

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 666**

51 Int. Cl.:

A61K 38/38 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2012 PCT/KR2012/011114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13094988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12859499 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2794859**

54 Título: **Procedimiento de producción de linfocitos citolíticos naturales, linfocitos citolíticos naturales producidos de este modo y composición para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas que contienen los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2011 KR 20110140361

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

05.02.2018

73 Titular/es:

**MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE (50.0%)
107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 446-799, KR y
GREEN CROSS LABCELL CORP. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MIN, BOKYUNG;
CHOI, HANA;
LIM, OKJAE;
HER, JUNG HYUN;
KANG, SANGMI;
LEE, EUN-KYOUNG;
CHUNG, HYEJIN y
HWANG, YU KYEONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 652 666 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 producción de linfocitos citolíticos naturales, linfocitos citolíticos naturales producidos de este modo y composición para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas que contienen los mismos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de linfocitos citolíticos naturales (en lo sucesivo en el presente documento denominados "linfocitos NK").

Técnica anterior

- 10 Para el tratamiento del cáncer se han desarrollado y utilizado diversos procedimientos de tratamiento, incluyendo cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, en el caso de cánceres y pacientes particulares estos procedimientos de tratamiento son difíciles de aplicar y existe una alta posibilidad de recidiva.

- 15 Por lo tanto, la inmunoterapia que utiliza la función inmunitaria de los pacientes ha recibido una creciente atención y está basada en la eliminación de cánceres mediante interacciones complejas entre células inmunitarias que tienen diversas funciones. Las células inmunitarias que eliminan células cancerosas de forma directa incluyen los linfocitos NK y linfocitos T citotóxicos (los CTL) y las que presentan antígenos a estas células efectoras incluyen las células dendríticas (las CD) o los linfocitos B. Otros ejemplos incluyen linfocitos T auxiliares (linfocitos Th), los linfocitos T reguladores (los linfocitos Treg) y similares, que secretan diversas citocinas. Entre estas células inmunitarias se reconocen los linfocitos NK como las células inmunitarias más rápidamente eficaces y eficientes.

- 20 Los linfocitos NK son linfocitos que suponen aproximadamente el 10 % de las células sanguíneas y desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias. Los linfocitos NK tienen diversas funciones, en particular tienen la capacidad de destruir células cancerosas o células infectadas con bacterias patógenas externas y, por lo tanto, actúan eliminando células cancerosas o células que evolucionan a cánceres.

- 25 Habitualmente, la mayoría de los linfocitos NK están presentes en el cuerpo en un estado inactivo, pero para el uso de los linfocitos NK para fines terapéuticos estos necesitan activarse. Por lo tanto, se han llevado a cabo estudios activamente sobre la activación de linfocitos NK procedentes de sangre normal o de la sangre inactivada de pacientes.

- 30 La alta citotoxicidad de los linfocitos NK conseguida mediante la activación de linfocitos NK *ex vivo*, demostró las posibilidades de los linfocitos NK para la inmunoterapia celular. Se ha informado que los linfocitos NK activados *ex vivo* tienen efectos terapéuticos sobre diversos cánceres cuando se administran tras el trasplante de médula ósea alogénico, en particular cánceres hematológicos tales como la leucemia (Blood Cells Molecules & Disease, 33: pág. 261-266, 2004). Sin embargo, los distintos efectos terapéuticos de los linfocitos NK sobre los cánceres sólidos, distintos del cáncer hematológico, no se han demostrado desde el punto de vista clínico. En concreto, se ha informado que la administración de linfocitos NK antes de la formación de cánceres puede interferir con el prendimiento del injerto de cánceres (Cancer Immunol. Immunother., 56(11): pág. 1733-1742, 2007), pero este modelo de tratamiento no parece ser adecuado. Además se ha informado que la administración intraperitoneal de linfocitos NK en pruebas en animales inhibió el crecimiento de las células mamarias, pero no está claro si este efecto inhibidor puede atribuirse a los linfocitos NK (Breast Cancer Res. Treatment, 104(3): pág. 267-275, 2007).

- 40 En tanto, a pesar de la posibilidad de los linfocitos NK como agentes terapéuticos para cánceres o enfermedades infecciosas, la cantidad de linfocitos NK presentes *in vivo* no es grande, y por lo tanto se necesita una tecnología para producir grandes cantidades de linfocitos NK mientras se mantiene una eficacia suficiente para los fines terapéuticos. Sin embargo, los linfocitos NK no se cultivan y expanden *in vitro* suficientemente. Por lo tanto, ha recibido atención la tecnología de cultivo y expansión de linfocitos NK a niveles útiles y se han realizado muchos estudios sobre la misma, pero los resultados del estudio no son aún aplicables desde el punto de vista clínico.

- 45 Ha habido estudios sobre el cultivo de linfocitos NK no solo utilizando IL-2, que han sido sobre la proliferación/actividad de linfocitos T, sino también IL-15 (J. Immunol., 167(6): pág. 3129-3138, 2001; Blood, 106(1): pág. 158-166, 2005, documento KR2009-0121694A), el anticuerpo OKT-3 (Experimental Hematol., 29(1): pág. 104-113, 2001) que estimula CD3 y LPS (J. Immunol., 165(1): pág. 139-147, 2000). Sin embargo, tales estudios simplemente han descubierto una modificación del uso de IL-2 y un nuevo proliferador, pero no sugieren un procedimiento destacado de proliferación. En general se sabe que cuando los linfocitos NK se cultivan utilizando IL-2 u otras citocinas o productos químicos, la cantidad de linfocitos NK aumenta solo en aproximadamente 3-10 veces la cantidad inicial de linfocitos NK.

- 55 Algunos investigadores informaron que los linfocitos NK se expandían utilizando líneas celulares de cáncer como células alimentadoras. Se ha informado que el uso de la línea celular de leucemia CTV-1 mostró poca o ninguna mejora en la proliferación (J. Immunol., 178(1): pág. 85-94, 2007) y que el cultivo utilizando las LCL-VEB durante 21 días aumentaba la cantidad de células en un promedio de aproximadamente 490 veces (Cytotherapy, 11(3): pág. 341-355, 2009). Además, el cultivo de linfocitos NK durante 3 semanas utilizando CPA (células presentadoras de antígeno) artificiales obtenidas mediante la expresión de 4-1BBL y de IL-15 unida a membrana en las células K562

5 aumentó la cantidad de linfocitos NK en un promedio de 227 veces y una citotoxicidad elevada, que apareció *in vitro* e *in vivo*, pero se mostró una limitada proliferación provocada por muerte celular (Cancer Res., 69(9): pág. 4010-4017, 2009). Recientemente, se informó que el cultivo de linfocitos NK durante 3 semanas en la línea celular K562 transfectada con MICA, 4-1BBL e IL-15 aumentó la cantidad de linfocitos NK en un promedio de 350 veces (Tissue Antigens, 76(6): pág. 467-475, 2010) y hubo un informe de que, cuando los linfocitos NK se cultivaban durante 2 semanas utilizando la línea celular K562 transfectada con IL-21 unida a membrana mientras se las estimulaba a intervalos de 7 días, el número de células aumentaba en un promedio de 21.000 veces. Sin embargo, se utilizaron procedimientos inadecuados para garantizar la seguridad, importante para la aplicación clínica, debido a que todas las líneas celulares utilizadas eran de cáncer. Además, debido a que se utilizan como células alimentadoras células cancerosas específicas, los linfocitos NK resultantes tienen una especificidad de inducción para células cancerosas específicas.

15 Las células obtenidas mediante el enriquecimiento de linfocitos NK a partir de leucocitos de sangre periférica (los LSP) sin aislamiento de linfocitos NK, tienen baja toxicidad en comparación con los linfocitos NK puros, y contienen linfocitos T que reconocen células propias y no propias mediante moléculas del MHC autólogas. Por lo tanto, las células están limitadas al trasplante autólogo, siempre y cuando los linfocitos T no se eliminen. Recientemente se ha desarrollado un procedimiento que comprende una etapa de aislamiento de linfocitos NK y la expansión de los linfocitos NK aislados con una estimulación adecuada utilizando células alimentadoras, y un procedimiento para expandir de forma selectiva los linfocitos NK utilizando LSP entera o células mononucleares de sangre periférica (las CMSP). Además, se ha informado un procedimiento para el cultivo de linfocitos NK que comprende un procedimiento de cultivo de linfocitos NK utilizando un medio que contiene anticuerpo anti CD3 y proteína interleucina en presencia de leucocitos de sangre periférica (documento KR 10-2010-0011586 A).

