetal bovino y se cultivaron a 37 °C durante 5 días (PBLc estimulados). Las suspensiones celulares que se habían suplementado con suero canino y suero fetal bovino pero no con concanavalina A se utilizaron como control (PBLc no estimulados).

Después del cultivo, las células cultivadas se recolectaron por centrifugación y se lavaron tres veces, a partir de las cuales se transfirieron 1×10^6 células a tubos de ensayo, y se añadieron 10 µl de anticuerpo de ratón anti receptor de interleucina-2 humano marcado con FITC y se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 30 minutos. En este Ejemplo se utilizó un anticuerpo anti receptor de interleucina-2 humano adquirido en American Research Products.

Tras la incubación, las células se lavaron con PBS tres veces y se suspendieron en PBS, y entonces, se determinó la fracción de células que expresaban el receptor a interleucina-2 (IL-2Ra) en la superficie de las células utilizando el citómetro de flujo (FACSCalibur, disponible en BECTON DICKINSON). Los resultados se muestran en la FIG. 2. Los datos mostrados en estas FIG. 2 se expresan como media $\pm$ error estándar.

(2) Resultados experimentales

Como está claro en la FIG. 2, se descubrió que la fracción de linfocitos que expresaban el receptor interleucina-2 en la superficie de los mismos era mayor en el caso en el que las células se cultivaron en el medio de cultivo suplementado con la concanavalina A (PBLc estimulados), al compararse con el caso en el que las células se cultivaron en ausencia de concanavalina A (PBLc no estimulados) (estadísticamente significativo $p < 0,05$). Los datos demuestran que una adición de concanavalina A al medio de cultivo induce la expresión del receptor de interleucina-2.

3. Optimización de la concentración de suero

(1) Procedimiento experimental

Por un procedimiento similar al de la sección 1 anterior, se prepararon 5 ml de la suspensión celular (densidad celular: $1,38 \times 10^7$ células/ml). Se añadió medio de cultivo a la suspensión celular para ajustar una densidad celular de 5×10^5 células/ml, que se suplementó con una concentración final de 5 µg/ml de concanavalina A, y luego se sembró 1ml de cada suspensión celular en cada pocillo de placas de 6 pocillos (5×10^6 células/pocillo). Luego, se añadió a cada pocillo de suspensión celular el suero canino inactivado por calor (obtenido de un perro donante de sangre) a una concentración final del 2 %, 5 %, o 10 % inactivado a 56 °C durante 30 minutos para preparar tres grupos de suspensiones celulares que contenían concentraciones finales de suero distintas.

Luego, la placa se colocó en una incubadora a 37 °C humidificada con un 5 % de CO₂ para que empezara la proliferación de las células. El incremento o la disminución del número de células desde el comienzo de la proliferación celular hasta el día 13 se calculó de forma similar que en la sección 1 anterior.

(2) Resultados experimentales

Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 2 y la FIG. 3 preparada con los datos de la Tabla 2. Como está claro en la Tabla 2 y la FIG.3, se encontró que la concentración de un 5 % de suero era la concentración más apropiada de suero.

[Tabla 2]

	2 % de suero	5 % de suero	10 % de suero
Día 2	2,3	3,4	3,8
Día 5	9,3	10	7,2
Día 7	31	27	18
Día 9	22	25	16
Día 11	25	28	19
Día 13	23	20	17
x 10^5 células/pocillo			

4. Optimización de la concentración de interleucina-2

(1) Procedimiento experimental

- 5 Por el procedimiento similar al de la sección 1 anterior, se prepararon 5 ml de la suspensión de células (densidad celular: $1,68 \times 10^7$ células/ml). Se añadió el medio de cultivo a la suspensión de células para ajustar la densidad celular a 5×10^5 células/ml, la cual se suplementó con concanavalina A a una concentración final de 5 µg/ml, una concentración final de suero canino (obtenido de un perro donante de sangre) del 2 %, y una concentración final de suero fetal bovino del 10 %, y se sembró 1 ml de cada una de las suspensiones celulares (5×10^5 células/ml) en una placa de 24 pocillos. Luego se añadió interleucina-2 a la suspensión celular hasta una concentración final de 250 U, 500 U, 750 U, 1000 U, o 0 U/ml en cada pocillo para preparar 5 grupos de suspensiones celulares que contenían distintas concentraciones finales de interleucina-2.

- 15 Luego, la placa se colocó en una incubadora a 37 °C humidificada y un 5 % de CO₂ para que comenzara la proliferación de las células. Además el día 5 desde el comienzo de la proliferación celular, se le añadieron al cultivo celular interleucina-2 a una concentración final de 500 U y concanavalina A a una concentración final de 5 µg/ml. El aumento o descenso del número de las células desde el comienzo de la proliferación celular hasta el día 12 se calculó de forma similar a la que se utilizó en la sección 1 anterior.

20 (2) Resultados experimentales

Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 3 y la FIG. 4 preparada con los datos de la Tabla 3. Como está claro en la Tabla 3 y la FIG. 4, se encontró que la concentración de 750 U/ml de interleucina-2 era la concentración más apropiada de interleucina-2.

25

[Tabla 3]

	250 U	500 U	750 U	1000 U	0 U
Día 3	3,0	2,7	2,9	2,6	3,2
Día 5	12	9,8	10	7,9	9,9
Día 8	24	28	33	27	21
Día 12	26	25	28	30	20
x 10 ⁵ células/pocillo					

Ejemplo 2

- 30 Se determinaron los efectos de los tipos de suero utilizados en el medio de cultivo sobre la proliferación de células LAK utilizando suero autólogo, suero fetal bovino, o suero felino. Específicamente, los efectos se determinaron por los siguientes procedimientos.

1. Utilización de suero autólogo

35 (1) Procedimiento experimental

- Por medio de un procedimiento similar al del Ejemplo 1, se recogieron cuatro series de suspensiones celulares (1 ml cada una) de 4 perros (pinscher miniatura, 2 años de edad; mestizo, 1 año; pomerano, 10 años; mestizo, 3 años) (densidad celular $1,5 \times 10^6$ células/ml). Se añadió el medio de cultivo a cada serie así obtenida de las suspensiones celulares hasta ajustar la densidad celular a 1×10^5 células/ml, y 3 ml de cada suspensión celular se vertieron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (3×10^5 células/pocillo), las cuales se suplementaron con concanavalina A hasta una concentración final de 5 µg/ml, una concentración final de suero autólogo del 5 %, y una concentración final de 750 U de interleucina-2. El número de las células se calculó al comienzo de la proliferación celular utilizando hematocitómetros como se describió en el Ejemplo 1. El suero autólogo que se utilizó en este Ejemplo se preparó dejando la sangre periférica en una gradilla limpia durante la noche para que se coagulara, centrifugando la sangre coagulada (a temperatura ambiente, a 1.500 x g durante 10 minutos) para recolectar el sobrenadante, y tratando este sobrenadante con inactivación por calor a 56 °C durante 30 minutos.

- 50 Luego, la placa de 6 pocillos se colocó en la incubadora a 37 °C humidificada y un 5 % de CO₂ para que comenzara la proliferación de las células. Se calculó el aumento o descenso del número de células desde el comienzo de la proliferación celular hasta el día 15 utilizando hematocitómetros.

(2) Resultados experimentales

- 55 Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 4 y la FIG. 5 preparada con los datos de la Tabla 4. Como está claro en la Tabla 4 y la FIG. 5, el número de células tras la terminación de la proliferación varía en las series de suspensiones celulares y varían entre $3,9 - 5,4 \times 10^7$ células/ml.

[Tabla 4]

	Linaje 1	Linaje 2	Linaje 3	Linaje 4
Feb. 25	30	30	30	30
Mar. 3	960	1050	1578	900
Mar. 6	3600	3300	4200	3180
Mar. 9	5130	4500	5220	3780
Mar. 11	4500	3900	5400	4000
x 10 ⁴ células / pocillo				

2. Utilización de suero fetal bovino

(1) Procedimiento experimental

Por medio de un procedimiento similar al del Ejemplo 1, se recogieron cuatro series de suspensiones celulares (1 ml cada una) de 4 perros (pinscher miniatura, 2 años de edad; mestizo, 1 año, pomerano; 10 años; mestizo, 3 años) (densidad celular $1,5 \times 10^6$ células/ml). Se añadió el medio de cultivo a cada serie así obtenida de suspensiones celulares hasta ajustar la densidad celular a 1×10^5 células/ml, y 3 ml de cada suspensión celular se vertieron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (3×10^5 células/pocillo), las cuales se suplementaron con concanavalina A hasta una concentración final de 5 µg/ml, una concentración final de suero fetal bovino (Suero Fetal Bovino, disponible en JRH Biosciencias) del 5 %, y una concentración final de 750 U de interleucina-2. Se hizo el recuento del número de las células al comienzo de la proliferación celular utilizando hematocitómetros.

(2) Resultados experimentales

Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 5 y la FIG. 6 preparada con los datos de la Tabla 5. Como está claro en la Tabla 5 y la FIG. 6, el número de células tras la terminación de la proliferación varía en las series de suspensiones celulares y varían entre $3,0 - 5,0 \times 10^7$ células/ml.

[Tabla 5]

	Linaje 1	Linaje 2	Linaje 3	Linaje 4
Feb. 25	30	30	30	30
Mar. 3	720	120	1116	600
Mar. 6	4320	2700	3780	3600
Mar. 9	4050	3240	4500	4050
Mar. 11	4200	3000	5000	3500
x 10 ⁴ células / pocillo				

3. Uso de suero felino autólogo

(1) Procedimiento experimental

Por medio de un procedimiento similar al del Ejemplo 1, se recogieron dos series de suspensiones celulares (1 ml cada una) de 2 gatos (mestizos, de 2 años de edad) (densidad celular $1,5 \times 10^6$ células/ml). Se añadió medio de cultivo a cada serie de suspensiones celulares así obtenidas hasta ajustar la densidad celular a 1×10^5 células/ml, y 3 ml de cada suspensión celular se vertieron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (3×10^5 células/pocillo), los cuales se suplementaron con concanavalina A hasta una concentración final de 5 µg/ml, una concentración final de suero del 5 %, y una concentración final de 750 U de interleucina-2. En este Ejemplo, se utilizó suero fetal bovino en una serie, mientras que el suero autólogo felino se utilizó en la otra serie. El número de las células se calculó al comienzo de la proliferación celular utilizando hematocitómetros como se describió en el Ejemplo 1. El suero autólogo felino que se utilizó en este Ejemplo se preparó dejando la sangre periférica en una gradilla limpia durante la noche para que se coagulara, centrifugando la sangre coagulada (a temperatura ambiente, a 1.500 x g durante 10 minutos) para recolectar el sobrenadante.

Luego, las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C humidificada y un 5 % de CO₂ para que comenzara la proliferación de las células. Se calcularon los aumentos y descensos del número de células desde el comienzo de la proliferación celular hasta el Día 15 utilizando hematocitómetros.

(2) Resultados experimentales

Los cambios en el recuento del número de células se muestran en la Tabla 6 y la FIG. 7 preparada con los datos de la Tabla 6. Como está claro en la Tabla 6 y la FIG. 7, en el caso de la sangre periférica felina, el número de células tras la terminación de la proliferación varía menos en las series de suspensiones celulares que en las de sangre

periférica canina y varían de $1,9 - 2,2 \times 10^7$ células/ml.

[Tabla 6]

	Gato 1, Suero felino	Gato 1, FBS	Gato 2, suero felino	Gato 2, FBS
Mar. 29	30	30	30	30
Abr. 3	720	120	1116	600
Abr. 5	4320	2700	3780	3600
Abr. 10	4050	3240	4500	4050
x 10^4 células / pocillo				

Comparando los resultados obtenidos en la Sección 1 y la Sección 2, se encontró que no hay una diferencia significativa entre los orígenes en la proliferación de las células T tipo $\alpha\beta$ caninas entre las células T tipo $\alpha\beta$ cultivadas en presencia de suero canino autólogo o aquellos cultivados en presencia de suero fetal bovino. Además, del resultado obtenido en la Sección 3 que compara el caso en el que las células T tipo $\alpha\beta$ felinas se cultivaron en presencia de suero felino autólogo con el caso en el que las células se cultivaron en presencia de suero fetal bovino, tampoco se encontró una diferencia significativa en la proliferación de las células T tipo $\alpha\beta$ felinas entre los grupos experimentales. Como resultado, se encontró que la proliferación de las células T tipo $\alpha\beta$ caninas y las células T tipo $\alpha\beta$ felinas no dependen prácticamente del origen del suero añadido al medio de cultivo.

Ejemplo 3

En este Ejemplo, se determinaron los cambios en el perfil celular antes y después de la proliferación, utilizando un citómetro de flujo. Específicamente, en relación a las células $CD8^+$ (que son células T tipo $\alpha\beta$ y se asocian con la inmunidad mediada por células) y las células $CD4^+$ (que están asociadas con la inmunidad mediada por anticuerpos), que se hicieron proliferar ambas por un procedimiento de proliferación de la invención, el número de células $CD8^+$ y células $CD4^+$ y la relación entre las mismas se determinó por el siguiente procedimiento.

(1) Procedimiento experimental

Por un procedimiento similar al del Ejemplo 1, tres series (casos) de suspensiones celulares (de 5 ml cada una) se extrajeron de 3 perros (de 6 años de edad) (densidad celular: $2-4 \times 10^7$ células/ml). Se añadió medio de cultivo a cada serie de suspensión celular así obtenida hasta ajustar la densidad celular a 1×10^6 células/ml. Se sembraron dos ml de cada suspensión celular en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (2×10^6 células/pocillo) y luego, las suspensiones celulares se suplementaron con concanavalina A hasta una concentración final de 5 μ g/ml, una concentración final de suero canino del 5 % (recolectada de un perro donante de sangre), una concentración final de suero fetal bovino del 10 %, y una concentración final de 750 U/ml de interleucina-2.

Las suspensiones celulares que contenían 1×10^6 células cada una se transfirieron a tubos de ensayo, y se añadieron 10 μ l de anticuerpo anti- $CD8^+$ canina y anticuerpo anti- $CD4^+$ canina marcados con FITC y se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 30 minutos. Tras la incubación, las células se lavaron con PBS tres veces y se suspendieron en PBS y luego, se determinó el perfil de las células utilizando un citómetro de flujo (FACSCalibur, disponible en BECTON DICKINSON). El anticuerpo anti- $CD8^+$ canina y el anticuerpo anti- $CD4^+$ canina utilizados en este Ejemplo, se adquirieron en UK-Serotec.

Después, la placa se colocó en una incubadora a 37 °C humidificada a un 5 % de CO_2 para proliferar las células durante 7 días y se determinó el perfil de las células utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

(2) Resultados experimentales

Se muestran en la FIG. 8 los histogramas del citómetro de flujo antes del comienzo del cultivo y después del cultivo celular y los valores de la relación entre el número de células se muestran en la Tabla 7 que se basa en los datos mostrados en la FIG. 8. En la Tabla 7, "DN" indica el porcentaje de la suma de las células $CD8^+$ y las células $CD4^+$, "CD8 SP" indica el porcentaje de células $CD8^+$, "CD4 SP" indica el porcentaje de células $CD4^+$, "DP" indica el porcentaje de células $CD8^+$ y células $CD4^+$, respectivamente.