25 El procedimiento de expansión general para aplicaciones alogénicas comienza con dos etapas secuenciales de empobrecimiento magnético de linfocitos T CD3+ y el enriquecimiento de linfocitos NK CD56+. Para estimular la proliferación de linfocitos NK se utilizan a menudo células alimentadoras irradiadas tales como las CMSP [Cytotherapy 12: 750-763, 2010], líneas de células linfoblastoides transformadas con virus de Epstein-Barr (las LCL-VEB) [Cytotherapy 11: 341-55, 2009]. Las células alimentadoras irradiadas estimulan los linfocitos NK a través tanto de factores humorales como del contacto directo célula a célula [Blood 80: 2221-2229, 1992].

30 En la presente invención, los inventores establecieron un procedimiento simplificado y eficaz de expansión a gran escala y activación de linfocitos NK para el uso clínico a partir de voluntarios sanos. Tras una única etapa de empobrecimiento magnético de linfocitos T CD3+, las CMSP empobrecidas se estimularon y expandieron de forma repetida con CMSP irradiadas autólogas en presencia de OKT3 e IL-2, dando como resultado una población altamente pura de linfocitos NK CD3-CD16+CD56+, que es lo que se desea para fines alogénicos.

35 En tanto, la albúmina es una de las proteínas que constituyen la sustancia básica de las células y tiene el peso molecular más bajo entre las proteínas simples presentes en la naturaleza. La albúmina en general es conocida por utilizarse como un conservante para formulaciones biológicas, aunque el uso de la albúmina para aumentar la estabilidad de los linfocitos NK no se ha notificado aún.

40 Como se describe anteriormente, se ha descrito una diversidad de procedimientos para el cultivo de linfocitos NK, pero existe aún una urgente necesidad de una tecnología que pueda cultivar y expandir de forma segura y estable una cantidad suficiente de linfocitos NK para la aplicación en inmunoterapia celular, utilizando un procedimiento compatible desde el punto de vista clínico y que permita almacenar de forma estable los linfocitos NK producidos, durante un largo periodo de tiempo y que se suministren cuando sea necesario. En particular, para utilizar los linfocitos NK vivos para fines terapéuticos se necesita superar el inconveniente de los linfocitos NK de que el periodo en el que la actividad de los mismos se mantiene (que es el periodo de disponibilidad) es solo de varios días. Por lo tanto, existe una urgente demanda de una tecnología que pueda mejorar de forma significativa la utilización de células inmunitarias mediante el cultivo y la producción de linfocitos NK, la criopreservación de los linfocitos NK producidos y la descongelación y provisión de las células almacenadas cuando se necesite.

50 El documento WO 2010/013947 desvela un procedimiento de crecimiento mejorado para linfocitos citolíticos naturales que puede obtener una gran cantidad de linfocitos citolíticos naturales mediante el aumento de la velocidad de crecimiento, en comparación con los procedimientos de crecimiento convencionales para linfocitos citolíticos naturales. Dicho documento se refiere a un medio de crecimiento para linfocitos citolíticos naturales que comprende una etapa de cultivar linfocitos citolíticos naturales en un medio que contiene anticuerpos anti CD3 y proteínas interleucina en presencia de linfocitos de sangre periférica.

55 El documento US 2003/0068306 desvela un medio para expandir linfocitos citolíticos naturales que expresan el fenotipo CD56+CD4-, que comprende CellGro® SCGM (sigla del inglés *stem cell growth medium*, medio de cultivo para células madre) al que se ha añadido interleucina 2, anticuerpos anti CD3 y, de forma opcional, suero.

El documento WO 2009/151183 desvela una composición de medio para cultivar linfocitos autoactivados que se puede aplicar al tratamiento de tumores malignos, al que se añaden anticuerpos anti CD3, anti CD16 y anti CD56, junto con interleucina 2 para activar de forma uniforme linfocitos citolíticos naturales.

El documento 2008/138214 desvela un procedimiento de activación y expansión de linfocitos que comprende poner en contacto muestras biológicas que contienen linfocitos con anticuerpo anti CD3 movilizado, y después cultivar los linfocitos activados utilizando medios que contienen IL-2 en distintas concentraciones, para expandir los linfocitos activados.

- 5 LI, Xiao-Hong y col.: "Ex vivo expansion of highly purified NK cells from human peripheral blood", Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi - Journal of Experimental Hematology, Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhishe, Beijing, CN, vol. 15, n.º 2, 1 de abril 2007 (01-04-2007), páginas 373-377, documento XP009160095, ISSN: 1009-2137 desvelan la expansión *ex vivo* de linfocitos NK altamente purificados a partir de sangre periférica humana mediante lo cual las células aisladas se cultivaron en SCEM (siglas del inglés *stem cell expansion medium*, medio de expansión de células madre) complementado con suero AB humano al 10 % y distintas combinaciones de IL-2 y/o IL-12, IL-15 durante 15 días.

El documento WO 2008/023874 desvela un procedimiento de preparación de linfocitos activados que comprende aislar linfocitos a partir de sangre periférica, y proliferar y activar los linfocitos aislados *in vitro*.

Divulgación de la invención

- 15 Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de producción para producir grandes cantidades de linfocitos NK citotóxicos en un periodo corto de tiempo, mediante el cultivo y la proliferación eficaces y seguros de linfocitos NK de un modo compatible desde el punto de vista clínico.

Se describe una composición que contiene linfocitos NK que tienen estabilidad mejorada de almacenamiento a largo plazo y una formulación farmacéutica que comprende a los mismos. En particular, la composición puede proporcionarse como un producto congelado y mantiene una viabilidad celular y citotoxicidad de los linfocitos NK elevadas, incluso cuando se descongelan.

Los linfocitos NK producidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención y una composición que comprende los mismos, pueden utilizarse de forma eficaz para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el cambio en la proliferación de linfocitos NK mediante la reestimulación con células alimentadoras. (a) muestra el cambio en la velocidad de proliferación de linfocitos NK de acuerdo con la cantidad de reestimulaciones. (a), una vez: aplicación de estimulación una vez en el día 0; dos veces: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 7; y tres veces: aplicación de estimulación tres veces en los días 0, 7 y 14. (b) muestra el cambio en la velocidad de proliferación de linfocitos NK de acuerdo con el punto de tiempo de aplicación de la reestimulación, en la que D0: aplicación de estimulación una vez en el día 0; D0/D7: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 7; y D0/D10: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 10.

La FIG. 2 muestra un cambio en la viabilidad celular por la reestimulación con células alimentadoras de linfocitos NK cultivados, en la que D0: aplicación de estimulación una vez en el día 0; D0/D7: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 7; y D0/D10: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 10.

La FIG. 3 muestra un cambio en la citotoxicidad por la reestimulación con células alimentadoras de linfocitos NK cultivados, en la que D0: aplicación de estimulación una vez en el día 0; D0/D7: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 7; y D0/D10: aplicación de estimulación dos veces en los días 0 y 10.

La FIG. 4 muestra los resultados del análisis del fenotipo de los linfocitos NK cultivados, por la reestimulación con células alimentadoras, en la que (a1 y a2): identidad y pureza de linfocitos NK; (b1 y b2): receptores activadores de linfocitos NK; y (c1 y c2): receptores inhibidores de linfocitos NK.

La FIG. 5 muestra los cambios en la viabilidad y la citotoxicidad celular de acuerdo con la concentración de albúmina en una composición que contiene linfocitos NK, en la que (a) cambio en la viabilidad de los linfocitos NK; y (b) cambio en la citotoxicidad de los linfocitos NK.

La FIG. 6 muestra los cambios en la viabilidad, citotoxicidad y fenotipo celular de linfocitos NK en una composición, que es el resultado de la adición de albúmina, en la que (a) cambio en la viabilidad de los linfocitos NK; y (b) cambio en la citotoxicidad de los linfocitos NK; y (c) cambio en el fenotipo de linfocitos NK.

La FIG. 7 muestra el cambio en linfocitos NK resultante de la congelación, en la que (a) viabilidad celular tras la congelación/descongelación; (b) recuperación tras la congelación/descongelación; (c) citotoxicidad tras la congelación/descongelación; y (d): nivel de expresión de fenotipos celulares en células CD56+ tras la congelación/descongelación.

La FIG. 8 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de linfoma, en la que (a) el efecto sobre el alivio de la parálisis de las extremidades posteriores en el modelo de prueba; y (b) el efecto sobre la mejora de la supervivencia del modelo de prueba.

La FIG. 9 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de cerebro (glioblastoma) tras la administración intracraneal, en la que (a) los resultados de la observación del volumen tumoral por examen histológico; (b) los resultados del análisis TUNEL de acuerdo con el número de células; y (c) el cambio del volumen tumoral de acuerdo con el número de linfocitos NK.

La FIG. 10 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de cerebro tras

la administración intravenosa, en la que (a): los resultados de la observación del volumen tumoral por examen histológico; y (b) el cambio del volumen tumoral de acuerdo con el número de linfocitos NK.

La FIG. 11 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de cerebro cuando se administran en combinación con un agente antineoplásico.