[Tabla 7]

Antes de la proliferación					
	DN	CD4 SP	CD8 SP	DP	CD8 SP/CD4 SP
Caso-1	45 %	35 %	19 %	1 %	0,54 %
Caso-2	32 %	42 %	20 %	6 %	0,48 %
Caso-3	36 %	36 %	23 %	5 %	0,64 %

Después de la proliferación					
	DN	CD4 SP	CD8 SP	DP	CD8 SP/CD4 SP
Caso-1	2 %	20 %	59 %	19 %	2,95 %
Caso-2	4 %	24 %	60 %	12 %	2,5 %
Caso-3	12 %	19 %	67 %	2 %	3,53 %

Como está claro a la vista de la FIG. 8 y la Tabla 7, tanto el número como el porcentaje de células CD8⁺ (CD8 SP) aumenta significativamente en todos los casos. Además, se ha encontrado que el número y el porcentaje de células CD8⁺ y CD4⁺ (DP) también están aumentados. Por el contrario, aunque el número de células CD4⁺ (CD4 SP) aumentó, el porcentaje de células CD4⁺ (CD4 SP) disminuyó. A partir de este resultado, las células CD8⁺ tipo aβ proliferaron predominantemente por el procedimiento de proliferación de la invención. Además, no sólo las células CD8⁺ (CD8 SP) sino también las células CD8⁺ y CD4⁺ (DP) proliferaron, sugiriendo la proliferación de cualquier linfocito que no tenga la restricción por el MHC, tal como células T_H y células T NK. Sin embargo, considerando que la muestra se deriva de sangre periférica, hay una alta posibilidad de que proliferen células T NK.

Ejemplo 4

En este Ejemplo, se examinó la citotoxicidad ejercida por las células proliferadas contra las células tumorales. Específicamente, después del cultivo de los linfocitos en el medio de cultivo suplementado con la concanavalina A y la interleucina-2 y cultivando juntos los linfocitos cultivados y células de melanoma humano, se investigaron el efecto de la supresión de la proliferación de los linfocitos por las células de melanoma humano y su mecanismo.

1. Citotoxicidad de las células proliferadas

(1) Procedimiento experimental

Por medio del procedimiento similar al del Ejemplo 1, tres series (casos) de suspensiones celulares (de 5 ml cada una) se recolectaron de 3 perros (6 años de edad) (densidad celular: $2 - 4 \times 10^7$ células/ml). Se añadió el medio de cultivo a cada serie de suspensión celular obtenida de esta manera para ajustar la densidad celular a 5×10^5 células/ml. Dos ml de cada suspensión celular se sembró en cada pocillo de una placa de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) y, entonces, las suspensiones celulares se suplementaron con una concentración final de concanavalina A de 5 µg/ml, una concentración final de suero canino del 2 % (preparado de un perro donante de sangre por el procedimiento similar al del Ejemplo 2), una concentración final de suero fetal bovino del 10 %, y una concentración final de interleucina-2 de 750 U/ml, que se cultivaron a 37 °C durante 7 días u 11 días.

Los linfocitos así obtenidos, como células efectoras y las células de melanoma humano (células MeWo) como células diana se cultivaron juntas en el medio de cultivo y se investigó la citotoxicidad ejercida por las células efectoras contra las células diana. Específicamente, se examinó la citotoxicidad por el siguiente procedimiento.

Primero, las células efectoras y las células diana se sembraron en cada pocillo de placas de 24 pocillos con una relación E: D de 33 (es decir, $4,95 \times 10^6$ células efectoras/pocillo) : 1 (es decir, $1,5 \times 10^5$ células diana/pocillo) y se cultivaron a 37 °C durante 16 horas. En esta etapa, el medio de cultivo se suplementó con una concentración final de suero canino del 2 % (obtenido de un perro donante de sangre por el procedimiento similar al del Ejemplo 2), y una concentración final de suero fetal bovino del 10 % que se utilizaron para el co-cultivo. Luego se hizo el recuento del número de células diana viables (células MeWo) utilizando hematócitos, y se calculó la viabilidad de las células diana basándose en los recuentos celulares. Los resultados se muestran en la FIG. 9.

El resultado experimental que se obtiene del cultivo de las células MeWo solas y el resultado experimental que se obtiene por el co-cultivo de células MeWo y los linfocitos periféricos caninos no estimulados se utilizaron como resultados de control. En la FIG. 9: la columna 1 indica el resultado de un control experimental que se obtiene del cultivo de las células MeWo solas; la columna 2 indica el resultado de un control experimental que se obtiene por el co-cultivo de células MeWo y linfocitos periféricos caninos no estimulados; la columna 3 indica un resultado experimental que se obtiene por el co-cultivo de las células MeWo y los linfocitos periféricos caninos estimulados que se habían cultivado en presencia de concanavalina A e interleucina-2 durante 7 días; y la columna 4 indica un resultado experimental que se obtiene por el co-cultivo de las células MeWo con los linfocitos periféricos caninos estimulados que se habían cultivado en presencia de concanavalina A e interleucina-2 durante 11 días.

Como está claro en la FIG. 9, la comparación con los datos obtenidos sin el co-cultivo (la columna 1) y los datos obtenidos por el co-cultivo con los linfocitos periféricos caninos no estimulados (la columna 2), se encontró que el co-cultivo con linfocitos estimulados disminuía significativamente la viabilidad de las células diana (es decir, las células MeWo) como se muestra en la columna 3 y la columna 4 (estadísticamente significativa $p < 0,05$). Este resultado sugiere la aplicabilidad del uso de los linfocitos estimulados en el tratamiento de cánceres.

2. Efecto de la granzima B (GrB) en la transactivación de ARNm

En esta sección se determinó el efecto de la suplementación de concanavalina A e interleucina-2 al medio de cultivo sobre la actividad de transcripción de GrB ARNm, que es indicativo de la citotoxicidad. Específicamente, la citotoxicidad se examinó por el siguiente procedimiento.

5 (1) Procedimiento experimental

Primero, los linfocitos periféricos caninos estimulados que se habían cultivado en presencia de concanavalina A e interleucina-2 durante 7 días como se describe en la Sección 1 anterior (PBLc estimulados) se utilizaron para extraer el ARN total utilizando reactivo Trizol (disponible en Life Technologies).

Luego, se utilizó el kit PCR ARN TaKaRa (disponible en TAKARA BIO) para sintetizar ADNc a partir del ARN total, y los ADNc sintetizados se utilizaron como matriz para realizar una reacción PCR (procedimiento PCR-RT). En este experimento, las condiciones de la PCR, la síntesis de los cebadores para la amplificación del gen GrB, y la síntesis de los cebadores para amplificar el gen de la β -actina canina utilizada como una referencia interna se diseñaron de acuerdo con una publicación de Ito H., y col. (Ito H., y col., Neuromuscul. Disord. 8, 95-110 (1998)).

Finalmente, los productos PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis y se compararon con el experimento control. Los resultados se muestran en la FIG. 10. Los linfocitos periféricos caninos cultivados en el medio de cultivo en ausencia de concanavalina A e interleucina-2 (PBLc no estimulados) se utilizaron como control.

20 (2) Resultados experimentales

Como está claro en la FIG. 10, se encontró que la cantidad de transcripción de GrB aumentó más en los linfocitos estimulados cuando se cultivaban en un medio de cultivo suplementado con concanavalina A e interleucina-2 (PBLc estimulados), al compararse con el grupo de control (PBLc no estimulados). El resultado mostrado en la FIG. 10 sugiere que el cultivo celular, estimulando los linfocitos por el cultivo de los linfocitos en el medio suplementado con concanavalina A e interleucina-2, aumenta el nivel de transcripción del GrB ARNm y el nivel de expresión del gen GrB y aumenta la citotoxicidad ejercida por los linfocitos estimulados.

30 3. Efecto de la transferencia de linfocitos sobre la citotoxicidad

Los linfocitos estimulados utilizando concanavalina A e interleucina-2 se transfirieron de vuelta al sujeto individual del que se habían recolectado originalmente los linfocitos, y los linfocitos se volvieron a recolectar del sujeto individual para medir la citotoxicidad de los linfocitos. Luego, se examinaron los efectos de la transferencia de los linfocitos estimulados sobre la citotoxicidad de los linfocitos del sujeto individual al que se le administraron.

(1) Procedimiento experimental

Por un procedimiento similar al del Ejemplo 1, tres series (casos) de linfocitos periféricos caninos se recolectaron de 3 perros (6 años de edad). Los linfocitos periféricos caninos se estimularon cultivándolos durante 7 días como se describe en la Sección 1 anteriormente.

Las células se lavaron centrifugando los linfocitos periféricos caninos estimulados a 300 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos para formar un precipitado, luego se descargó el sobrenadante por decantación. Después del lavado de las células tres veces, las células lavadas se suspendieron en 5 ml de solución salina fisiológica para preparar una formulación celular. Se preparó una formulación celular suspendiendo los linfocitos que habían sido cultivados en ausencia de concanavalina A e interleucina-2 (linfocitos periféricos caninos no estimulados) con un procedimiento similar.

La formulación celular se transfirió de vuelta al sujeto individual del que se habían originalmente extraído los leucocitos, y se volvieron a extraer de nuevo de la sangre periférica del sujeto individual. Específicamente, en el Grupo 1, al perro sujeto individual se le introdujo la formulación celular (1×10^8 células/perro) durante 4 semanas seguidas, y después de dos días de la última introducción de la formulación celular, los linfocitos se recolectaron de la sangre periférica. En el Grupo 2, al perro sujeto individual se le introdujo la formulación celular (1×10^8 células/perro) durante 5 semanas seguidas, y tras dos días de la última introducción de la formulación celular, se recolectaron los linfocitos de la sangre periférica.

Los linfocitos así obtenidos como células efectoras y las células de melanoma humano (células MeWo) como células diana se co-cultivaron en el medio de cultivo descrito en la Sección 1 anterior y se investigó la citotoxicidad ejercida por las células efectoras contra las células diana. Los resultados se muestran en la FIG. 11.

Los resultados experimentales que se obtuvieron del cultivo de solo las células MeWo y los resultados experimentales obtenidos del co-cultivo de células MeWo y linfocitos periféricos caninos no estimulados se utilizaron como resultados control. En la FIG. 11: la columna 1 indica el resultado experimental control que se obtuvo del cultivo de solo las células MeWo; la columna 2 indica el resultado experimental control que se obtuvo del co-cultivo de las células MeWo con los linfocitos periféricos caninos no estimulados; la columna 3 indica un resultado

experimental que se obtuvo por co-cultivo de las células MeWo con los linfocitos periféricos caninos estimulados del Grupo 1 (que se había introducido durante 4 semanas seguidas); y la columna 4 indica el resultado experimental que se obtuvo por el co-cultivo de las células MeWo con los linfocitos periféricos caninos estimulados del Grupo 2 (que habían sido introducidos durante 5 semanas seguidas).

(2) Resultados experimentales

Como está claro en la FIG. 11, al compararse con los datos obtenidos sin co-cultivo (la columna 1) y los datos obtenidos con el co-cultivo con los linfocitos periféricos caninos no estimulados (la columna 2), se encontró que el co-cultivo con los linfocitos periféricos caninos estimulados disminuía significativamente la viabilidad de las células diana (es decir, las células MeWo) como se muestra en la columna 3 y la columna 4 (estadísticamente significativa $p < 0,05$). Este resultado sugiere que la citotoxicidad de los linfocitos se mantiene incluso después de la introducción de los linfocitos en el cuerpo de los sujetos individuales.

Ejemplo 5

En este Ejemplo, se investigó un efecto terapéutico ejercido por las células proliferadas. Específicamente, una formulación celular que contiene las células T tipo $\alpha\beta$ que habían sido cultivadas por el procedimiento de proliferación de la invención se administró a modelos animales que padecían cánceres o demodicosis canina (acarasis demodécica) (un trastorno cutáneo) para determinar su efecto terapéutico.

1. Efecto terapéutico sobre cánceres

Por el procedimiento similar al del Ejemplo 1, se recolectó 1 ml de una suspensión de células de un perro que tenía un tumor (histiocitoma) localizado en el cuello (raza mestiza, 14 años de edad, 17 kg de peso corporal) (densidad celular: $1,5 \times 10^6$ células/ml). La suspensión celular así obtenida se transfirió a un frasco de cultivo celular (25 cm^3), en el que se añadieron 9 ml de medio de cultivo (es decir, 10 ml en total). La suspensión celular se suplementó con una concentración final de $5 \mu\text{g/ml}$ de concanavalina A, una concentración final de suero autólogo del 5 %, y una concentración final de interleucina-2 de 750 U/ml. Se utilizó un suero autólogo en este Ejemplo preparado de forma similar al del Ejemplo 2.

Después, el frasco de cultivo celular se colocó en una incubadora a 37°C humidificada con un 5 % de CO_2 para que las células proliferaran durante 10 días. Las células se lavaron centrifugando la suspensión celular a $300 \times g$ a temperatura ambiente durante 5 minutos para formar un precipitado, y luego se descargó el sobrenadante del medio de cultivo por decantación, suspendiendo de nuevo el aglomerado de células en solución salina fisiológica, y centrifugándolo otra vez para descargar el sobrenadante. Tras lavar las células tres veces, las células lavadas se suspendieron en 30 ml de la solución salina que se utiliza como solución de infusión (suero fisiológico, disponible en Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) para preparar una formulación celular, y se introdujeron en una bolsa de transfusión. Las células se encontraban en la formulación celular con una densidad de $1,67 \times 10^6$ células/ml.

La formulación celular se administró una vez al perro que tenía el tumor por vía de infusión. Los resultados se muestran en la FIG. 12. La FIG. 12 (a) es una fotografía del tumor N° 1 antes del tratamiento, y la FIG. 12(b) es una fotografía del tumor N° 1 después del tratamiento. Se encontró en estas fotografías que el tumor 1 había degenerado claramente, demostrando que el procedimiento de tratamiento de la invención es eficaz.

2. Eficacia de la terapia sobre la demodicosis canina (acarasis demodécica)

Por un procedimiento similar al del Ejemplo 1, se preparó una formulación celular de un perro que padecía demodicosis canina (acarasis demodécica) (bulldog francés, 2 años de edad, 12 kg de peso corporal). Las células se encontraban en la formulación celular con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml. La formulación se administró una vez al perro que padecía la demodicosis canina (acarasis demodécica) por vía de infusión. Los resultados se muestran en la FIG. 13 y la FIG. 14. Las FIG. 13 y FIG. 14 son fotografías de dos sitios distintos afectados del único perro individual. La FIG. 13(a) y la FIG. 14(a) son fotografías de los sitios afectados 2 y 3 antes del tratamiento, respectivamente, y la FIG. 13 (b) y la FIG. 14 (b) son fotografías de los sitios afectados 2 y 3 después del tratamiento, respectivamente. Estas fotografías demuestran que el pelo crece en los sitios afectados 2 y 3 después del tratamiento de la presente invención. Por tanto, el procedimiento de tratamiento de la presente invención es eficaz.