La FIG. 12 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de ovario, en la que (a) el cambio de tamaño tumoral en función del periodo de administración de linfocitos NK (imágenes *in vivo*); y (b) los resultados de la observación del cambio del tamaño tumoral resultante de la administración de linfocitos NK.

La FIG. 13 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de hígado.

La FIG. 14 muestra el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de neuroblastoma.

La FIG. 15 muestra la eficacia *in vitro* de los linfocitos NK frente a diversas líneas celulares de cáncer y líneas celulares infectadas con virus.

(a) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares K562 (Leucemia)

(b) citotoxicidad celular frente a líneas celulares Raji (Linfoma)

(c) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a líneas celulares SK-N-SH (Neuroblastoma)

(d) citotoxicidad celular frente a líneas celulares SNUOT-Rb1 (retinoblastoma)

(e) citotoxicidad celular frente a la línea celular U87-MG (Glioblastoma)

(f) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares OVCAR-3 (cáncer de ovario)

(g) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares Huh-7 (CHC, carcinoma Hepatocelular),

(h) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares SNU398 (CHC infectado con VHB)

(i) citotoxicidad celular y capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares Huh-7.5 (CHC infectado con VHB).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento es bien conocida y se emplea comúnmente en la técnica.

Un procedimiento para producir linfocitos NK de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de:

(i) aislar leucocitos de sangre periférica y linfocitos NK de sangre periférica humana;

(ii) estimular linfocitos NK llevando a cabo un cultivo estacionario durante 2-15 días en un medio que contiene anticuerpo anti CD3, citocina y células alimentadoras, para provocar el contacto célula-célula;

(iii) tras la finalización del cultivo estacionario de la etapa (ii), reestimar las células mediante la adición de citocina, anticuerpo anti CD3 y células alimentadoras, y llevar a cabo el cultivo estacionario para estimular que se produzca el contacto célula-célula;

(iv) tras la finalización del cultivo estacionario, añadir a las células un medio que contiene la citocina necesaria para el cultivo estacionario o en suspensión, y llevar a cabo el cultivo estacionario o en suspensión mientras se mantiene la concentración celular y la concentración de citocina en niveles constantes.

Para obtener una cantidad aumentada de linfocitos NK, antes del siguiente cultivo estacionario o en suspensión pueden repetirse la estimulación y el cultivo estacionario. Los linfocitos NK producidos mediante este procedimiento de la presente invención mantienen una alta viabilidad celular y citotoxicidad para presentar grandes efectos terapéuticos frente a cánceres y enfermedades infecciosas, y pueden cultivarse *ex vivo* con una alta eficacia y alta concentración.

En la presente invención, el cultivo estacionario después de la estimulación inicial se realiza durante aproximadamente 2-15 días, preferentemente 5-10 días, y el cultivo estacionario después de la reestimulación se realiza durante aproximadamente 2-7 días, preferentemente 3-5 días.

Tras la finalización del cultivo estacionario, las células se cultivan preferentemente de forma estacionaria o en suspensión en un incubador, mientras la concentración de citocina se mantiene a un nivel constante.

El procedimiento de producción de linfocitos NK de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, comprender las etapas de:

(i) aislar leucocitos de sangre periférica y linfocitos NK de sangre periférica humana;

(ii) añadir los linfocitos NK aislados a un medio que contiene anticuerpo anti CD3 y citocina, estimular los linfocitos NK mediante la adición de células alimentadoras y llevar a cabo el cultivo estacionario durante 2-15 días, preferentemente 5-10 días, para estimular el contacto célula-célula;

(iii) tras la finalización del cultivo estacionario de la etapa (ii), reestimar las células mediante la adición de

citocina, anticuerpo anti CD3 y células alimentadoras, y llevar a cabo el cultivo estacionario durante 2-7 días, preferentemente 3-5 días, para estimular el contacto célula-célula;

(iv) tras la finalización del cultivo estacionario, añadir un medio que contenga citocina y similares, necesario para el cultivo estacionario o en suspensión, y llevar a cabo el cultivo estacionario o en suspensión, mientras se mantiene la concentración celular y de citocina a niveles constantes.

En el procedimiento para producir linfocitos NK puede repetirse una o más veces la etapa (iii) de reestimulación de las células y de llevar a cabo el cultivo estacionario. El procedimiento de la presente invención puede comprender adicionalmente, antes de la etapa (ii), una etapa de preparación de células alimentadoras.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cultivo estacionario" significa cultivar células en un incubador en un estado estacionario sin agitación o balanceo y como se usa en el presente documento la expresión "cultivo en suspensión" significa cultivar células en un estado suspendido mediante aireación o agitación sin adhesión de las células a la parte inferior o al lateral del reactor.

Los ejemplos de un reactor que puede utilizarse para cultivo estacionario en la presente invención incluyen, pero sin limitación, matraces, matraces T, bolsas desechables de cultivo celular y similares. Los ejemplos de un reactor que puede utilizarse para el cultivo en suspensión en la presente invención, incluyen, pero sin limitación, matraces agitadores, incubadores de agitación, fermentadores, matraces T, bolsas desechables de cultivo celular y similares. Además, puede utilizarse cualquier biorreactor que sea adecuado para conseguir el objeto de la presente invención y un experto en la materia con la que está relacionada la presente invención puede seleccionarlo fácilmente.

Además, el reactor para cultivo estacionario y cultivo en suspensión puede ser el mismo o distinto. Por ejemplo, cuando el reactor para cultivo estacionario y el reactor para cultivo en suspensión es el mismo, se finaliza el cultivo estacionario y después puede suministrarse adicionalmente al mismo reactor un medio que contenga los componentes nutritivos necesarios tales como una citocina, seguido del cultivo en suspensión. Cuando se utilizan reactores distintos, tras la finalización del cultivo estacionario, las células cultivadas pueden transferirse al reactor para el cultivo en suspensión.

Los ejemplos del reactor para cultivo en suspensión incluyen, pero sin limitación, un biorreactor de onda (Ge Healthcare), un biorreactor de único uso (SUB; Thermo Fisher), un biorreactor XDR de único uso (Xcellerex), una bolsa de cultivo celular (Nipro), un incubador de células de la serie PBS (PBS Biotech) (véanse los documentos WO 07/111677A, WO 08/133845A y WO 09/132192A), una bolsa de cultivo celular (Fujimori), matraces de agitación desechables (Erlenmeyer) y así. En particular, es preferente el incubador de células de la serie PBS (PBS Biotech).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "células alimentadoras" se refiere a células que no tienen la capacidad de dividirse y proliferar, pero que tienen actividad metabólica y así producen diversos productos metabólicos que ayudan a la proliferación de los linfocitos NK diana. Los ejemplos de células alimentadoras que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, líneas celulares animales en las que ha introducido genes, leucocitos de sangre periférica (LSP) tratados con diversas citocinas o compuestos, leucocitos de sangre periférica (LSP) autólogos o alogénicos, linfocitos T, linfocitos B, monocitos y similares. Preferentemente, pueden utilizarse monocitos de sangre periférica autólogos. Además, pueden utilizarse otras células alimentadoras conocidas en la técnica siempre y cuando coincidan con el objeto de la presente invención.

Los monocitos de sangre periférica autólogos que se utilizan como células alimentadoras pueden utilizarse en un estado inactivado para asegurar la seguridad. Para la inactivación, puede utilizarse un procedimiento convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse irradiación con rayos gamma. Las células alimentadoras inactivadas incluyen linfocitos T aislados. El procedimiento que utiliza células alimentadoras como se describe en la presente invención es un procedimiento de suspensión de linfocitos NK tras el aislamiento y es ventajoso en que solo proliferan de forma continua linfocitos NK puros.

"Anticuerpo anti CD3" en la presente invención es un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno CD3, una molécula que se une de forma específica al receptor de linfocitos T (TCR) para formar un complejo de reconocimiento de anticuerpos, en que la molécula CD3 se une al TCR para transferir una señal de reconocimiento de antígeno a la célula. Como anticuerpo anti CD3 puede utilizarse en la presente invención cualquier anticuerpo sin limitación, siempre cuando tenga la propiedad de unirse a CD3. El anticuerpo anti CD3 se selecciona preferentemente del grupo que consiste en OKT3, UCHT1 y HIT3a, pero sin limitación a los mismos.

En la presente invención, la citocina que puede incluirse en el medio es preferentemente una o más seleccionadas entre las interleucinas. Como se utiliza en el presente documento, el término "interleucinas" se refiere de forma colectiva a proteínas biológicamente activas que producen las células inmunitarias tales como linfocitos, monocitos o macrófagos. Una interleucina que puede utilizarse en la presente invención es una o más seleccionada del grupo que consiste en interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18) e interleucina 21 (IL-21). En particular, se utiliza pero sin limitación preferentemente IL-2. Además, también pueden utilizarse pero sin limitación otras citocinas conocidas para los expertos en la técnica, siempre y cuando coincidan con el objeto de la presente invención.