Aplicabilidad industrial

Un procedimiento para hacer proliferar células LAK de la presente invención puede proliferar y activar predominantemente células T tipo $\alpha\beta$ que demuestran una especificidad de antígeno o restricción MHC. Como las células LAK así obtenidas contienen relativamente altos porcentajes de células T tipo $\alpha\beta$ que tienen restricción MHC, las LAK así obtenidas se pueden utilizar para una terapia con linfocitos autólogos activados más eficaz, dando como resultado la disminución de la carga física y económica del paciente que se va a tratar, que padezca distintas enfermedades (tales como cánceres, enfermedades de inmunodeficiencia, y enfermedades infecciosas).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la proliferación de células LAK, que comprende las siguientes etapas en orden numérico:

5 (1) una etapa de proliferación/activación haciendo proliferar y activando las células en un espécimen de partida que contiene células T tipo aß obtenidas de un perro o un gato, mediante el cultivo de las células en un medio de cultivo suplementado con al menos una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tenga una actividad similar a la interleucina-2, en el que la lectina vegetal es 1 – 15 µg/ml de concanavalina A y el factor de crecimiento es 500 – 750 U/ml de interleucina-2.

10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el espécimen de partida que contiene células T tipo aß se selecciona de entre al menos uno de los componentes que consisten en sangre periférica, médula ósea, tejido linfático, epitelio, timo, hígado, bazo, tejido canceroso, tejido infectado, tejido ganglionar linfático, tejido embrionario y fracciones de los mismos.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el espécimen de partida se selecciona de entre al menos uno de los componentes que consisten en sangre periférica y fracciones de los mismos.

20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además las siguientes etapas en orden numérico:

(2) una etapa de eliminación eliminando el medio de cultivo y lavando las células tras la etapa de proliferación / activación; y

25 (3) una etapa de producción suspendiendo las células lavadas en una solución apropiada.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la concentración de concanavalina A contenida en el medio de cultivo es de 5 µg/ml.

30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 y 5, en el que la concentración de interleucina-2 es de 750 U/ml.

7. Un kit de proliferación de células LAK obtenidas de un perro o de un gato individuales que comprende un medio de crecimiento que contiene al menos una lectina vegetal y un factor de crecimiento que tiene una actividad similar a la interleucina-2,

35 en el que la lectina vegetal es 5 µg/ml de concanavalina A y el factor de crecimiento es 500 - 750 U/ml de interleucina-2, la lectina vegetal es 1 – 15 µg/ml de concanavalina A y el factor de crecimiento es 750 U/ml de interleucina-2, o la lectina vegetal es 5 µg/ml de concanavalina A y el factor de crecimiento es 750 U/ml de interleucina-2.

40 8. El kit de la reivindicación 7 que contiene un recipiente de cultivo celular.