En la presente invención, el anticuerpo anti CD3 se utiliza para el cultivo estacionario y el cultivo en suspensión, y la concentración de anticuerpo anti CD3 en el medio es de 0,1-1.000 ng/ml, preferentemente de 1-100 ng/ml y más preferentemente de 5-20 ng/ml, y la concentración de citocina en el medio es de 10-2.000 UI, preferentemente 100-1.000 UI y más preferentemente aproximadamente 200-700 UI.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “estimulación” significa inducir la proliferación de linfocitos NK añadiendo a los mismos células alimentadoras o similares, y para la estimulación también puede utilizarse anticuerpo anti CD3 junto con las células alimentadoras.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término “reestimulación” significa reinducir la proliferación de linfocitos NK otra vez, añadiendo a los mismos células alimentadoras y/o anticuerpo anti CD3, tras un determinado tiempo de cultivo.

15 En la presente invención, el medio para uso en la producción de linfocitos NK puede ser un medio convencional para el cultivo de células animales, tal como medio CellGro (Cellgenix), medio AIM-V, medio RIMI-1640 o medio X-VIVO20. Este medio para cultivo de células animales puede, si es necesario, contener uno o más componentes seleccionados de linfocitos NK aislados de sangre periférica humana, monocitos de sangre periférica, anticuerpos anti CD3 e interleucinas.

20 En particular, en el procedimiento para producir linfocitos NK de acuerdo con la presente invención, para mantener la concentración celular y la concentración de citocinas a niveles constantes, pueden medirse en el medio las concentraciones de citocinas y células a intervalos de tiempo regulares y, a base de las mediciones, puede proporcionarse medio que contiene citocinas de acuerdo con la concentración celular y la concentración de citocinas.

25 Además, el medio para cultivo puede contener suero, plasma o un factor de proliferación adicional que sustente la proliferación de los linfocitos. El suero o plasma que se añade al medio no está limitado de forma específica y puede ser un producto comercial obtenido de un animal. Más preferentemente, se utiliza suero o plasma humano autólogo. Por ejemplo, como sabe un experto en la materia, es posible utilizar ya sea una combinación de citocinas que induce la proliferación de los linfocitos procedentes de monocitos de sangre periférica o lectinas que estimulen la proliferación de los linfocitos.

Los linfocitos NK producidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención pueden proporcionarse como una composición terapéutica utilizando un excipiente y un aditivo adecuados. Esta composición puede administrarse a un paciente que necesite tratamiento, consiguiendo de este modo los efectos terapéuticos.

30 En particular, cuando se añade albúmina a una composición que contiene linfocitos NK producidos mediante el procedimiento de la presente invención, la estabilidad de almacenamiento a largo plazo, la citotoxicidad y la viabilidad celular de los linfocitos NK podrían aumentarse enormemente. La cantidad de albúmina que se añade a la composición de la presente invención no está específicamente limitada, pero puede añadirse albúmina en una cantidad del 0,1-5 % en peso y preferentemente del 0,5-2 % en peso, a base del peso total de la composición de la presente invención.

35 Además, cuando se utiliza un procedimiento de cultivo para la producción de linfocitos NK que mantiene la concentración celular a un nivel constante, puede prevenirse el sobrecrecimiento de las células de forma que las células puedan mantenerse en un estado óptimo. En particular, aun cuando las células se descongelan tras la congelación, la función de las células no está afectada y los linfocitos NK pueden mantener una viabilidad celular y una citotoxicidad altas. Por lo tanto, los linfocitos NK pueden almacenarse fácilmente y suministrarse en un estado líquido o congelado sin necesidad de un procedimiento de tratamiento adicional.

40 Los linfocitos NK producidos mediante el procedimiento de la presente invención y una composición que contenga los mismos pueden utilizarse para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas. Los linfocitos NK producidos mediante el procedimiento de la presente invención pueden aplicarse a todos los tipos de cánceres, incluyendo el cáncer sólido y el cáncer hematológico. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cáncer sólido” se refiere a un cáncer de tipo en masa formado en un órgano, a diferencia del cáncer hematológico. Los cánceres que se desarrollan en la mayoría de los órganos corresponden a cánceres sólidos. Los cánceres que pueden tratarse utilizando los linfocitos NK de la presente invención no están limitados, y los ejemplos preferentes de los mismos incluyen, pero sin limitación, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia mieloide aguda, cáncer de cerebro, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de las glándulas salivales, linfoma y etcétera. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “enfermedades infecciosas” pretende incluir a todas las enfermedades que están provocadas por una infección por virus o bacterias patógenas, y que pueden producir infección a través de órganos respiratorios, la sangre o por contacto con la piel. Los ejemplos no limitativos de tales enfermedades infecciosas incluyen, pero sin limitación, infección por virus de hepatitis B, hepatitis C, virus del papiloma humano (VPH), infección con citomegalovirus, enfermedad respiratoria vírica, gripe y etcétera.

Ejemplo

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle en referencia a los ejemplos. Será obvio para una persona que tenga la experiencia habitual en la materia que estos ejemplos son solo con fines ilustrativos y no debe considerarse que limiten el ámbito de la presente invención.

5 **Ejemplo 1: Cultivo de linfocitos NK por estimulación repetida (reestimulación) con células alimentadoras y evaluación de características**

(1) Cultivo de linfocitos NK por estimulación repetida con células alimentadoras

10 Se dispensaron en un vial células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recogidas de donantes sanos y se congelaron en nitrógeno líquido. Se descongeló un vial congelado de CMSP y se transfirió a un tubo de 50 ml, y las células se suspendieron en 20 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía SFB (suero fetal bovino) o autoplasma al 1 % vol. y se centrifugaron a 1200 rpm a 4 °C durante 10 minutos.

15 Los sedimentos de CMSP se suspendieron en 10 ml de tampón de corrida MACS y las células se recontaron mediante tinción con azul de tripano. Para la preparación de células alimentadoras CMSP y el empobrecimiento de CD3, se transfirieron 5×10^7 células a cada uno de los tubos recién preparados de 50 ml y se centrifugaron a 1200 rpm a 4 °C durante 10 minutos.

Las células alimentadoras CMSP se prepararon suspendiendo los sedimentos en 10 ml de medio CellGro (Cellgenix) que contenía autoplasma al 1 % vol., seguido de la irradiación con 2000 cGy en un irradiador de rayos gamma.

20 Para obtener células empobrecidas en CD3, se añadieron a los sedimentos de 5×10^7 células 400 μ l de tampón de corrida y 100 μ l de perlas magnéticas de CD3 (Miltenyi Biotech), y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 20 minutos. El material de reacción se lavó con 20 ml de tampón de corrida MACS y después se centrifugó a 1200 rpm a 4 °C durante 10 minutos, y se suspendió en 2 ml de tampón de corrida MACS. Las células se separaron de la suspensión utilizando una columna CS (Miltenyi Biotech, 130-041-305) equipada con VarioMACS (Miltenyi Biotech), y la columna se lavó para alcanzar un volumen final de 20 ml, recuperando de este modo las células.

25 Las células se recontaron mediante tinción con azul de tripano y se dispensaron 1×10^7 células en tubos recién preparados de 50 ml, y se centrifugaron a 1200 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de medio CellGro (Cellgenix) que contenía autoplasma al 1 % vol.

30 Para el cultivo en bolsas, se añadieron 500 UI de IL-2 y OKT-3 10 ng/ml a un tubo que contenía células alimentadoras CMSP. Se añadió medio CellGro (Cellgenix) que contenía 10 ml de células alimentadoras CMSP, 10 ml de linfocitos NK y 10 ml de autoplasma al 1 % vol. a una bolsa Nipro 350 (Nipro) y se sometió a cultivo estacionario en un incubador a 37 °C durante 5 días. En el presente documento, la bolsa Nipro 350 se plegó a 6 cm del extremo y a 5 cm desde la parte inferior para alcanzar un área de aproximadamente 70 cm² y se utilizó en cultivo estacionario. Para el cultivo en matraces, se utilizó la misma composición que la del cultivo en bolsas, y el cultivo se realizó en una placa de 12 pocillos utilizando medio CellGro que contenía 0,5 ml de células alimentadoras CMSP, 0,5 ml de linfocitos NK y 0,5 ml de autoplasma al 1 % vol. en las mismas condiciones que anteriormente. En el
35 presente documento, la placa de 12 pocillos tenía un área de 3,5-3,8 cm².

A los 5 días de cultivo, las células se recontaron, se diluyeron hasta aproximadamente 2×10^5 células/ml con medio CellGro (Cellgenix) que contenía 500 UI de IL-2 (Proleucina) y autoplasma al 1 % vol. y se sometieron a cultivo estacionario en un incubador adecuado. En el presente documento la concentración celular y el área se ajustaron a 2×10^5 células/ml y 3,5 cm².