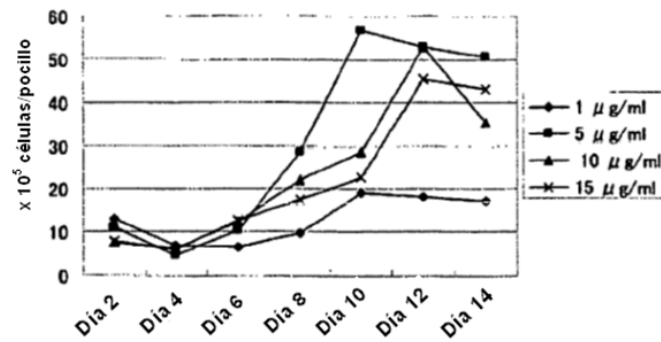


FIG. 1

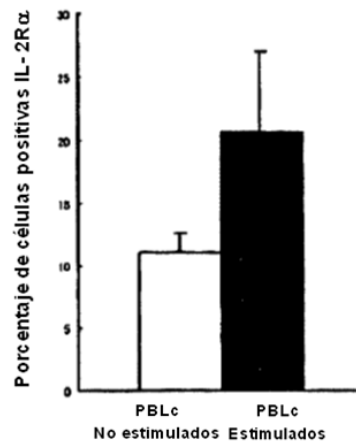


FIG. 2

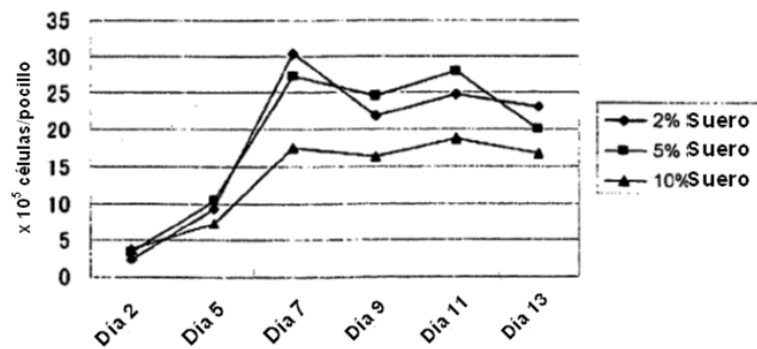


FIG. 3

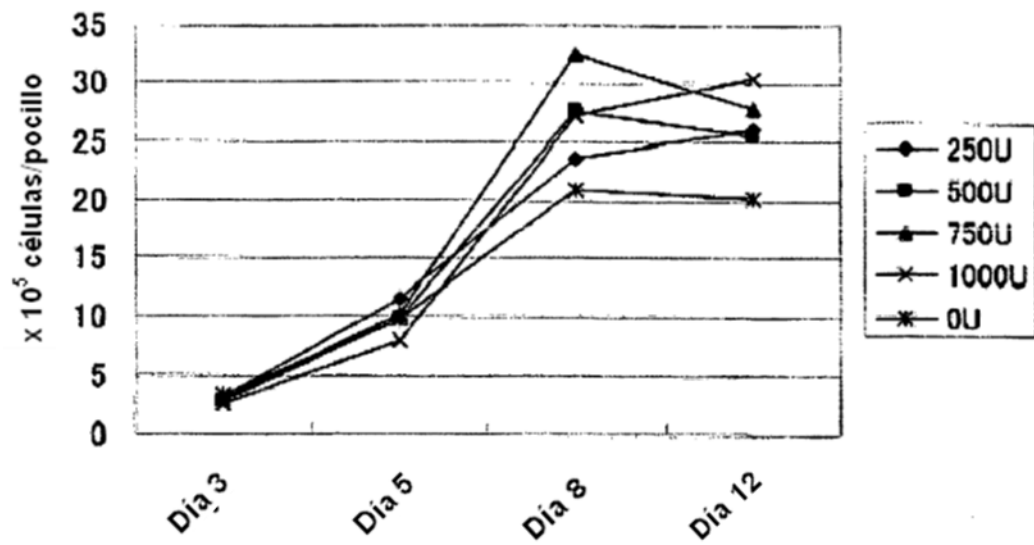


FIG. 4

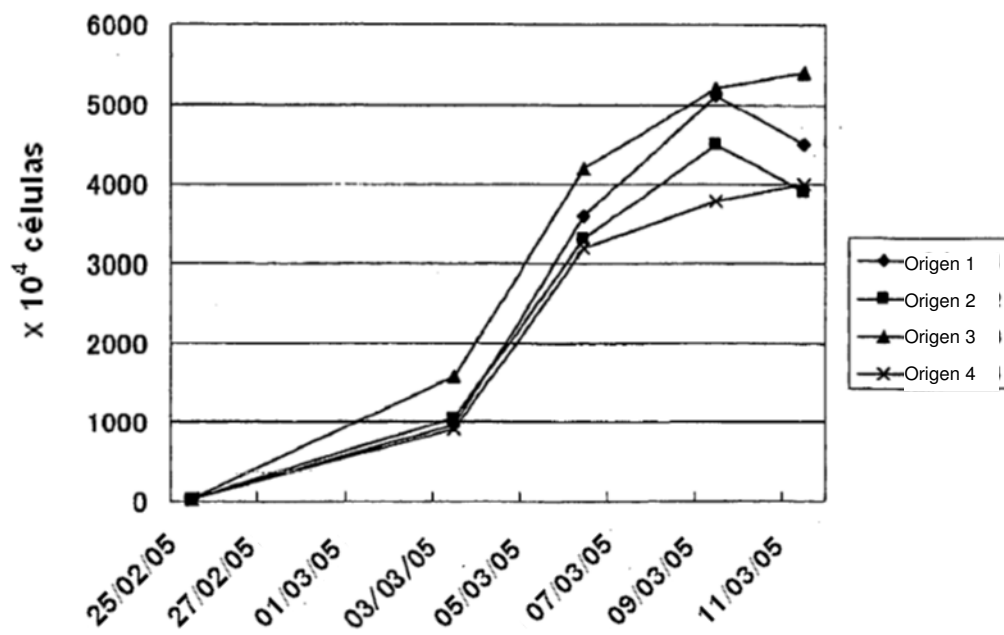


FIG. 5

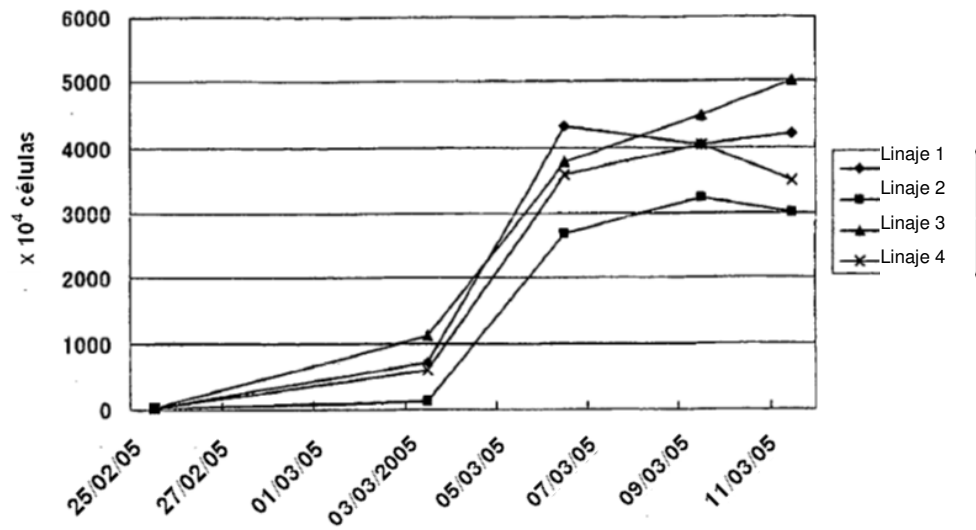


FIG. 6