40 A los 7, 10 y 14 días desde el inicio del cultivo las células se recontaron y se diluyeron hasta $2-5 \times 10^5$ células/ml con medio CellGro que contenía autoplasma al 1 % vol. Se prepararon 1-10 veces de células alimentadoras y se suspendieron en medio CellGro (Cellgenix) que contenía autoplasma al 1 % vol., seguido de irradiación con 2000 cGy en un irradiador de rayos gamma. Se añadieron a las mismas 500 UI de IL-2 y 10 ng/ml de OKT-3, y se cocultivaron los dos tipos de células.

45 Las células se reestimularon con células alimentadoras, seguido de un cultivo estacionario. Después, las células se recontaron a intervalos de 2-3 días y se sometieron a cultivo en suspensión hasta el día 21 mientras se diluían a $5-10 \times 10^5$ células/ml con medio CellGro (Cellgenix) que contenía 500 UI de IL-2 y autoplasma al 1 % vol. A los 21 días de cultivo en suspensión se recogieron los linfocitos NK.

50 Los linfocitos NK recogidos se suspendieron a $1-5 \times 10^7$ células/ml en solución de Hatmann (Choongwae Pharmaceutical Corp., Corea) que contenía albúmina al 1 % en peso (Green Cross Corp.) y se conservaron a 4 °C.

Los resultados de la reestimulación con células alimentadoras se muestran en la FIG. 1(a). Como puede observarse en ella, cuando la estimulación se aplicó dos o tres veces la proliferación de linfocitos NK pudo aumentarse enormemente en comparación con cuando la estimulación se aplicó una vez. El procedimiento de producción existente mostró una proliferación de linfocitos NK de aproximadamente 161 veces, mientras que la proliferación de

linfocitos NK aumentó 425 veces tras estimular dos veces con células alimentadoras y 1.320 veces tras estimular tres veces con células alimentadoras. Como se muestra en la FIG. 1(b), cuando se realizó adicionalmente estimulación con células alimentadoras a los 7 días o a los 10 días, la proliferación de linfocitos NK fue más alta que en el caso en que los linfocitos NK se cultivaron sin estimulación adicional. Por lo tanto, se descubrió que el procedimiento de cultivo nuevo que comprende aplicar estimulación adicional con células alimentadoras y ajustar la cantidad de medio mientras se mantiene el número de células a un nivel constante es muy eficaz para la proliferación de linfocitos NK, en comparación con el procedimiento que comprende aplicar estimulación una vez en una fase inicial y proliferar linfocitos NK basándose en la cantidad de medio en lugar de en la cantidad de células.

(2) Viabilidad celular *in vitro* de los linfocitos NK

Para evaluar de forma comparativa la viabilidad celular *in vitro*, se utilizó un sistema NucleoCounter (Chemometec), un procedimiento de recuento de células que utiliza una solución de tinción IP, que tiene la capacidad de unirse a los núcleos de forma intracelular.

Se diluyeron 10 veces con PBS células cultivadas sin reestimulación y células cultivadas con reestimulación en los 7 días y a los 10 días y después se midió el recuento de células totales y el recuento de células muertas utilizando el sistema NucleoCounter. Se mezclaron 100 μ l de las células diluidas 10 veces con 100 μ l del tampón de lisis Solución A-100 (Chemometec) y se añadieron a las mismas 100 μ l de tampón de estabilización Solución B (Chemometec), tras lo cual se midió el recuento de células totales utilizando el pistón del NucleoCasette. El recuento de células muertas se midió utilizando el pistón del NucleoCasette sin tratar las células diluidas 10 veces.

El número de células viables se determinó restando el recuento medido de células muertas del recuento medido de células totales, y después se calculó la viabilidad celular utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (\text{recuento de células viables} / \text{recuento de células totales}) \times 100$$

Como resultado, como puede observarse en la FIG. 2, los linfocitos NK cultivados durante 21 días con reestimulación mediante células alimentadoras mostraron una alta velocidad de proliferación en comparación con los linfocitos NK cultivados sin reestimulación, mientras que estos linfocitos NK mostraron una alta viabilidad celular, de aproximadamente el 90 %.

(3) Citotoxicidad *in vitro*

Se recuperó una línea celular de cáncer diana (K562, etc.) y se colocaron 3×10^6 células en un tubo de 15 ml, y se centrifugó. Los sedimentos celulares se suspendieron en 600 μ l de medio RPMI y se transfirieron 400 μ l de la suspensión a un tubo 15 ml recién preparado, y se añadió Calceína-AM (Molecular probe, C34852) al mismo a una concentración de 50 nM. Después, la suspensión celular se tiñó en un incubador a 37 °C durante 20 minutos mientras se bloqueaba la luz con papel de aluminio. Mientras tanto, se añadieron 200 μ l de la suspensión restante de células a 800 μ l de medio RPMI a una concentración de 1×10^6 células/ml. La línea celular de cáncer sometida a la tinción con Calceína-AM se lavó con 15 ml de medio RPMI y se centrifugó, y los sedimentos se suspendieron en 2 ml de RPMI a una concentración de 1×10^6 células/ml.

Se colocaron 3×10^6 linfocitos NK en un tubo de 15 ml y se centrifugó, y los sedimentos se suspendieron en medio RPMI a una proporción deseada con respecto a la línea celular de cáncer diana. Se dispensaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondeado, 100 μ l de una mezcla de la línea celular de cáncer diana preparada y de la línea de linfocitos NK. Cada pocillo se preparó por duplicado. La placa se incubó a 37 °C durante 2 horas en un estado protegido de la luz, y después se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se retiró y se añadieron 100 μ l de tampón FACS (suero fetal bovino al 2,5 % en peso en PBS) a cada pocillo de la placa, para suspender las células, tras lo cual la placa se transfirió a un FACS que contenía 5 μ l de 7-AAD (BD, 559925). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos se analizó la citotoxicidad para el cáncer de los linfocitos NK como sigue:

$$\text{Citotoxicidad} = \text{valor A} - \text{valor B}$$

'Valor A' significa la proporción de células cancerosas diana destruidas cuando los linfocitos NK se incubaron con células cancerosas diana (valor promedio de células cancerosas diana muertas teñidas con Calceína-AM y teñidas con 7-AAD – control teñidas solo con Calceína-AM).

'Valor B' significa la proporción de células cancerosas diana básicamente muertas (células cancerosas diana muertas teñidas con Calceína-AM y con 7-AAD – control teñidas solo con Calceína-AM).

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 3, mientras los linfocitos NK cultivados durante 21 días con reestimulación mediante células alimentadoras mostraron una alta velocidad de proliferación en comparación con los linfocitos NK cultivados sin reestimulación, estos mostraron una alta citotoxicidad, de aproximadamente el 90 % en una proporción E: D = 3:1.

(4) Análisis del fenotipo celular *in vitro*

Los linfocitos NK se recogieron antes y después del cultivo del Ejemplo 1(1) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, y el medio se retiró mediante succión. Las células se diluyeron con 1 ml de tampón FACS (PBS que contenía SFB al 2,5 %), se recontaron y se diluyeron con tampón FACS a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se añadieron 100 μ l de la solución de células diluida a cada uno de los tubos de FACS de 5 ml (Falcon, 35202) y se añadieron a los mismos los anticuerpos mostrados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

[Tabla 1]

Anticuerpos añadidos a cada tubo	
Tubo 1	anti CD3 humano-FITC (BD Pharmingen, 555332), anti CD16 humano-PE (BD Pharmingen, 555907), anti CD56 humano-PE-Cy5 (BD Pharmingen, 555517)
Tubo 2	anti CD14 humano-FITC (BD Pharmingen, 555397), anti CD19 humano-PE (BD Pharmingen, 555413), anti CD3 humano-PE-Cy5 (BD Pharmingen, 555341)
Tubo 3	anti CD3 humano-FITC, anti NKG2A humano-PE (R&D system, FAB1059P), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 4	anti CD3 humano-FITC, anti NKG2C humano-PE (R&D system, FAB138P), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 5	anti CD3 humano-FITC, anti NKG2D humano-PE (R&D system, FAB139P), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 6	anti CD3 humano-FITC, anti NKp30 humano-PE (BD Pharmingen, 558407), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 7	anti CD3 humano-FITC, anti NKp44 humano-PE (BD Pharmingen, 558563), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 8	anti CD3 humano-FITC, anti NKp46 humano-PE (BD Pharmingen, 557991), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 9	anti CD3 humano-FITC, anti CD158a humano-PE (Beckman Coulter, A09778), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 10	anti CD3 humano-FITC, anti CD158b humano-PE (Beckman Coulter, IM2278U), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 11	anti CD3 humano-FITC, anti CD158e humano-PE (Beckman Coulter, IM3292), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 12	anti CD3 humano-FITC, anti CD25 humano-PE (BD Pharmingen, 555432), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 13	anti CD3 humano-FITC, anti CD62L humano-PE (eBioscience, 12-0629-42), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 14	anti CD57 humano-FITC (BD Pharmingen, 555619), anti CD3 humano-PE (BD Pharmingen, 555333), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 15	Control de isotipo k de IgG1 de ratones FITC (BD Pharmingen, 555748), anti CD3 humano-PE (BD Pharmingen, 555333), anti CD56 humano-PE-Cy5
Tubo 16	anti CD3 humano-FITC, control de isotipo k de IgG1 de ratones PE (BD Pharmingen, 555749), anti CD56 humano-PE-Cy5