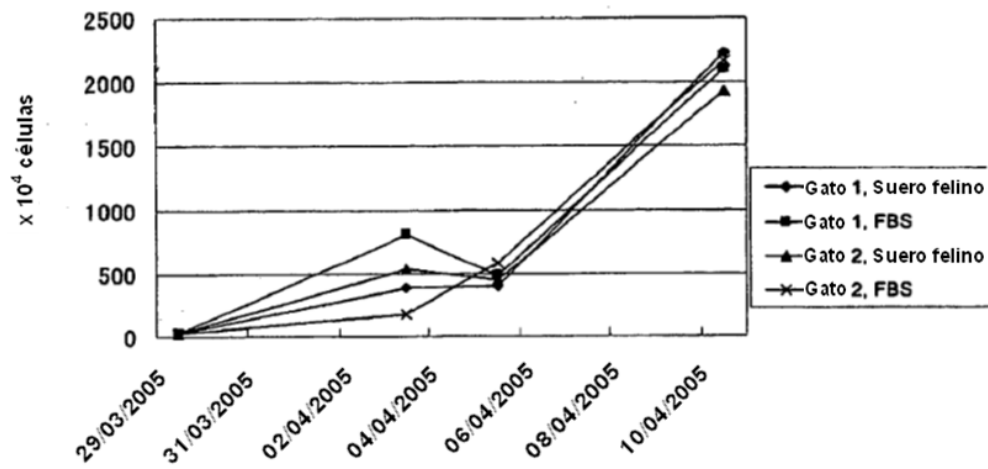


FIG. 7

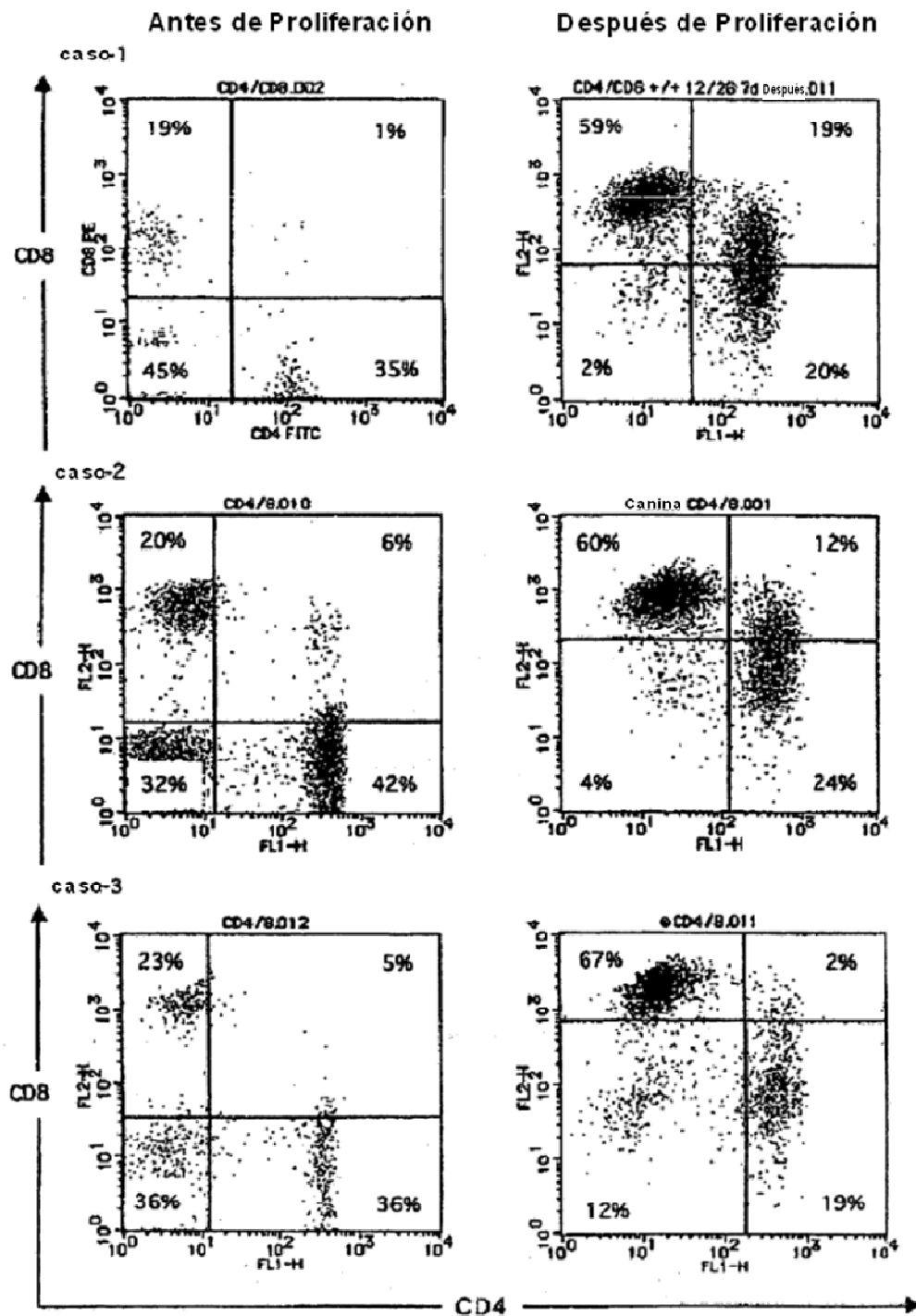


FIG. 8

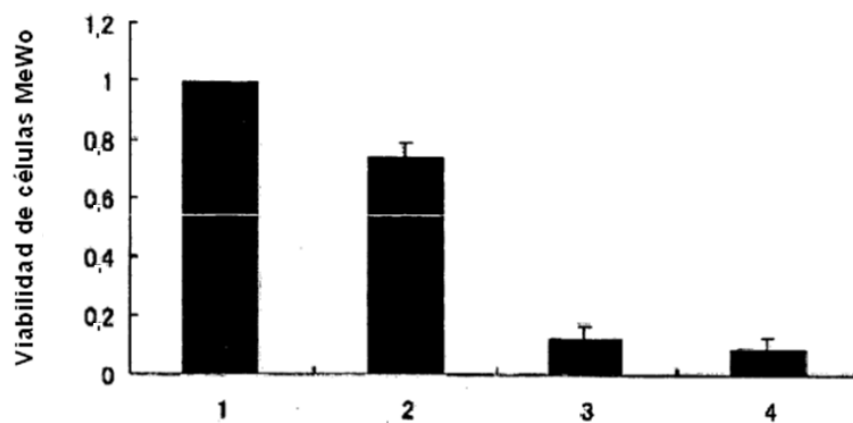


FIG. 9

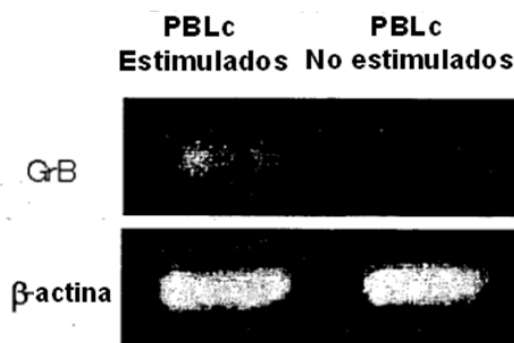


FIG. 10

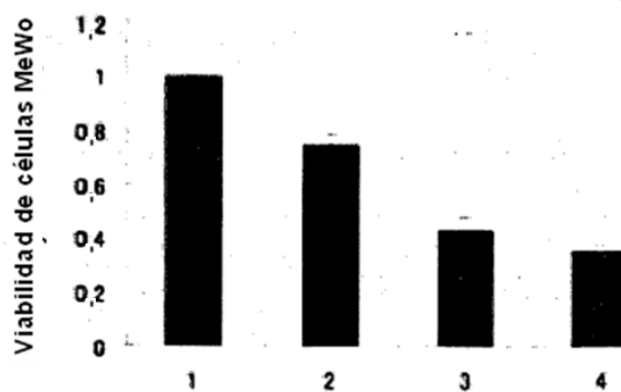


FIG. 11

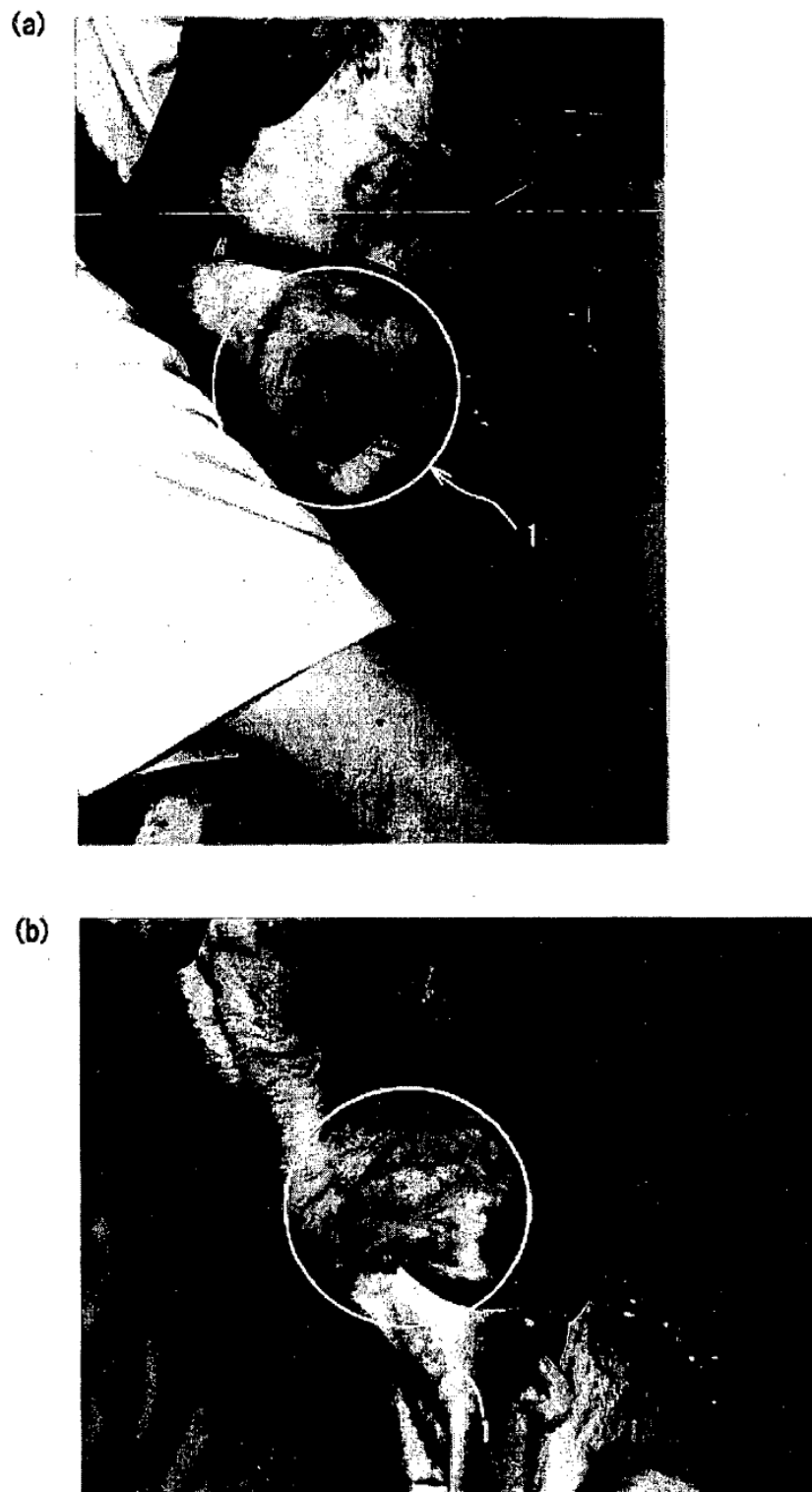
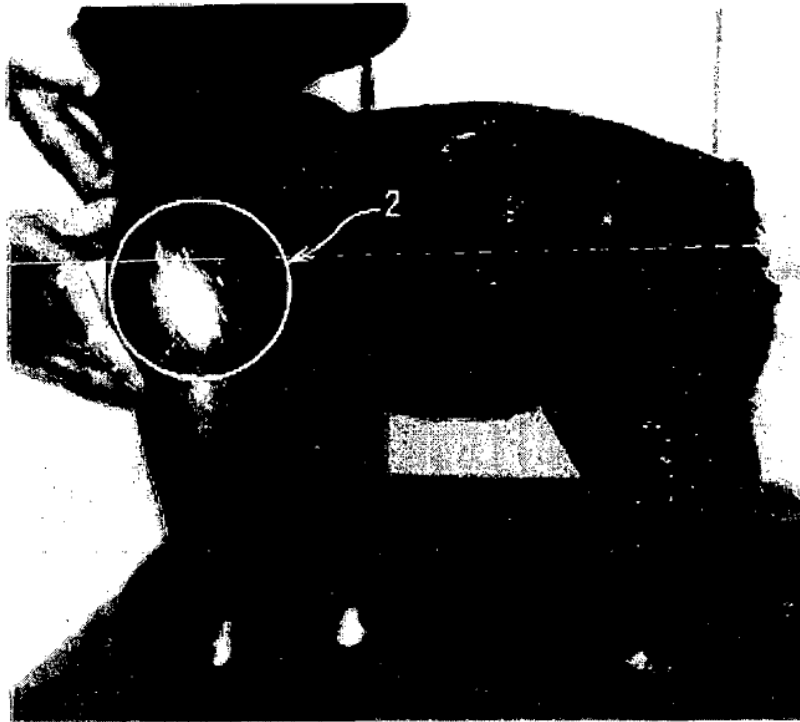