10 Los tubos de control se prepararon como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

[Tabla 2]

Tubo de control	
Tubo C1	control de isotipo k de IgG1 de ratones FITC, control de isotipo k de IgG1 de ratón PE, control de isotipo k de IgG1 de ratones PE-Cy5 (BD Pharmingen, 555750)
Tubo C2	anti CD16 humano-FITC (BD Pharmingen, 555406), control de isotipo k de IgG1 de ratones PE, control de isotipo k de IgG1 de ratones PE-Cy5
Tubo C3	control de isotipo k de IgG1 de ratones FITC, anti CD56 humano-PE (BD Pharmingen, 555516), control de isotipo k de IgG1 de ratones PE-Cy5
Tubo C4	control de isotipo k de IgG1 de ratones FITC, control de isotipo k de IgG1 de ratones PE, anti CD56 humano-PE-Cy5

15 Los tubos mostrados en las Tablas 1 y 2 se permitieron reposar a temperatura de refrigeración para teñir las células. Las células teñidas se añadieron a 2 ml de tampón FACS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y los sedimentos se añadieron a 2 ml de tampón FACS, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en 300 μ l de tampón FACS, tras lo cual se analizó el fenotipo celular utilizando FACSCalibur (Becton Dickinson).

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 4, el fenotipo correspondiente a la identificación y pureza y el fenotipo relacionado con la activación y la inhibición de linfocitos NK no difirieron de forma significativa entre el caso en que se realizó la estimulación adicional con células alimentadoras y el caso en que no se realizó estimulación adicional.

5 Por lo tanto, aunque los linfocitos NK producidos por el procedimiento de cultivo mejorado que comprende la reestimulación con células alimentadoras muestran una alta velocidad de proliferación en comparación con los linfocitos NK cultivados por un procedimiento existente, la viabilidad celular, la citotoxicidad y el fenotipo celular de los mismos no difirieron de forma significativa de los de los linfocitos NK cultivados mediante el procedimiento existente.

10 **Ejemplo 2: Estabilidad *in vitro* (estabilidad en uso) resultante de la adición de albúmina**

Para evaluar la estabilidad de las células cultivadas en función de la concentración de albúmina en solución de Hatmann (al 2 % en peso, al 1 % en peso y al 0,5 % en peso), las células cultivadas en el Ejemplo 1(1) se conservaron a 4 °C durante 72 horas mientras se evaluaban a intervalos de 24 horas la citotoxicidad *in vitro* y la viabilidad celular *in vitro* de las mismas.

15 Los linfocitos NK finalmente cultivados se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Los sedimentos celulares se diluyeron en solución de Hatmann o en una solución de Hatmann que contenía seroalbúmina humana a concentraciones del 2 % en peso, 1 % en peso y 0,5 en peso, preparando de este modo diluciones de las células. En el presente documento, la concentración de la dilución de células final se ajustó a $1,1 \times 10^7$ células/ml, controlando la cantidad de solución de Hatmann o de la solución de Hatmann que contenía seroalbúmina humana, y después se colocaron las dispersiones celulares en bolsas de cultivo celular y se conservaron a 4 °C. Después de 24, 48 y 72 horas, las células se retiraron y se evaluaron la citotoxicidad *in vitro* (véase el Ejemplo 1(3)) y la viabilidad celular *in vitro* (véase el Ejemplo 1(2)) de las mismas.

25 Como resultado, como puede observarse en la FIG. 5(a), cuando las células se conservaron en frío en solución de Hatmann hasta 48 horas, la viabilidad celular disminuyó hasta el 65 %. Sin embargo, cuando se añadió albúmina humana a una concentración del 1 % en peso, se mantuvo aún una viabilidad celular de aproximadamente el 90 %, incluso cuando las células se conservaron en frío hasta 48 horas o se conservaron a temperatura ambiente durante 2 horas en vista del tiempo de uso.

30 La FIG. 5(b) muestra la citotoxicidad en función del tiempo de conservación. Como puede observarse en ella, cuando las células se conservaron en solución de Hatmann, la citotoxicidad comenzó a disminuir rápidamente a partir de las 24 horas y disminuyó hasta menos del 10 % a una proporción de E:D = 3:1 a las 48 horas. Sin embargo, cuando se añadió albúmina humana al 1 % en peso, los linfocitos NK mostraron una alta citotoxicidad, del 70 % o incluso más, tras la conservación en frío durante 48 horas.

35 La FIG. 6 muestra una comparación de los datos acumulados, entre la solución de Hatmann y la solución de Hatmann con albúmina humana al 1 % en peso. Como se muestra en la FIG. 6(a), cuando se añadió albúmina al 1 % en peso se mantuvo una alta viabilidad celular, del 80 % o más, hasta 72 horas. Sin embargo, en solución de Hatmann la viabilidad celular disminuyó rápidamente, hasta el 60 % a las 48 horas. La FIG. 6(b) muestra una comparación de la citotoxicidad en la proporción E:D = 3:1. Como puede observarse en ella, cuando se añadió albúmina al 1 % en peso, se mantuvo una citotoxicidad del 70 % o más hasta 72 horas, mientras que en solución de Hatmann la citotoxicidad disminuyó al 50 % a las 48 horas. La FIG. 6(c) muestra los resultados de observar la diferencia en el fenotipo de los linfocitos NK entre las dos condiciones anteriores. Como puede observarse en ella, NKp46, que está relacionado en forma directa con la citotoxicidad, se expresó de forma alta en la condición en que se añadió albúmina al 1 % en peso, y otros fenotipos no difirieron de forma significativa entre las dos condiciones.

40 Por lo tanto, puede observarse que la adición de albúmina humana al 1 % en peso al agente terapéutico de linfocitos NK final contribuye enormemente a asegurar la estabilidad de los linfocitos NK, manteniendo la viabilidad celular y la citotoxicidad de los linfocitos NK con el paso del tiempo.

45 **Ejemplo 3: Pruebas de congelación y descongelación de linfocitos NK: número de células, rendimiento, fenotipo, viabilidad y citotoxicidad.**

Se examinó la estabilidad a la congelación de los linfocitos NK cultivados en el Ejemplo 1(1).

50 Para congelar los linfocitos NK cultivados, se ajustó el número de células a $2-8 \times 10^7$ células/ml y las células a congelar se transfirieron a tubos distintos, y después se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La congelación en una bolsa de congelación (MEDIRUTION, Corea) fue a base de 20 ml. Las células centrifugadas se resuspendieron bien con 14 ml de suero humano AB. Se mezclaron 4 ml de dextrano 40 y 2 ml de DMSO entre sí y se enfrió, y la solución mezclada se añadió gota a gota con agitación en la suspensión celular preparada. Las células se inyectaron en la bolsa de congelación y se retiraron las burbujas de la bolsa. La bolsa de congelación se congeló con un congelador de velocidad controlada (congelador CryoMed, Thermo Scientific) y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, la bolsa de descongelación se retiró del tanque de nitrógeno, se colocó en una bolsa con cremallera y se descongeló rápidamente en un incubador a 37 °C. Tras haber descongelado completamente las células, las células se transfirieron a los correspondientes tubos y se suspendieron lentamente con una cantidad de 10 veces de una solución de PBS que contenía SFB al 1 % en peso. La suspensión celular se mezcló bien y se centrifugó (1.200 rpm, 10 min, 4 °C). Tras la centrifugación las células se resuspendieron con PBS que contenía SFB al 1 % en peso a una concentración de 10^7 células/ml. Tras una dilución de 10 veces se midieron el número y la viabilidad celulares. A base del número celular medido se evaluó la citotoxicidad frente a la línea celular K562 a una proporción E:D = 3:1. El fenotipo celular se midió para CD16, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD25, CD62L, CD57 y similares. Para finalizar, se evaluaron los cambios en el rendimiento celular, viabilidad, citotoxicidad y fenotipo celular entre antes y después de la congelación.

Como resultado, cuando los linfocitos NK cultivados se descongelaron tras la congelación, mantuvieron una alta viabilidad (véase la FIG. 7(a)) y recuperación (véase la FIG. 7(b)) celulares, tenían una alta citotoxicidad frente a la línea celular de cáncer K562 sin necesitar una inducción especial de la actividad (véase la FIG. 7(c)) y también mantuvieron los fenotipos celulares (véase la FIG. 7(d)).

15 **Ejemplo 4: Evaluación del efecto antineoplásico de los linfocitos citolíticos naturales en un modelo animal de linfoma**

(1) Construcción del modelo animal de linfoma

1) Cultivo de líneas celulares Raji y SU-DHL-4

Las líneas celulares Raji (línea celular de linfoma de linfocitos B humano, ATCC, CCL-86) y SU-DHL-4 (línea celular de linfoma de linfocitos B humano, DSMZ, ACC 495) se cultivaron en un incubador de CO₂ al 5 % a 37 °C utilizando medio RIMI (L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, SFB al 10 % en peso, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml).

2) Construcción de un modelo animal

Se aclimataron durante 7 días ratones C.B.-17 hembra de 6-8 semanas y después se inyectaron cada una de las líneas celulares Raji y SU-DHL-4 en la vena caudal de los ratones mediante una jeringa de 1 ml a una concentración de 1×10^5 células/100 µl.

(2) Administración de linfocitos citolíticos naturales y evaluación del efecto antineoplásico

1) Administración de linfocitos citolíticos naturales

Tras el xenoinjerto de los cánceres, los ratones se agruparon aleatoriamente y se rotularon. Se inyectaron 400 µl de PBS en la vena caudal de los ratones del grupo de control. En el grupo de control los linfocitos citolíticos naturales se administraron 5 veces en la vena caudal de los ratones a una concentración de 1×10^7 células/400 µl a intervalos de 2-3 días desde el día 0.

2) Evaluación del efecto antineoplásico

Tras el experimento, se examinaron de forma diaria el estado general, la movilidad y la parálisis de las extremidades posteriores de los ratones. Cuando se administra a los ratones Raji y SU-DHL-4 por vía intravenosa, que son modelos de linfoma bien conocidos, se crean tumores alrededor de la médula espinal y, así, los ratones muestran síntomas de parálisis de las extremidades posteriores que los conduce a la muerte tras 2-3 días. Por lo tanto, se evaluó el desarrollo de parálisis de las extremidades posteriores junto con la tasa de supervivencia y se utilizó como un índice del efecto antineoplásico.

Como resultado, en el grupo de control al que se administró PBS los valores medios de parálisis de extremidades posteriores (véase la FIG. 8(a)) y la tasa de supervivencia (véase la FIG. 8(b)) fueron de 37 días y 39 días, mientras que en el grupo al que se administró linfocitos NK, la parálisis de las extremidades posteriores se alivió claramente, de forma que no se determinaron valores medios, y la tasa de supervivencia aumentó enormemente.

45 **Ejemplo 5: Evaluación del efecto antineoplásico de los linfocitos citolíticos naturales en un modelo animal de cáncer de cerebro (glioblastoma)**

(1) Construcción de un modelo animal de cáncer de cerebro

Se inyectó U-87 MG (línea celular de glioblastoma humano, ATCC HTB-14) en el cerebro de ratones BALB/C-nu/nu de 6 semanas, utilizando un inyector de múltiples jeringas con siete agujas a una concentración de 2×10^5 células/5 µl. Las células se inyectaron utilizando una jeringa Hamilton y la aguja de la jeringa se retiró durante 5 minutos tras 5 minutos de reposo. Después se realizó la desinfección y la sutura. Durante el periodo de prueba se observaron el estado y el peso de los ratones. Los ratones se sacrificaron de acuerdo con el programa de la prueba y se analizó el tejido.

(2) Administración de linfocitos citolíticos naturales

Para examinar el efecto antineoplásico de los linfocitos NK en el modelo animal de cáncer de cerebro, se inyectaron linfocitos NK tres veces a intervalos de una semana a partir de 1 semana tras la administración de U-87MG. Los linfocitos NK se inyectaron por vía intracraneal y por vía intravenosa. En el caso de la inyección intracraneal, se administraron 1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5 linfocitos NK, y en el caso de la inyección intravenosa se administraron 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 linfocitos NK. 4 semanas tras la administración de U-87MG los ratones se sacrificaron y se calculó el efecto antineoplásico de los linfocitos NK.

Para examinar los efectos antineoplásicos resultantes de la administración combinada de linfocitos NK y un agente antineoplásico, y el punto de tiempo de administración, se inyectaron por vía intravenosa 1×10^7 linfocitos NK en diversos puntos de tiempo, como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Se inyectó por vía intraperitoneal temozolomida (TMZ) como agente antineoplásico, a una dosis de 2,5 mg/kg una vez al día durante 5 días consecutivos a partir de las 3 semanas tras la administración de U-87MG. A las 4 semanas tras la administración de U-87MG, los ratones se sacrificaron y se midió el volumen tumoral.

Tabla 3

15 [Tabla 3]

Combinación de NK y agente antineoplásico, y procedimiento de administración en cada grupo		
Grupo		Descripción
1	Control	Trasplantados solo con cánceres; sin tratamiento adicional
2	Linfocitos NK	Administración de linfocitos NK tres veces a intervalos de una semana a partir de 1 semana tras la administración de cánceres
3	TMZ	Administración de TMZ una vez al día durante 5 días consecutivos a partir de 3 semanas tras la administración de cánceres
4	Linfocitos NK /TMZ	Administración de linfocitos NK tres veces al día a intervalos de una semana a partir de 1 semana tras la administración de cánceres. Administración de TMZ una vez al día durante 5 días consecutivos a partir de 3 semanas tras la administración de cánceres
5	Linfocitos NK (3 sem.)	Administración de linfocitos NK tres veces a intervalos de 2 días a partir de 3 semanas tras la administración de cánceres
6	Linfocitos NK (3 sem.)/TMZ	Administración de linfocitos NK tres veces a intervalos de 2 días a partir de 3 semanas tras la administración de cánceres. Administración de TMZ una vez al día durante 5 días consecutivos a partir de 3 semanas tras la administración de cánceres
7	Linfocitos NK (1 sem.)	Administración de linfocitos NK tres veces al cabo de 1 semana tras la administración de los cánceres

(3) Evaluación del efecto antineoplásico

Para medir el volumen de los tumores se utilizó tinción con hematoxilina-eosina. Se extrajo el cerebro de los ratones y se cortó a intervalos de 2 mm. Los cortes se fijaron en solución de formalina tamponada al 10 % a 4 °C durante 24 horas y se incluyeron en bloques de parafina. Los tejidos incluidos en parafina se cortaron a 4 μ m, se montaron sobre portaobjetos de vidrio recubiertos y se secaron durante una noche. El tejido se desparafinizó con xileno y se rehidrató a través de una serie graduada de alcohol (etanol/agua destilada al 100 % en volumen, 95 % en volumen y 80 % en volumen). Después, se sometió al tejido a tinción con hematoxilina-eosina de Gill y se examinó el grado de tinción, seguido de deshidratación y montaje. Se midieron la longitud y la anchura del tumor en el tejido teñido y el volumen tumoral se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \text{longitud tumoral (mm)} \times \text{anchura tumoral (mm)}^2 \times 0,5$$

Puede observarse que, cuando se administraron por vía intraperitoneal 1×10^4 y 1×10^5 linfocitos NK (véase la FIG. 9) y se administraron por vía intracraneal 1×10^6 y 1×10^7 linfocitos NK (véase la FIG. 10), el volumen tumoral se redujo en comparación con el control. Cuando se observaron los efectos resultantes de la administración combinada de los linfocitos NK y el agente antineoplásico, y el punto de tiempo de la administración (véase la FIG. 11), pudo observarse que el volumen tumoral era más pequeño cuando se administraron TMZ y linfocitos NK en combinación que cuando se administraron solos. Además, cuando se inyectaron linfocitos NK tres veces dentro de 1 semana tras la administración del cáncer, el volumen tumoral se redujo muy significativamente, lo que sugiere que se demostró el mejor efecto.

Para analizar el grado de muerte celular, se realizó un TUNEL (sigla del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, ensayo de marcado del extremo libre por dUTP mediado por transferasa terminal). En concreto, se montó tejido incluido en parafina (4 mm) en un cubreobjetos de vidrio recubierto y se secó durante una noche. El tejido se desparafinizó con xileno y se rehidrató a través de una serie graduada de alcohol (etanol/agua destilada al 100 % en volumen, 95 % en volumen y 80 % en volumen, seguido de lavado con PBS (pH 7,5)). El grado de muerte celular en el tejido se examinó utilizando un kit de TUNEL (Invitrogen). El portaobjetos teñido se contratiñó con hematoxilina de Gill durante 1 minuto y se montó. El portaobjetos teñido se fotografió con un

microscopio a un aumento de 400x con respecto al borde del cáncer para obtener 10 fotografías y las células se recontaron con respecto a las células que mostraban una respuesta positiva, y se promediaron las mediciones.