FIG. 12

(a)



(b)

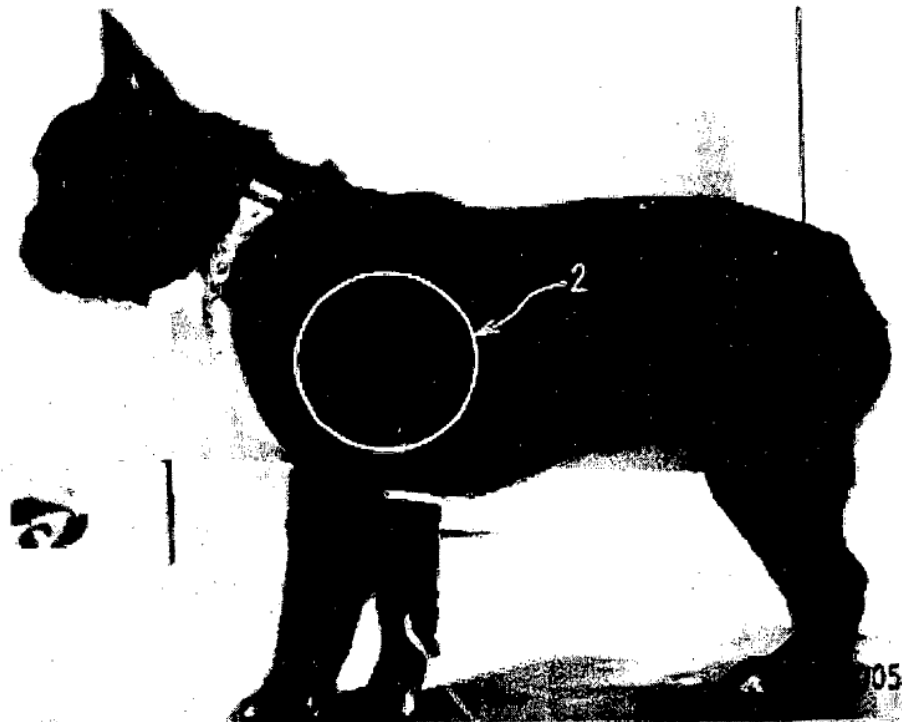
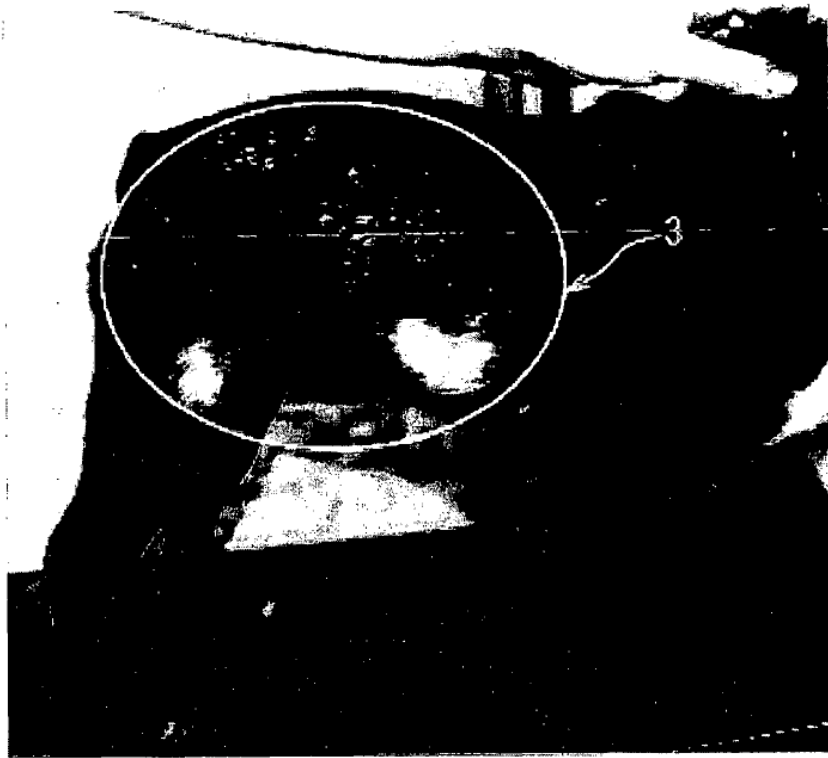


FIG. 13

(a)



(b)

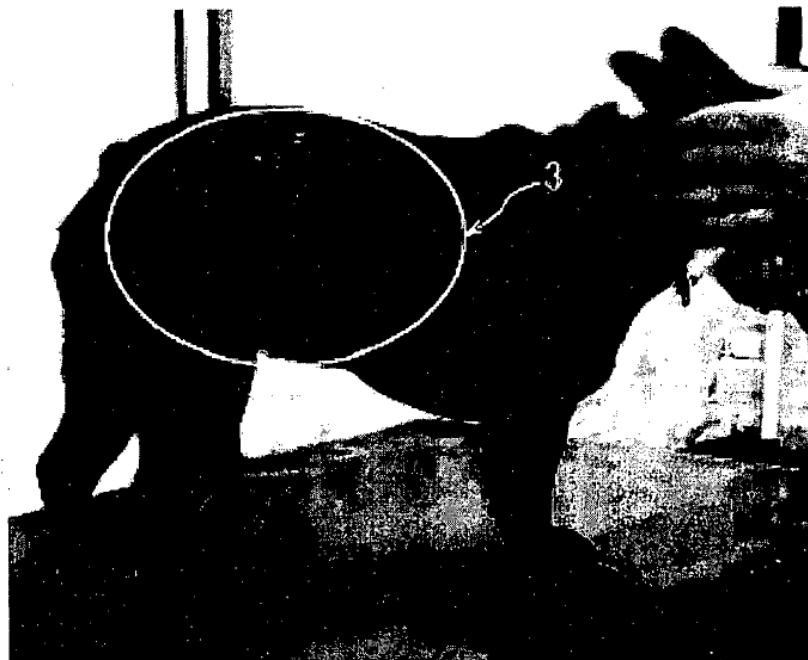


FIG. 14