Como resultado, puede observarse que cuando se administraron por vía intracraneal 1×10^4 y 1×10^5 linfocitos NK el número de células muertas fue grande, lo que sugiere que la administración de linfocitos NK fue eficaz (véase la FIG. 9c).

Ejemplo 6: Evaluación del efecto antineoplásico de linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de ovario

(1) Construcción de un modelo animal de cáncer de ovario

1) Construcción de la línea celular OVCAR-3-Luc

Se clonó el gen de la luciferasa en el vector pGL3 y se transfectó de forma transitoria en la línea celular OVCAR-3. Las líneas celulares que mostraron la expresión de luciferasa se seleccionaron en primer lugar utilizando luciferina y en segundo lugar se seleccionaron las líneas celulares que tenían los fenotipos y citotoxicidades de NK similares a las de OVCAR-3.

2) Cultivo de la línea celular OVCAR-3-Luc

La línea celular OVCAR-3-Luc (línea celular de cáncer de ovario humano, KTCC (banco de líneas celulares coreano) 30162) se incubó a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 % utilizando medio RIMI (L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, SFB al 10 %, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, G418 100 µg/ml).

3) Construcción de un modelo animal

Se aclimataron durante 7 días ratones C.B-17 IDCG hembra de 6-8 semanas y se inyectó en los ratones la línea celular OVCAR-3-Luc por vía intraperitoneal, a una concentración de 5×10^6 células/100 µl.

(2) Administración de linfocitos NK y evaluación del efecto antineoplásico

1) Administración de linfocitos NK

Tras el xenotrasplante de los cánceres, se agruparon los ratones aleatoriamente y se rotularon. Al grupo de control se le inyectaron por vía intraperitoneal 200 µl de solución de Hatmann (Choongwae Pharmaceutical Corp., Corea). Al grupo tratado con linfocitos NK se le inyectaron cinco veces 1×10^7 linfocitos NK/200 µl por vía intraperitoneal, a intervalos de 2-3 días a partir de 1 semana tras el xenoinjerto de los cánceres.

2) Evaluación del efecto antineoplásico

Tras el xenoinjerto de OVCAR-3-Luc, se observaron a diario el estado general y la movilidad de los ratones. Se administró luciferina a los ratones por vía intraperitoneal y se fotografiaron imágenes de la luciferasa utilizando un sistema de formación de imágenes IVIS (Xenogen) a intervalos de 7 días. Ocho semanas tras el xenoinjerto del cáncer, los abdómenes de los ratones de todos los grupos se abrieron y se midieron los volúmenes de los tumores.

Inmediatamente después del xenoinjerto de las células cancerosas, las células cancerosas se propagaron a través de toda la cavidad abdominal y la imagen de la luciferasa parecía ser grande. Sin embargo, tras 7 días, el injerto de células cancerosas se había incorporado y, por lo tanto, el nivel de luciferasa disminuyó. Tras 7 días, en el grupo al que se habían administrado los linfocitos NK el nivel de luciferasa disminuyó de forma continua hasta los 23 días, mientras que en grupo de control negativo el nivel de luciferasa aumentó. (Véase la FIG. 12 (a)).

A las 8 semanas se sacrificaron los ratones, se extrajo el tumor y se midieron el volumen y el peso del tumor (véase la FIG. 12(b)). Se observó que el peso del tumor en el grupo al que se administró linfocitos NK disminuyó en el 54,91 % en comparación con el del grupo de control. En otras palabras, el volumen tumoral en el grupo al que se administró linfocitos NK disminuyó significativamente en comparación con el del grupo de control negativo. Esto sugiere que cuando se administran linfocitos NK por vía intraperitoneal en un modelo que tiene cáncer de ovario metastatizado en la cavidad abdominal, estos inhiben el crecimiento del tumor.

Ejemplo 7: Evaluación del efecto antineoplásico de linfocitos NK en un modelo animal de cáncer de hígado humano

(1) Construcción de un modelo animal de cáncer de hígado

Para evaluar el efecto antineoplásico de los linfocitos NK sobre el cáncer de hígado, se construyó un modelo de ratón de xenoinjerto de tumor humano y se administraron linfocitos NK por vía intravenosa. Para esto se implantaron por vía subcutánea 6×10^6 células de células SNU-354, una línea celular de cáncer de hígado humano, en el costado de un ratón atímico.

(2) Administración de linfocitos NK y evaluación del efecto antineoplásico

1) Administración de linfocitos NK

Dos horas tras el xenoinjerto de las células SNU-354, se administraron a través de la vena caudal del ratón 1×10^6 células o 1×10^7 células de linfocitos NK en 200 μ l. Tras la primera administración se inyectó 3 veces más la misma dosis de linfocitos NK a un intervalo de una semana.

5

Tabla 4

[Tabla 4]

Procedimientos de administración de linfocitos NK de acuerdo al grupo				
grupo	vía de administración	dosis	número de ratones	observación
1	i.v.	Vehículo (de forma semanal)	10	control
2	i.v.	Linfocitos NK (1×10^6 células/ratón, de forma semanal)	10	grupo de dosis baja
3	i.v.	Linfocitos NK (1×10^7 células/ratón, de forma semanal)	10	grupo de dosis alta

2) Evaluación del efecto antineoplásico

10 Para evaluar la citotoxicidad de los linfocitos NK durante el experimento se observó diariamente el estado general y el peso y el volumen tumoral de los animales se midieron 11 veces (día 0, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 26 y 28) hasta el final de los experimentos. Después de 28 días, los animales se sacrificaron y se midieron los pesos de los tumores extraídos.

15 Se observó que el volumen tumoral del grupo al que se administraron linfocitos NK disminuyó en el 37,7 % (1×10^6 células/ratón) y el 50,6 % (1×10^7 células/ratón), en comparación con el grupo de control negativo (Fig. 13).

Además, el peso tumoral del grupo al que se administraron linfocitos NK disminuyó en el 36,0 % (1×10^6 células/ratón) y el 50,2 % (1×10^7 células/ratón), en comparación con el del grupo de control negativo (Fig. 13).

Por lo tanto, puede concluirse que los linfocitos NK pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer de hígado.

Ejemplo 8: Evaluación del efecto antineoplásico de los linfocitos NK en un modelo animal de neuroblastoma

20 (1) Construcción de un modelo animal de neuroblastoma

1) Cultivo de la línea celular NB-1691luc

La línea celular NB-1691luc, preparada por transfección con el gen de la luciferasa en NB-1691 (línea celular de neuroblastoma humano, procedente del St. Jude Children's Research Hospital) se incubó a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 % utilizando medio RIMI (L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, SFB al 10 %, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml, G418 100 μ g/ml).

25

3) Construcción de un modelo animal

Se aclimataron durante 7 días ratones C.B-17 IDCG hembra de 7 semanas y se inyectó la línea celular NB-1691luc a una concentración de 5×10^5 células/100 μ l en la vena caudal de los ratones.

(2) Administración de linfocitos NK y evaluación del efecto antineoplásico

30 1) Administración de linfocitos NK

Tras el xenoinjerto de los cánceres, los ratones se agruparon aleatoriamente y se rotularon. Al grupo de control se le inyectaron 200 μ l de solución de Hatmann (Choongwae Pharmaceutical Corp., Corea) en la vena caudal. Al grupo tratado con linfocitos NK se le inyectó cinco veces 1×10^7 linfocitos NK/200 μ l a intervalos de 2-3 días a partir de 1 semana tras el xenoinjerto de cánceres en la vena caudal.

35 2) Evaluación del efecto antineoplásico

Tras el xenoinjerto de NB-1691luc, se observaron diariamente el estado general y la movilidad de los ratones. Para seguir el crecimiento tumoral se administró a los ratones luciferina por vía intraperitoneal y se fotografiaron imágenes de luciferasa utilizando un sistema de formación de imágenes IVIS (Xenogen) a intervalos de 7 días.

40 Durante el experimento se llevó a cabo una investigación para comprobar cinco veces por semana la muerte de los animales. En consecuencia, los días de supervivencia para el grupo de control y el grupo al que se administró

linfocitos NK fueron de 49 y 51 días, respectivamente. Sin embargo, la supervivencia del grupo al que se administró linfocitos NK aumentó significativamente por la prueba del orden logarítmico (Fig. 14).

Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia *in vitro* de linfocitos NK sobre diversas líneas celulares de cáncer y líneas celulares infectadas con virus

5 Utilizando linfocitos NK preparados como se describe en el Ejemplo 1, se evaluó la citotoxicidad de los linfocitos NK como se describe en el Ejemplo 1(3).

La capacidad de los linfocitos NK para la secreción de citocinas se midió como sigue;

Preparar linfocitos NK (5×10^6 células/ml) y las líneas celulares de cáncer diana (5×10^6 células/ml), y añadir los linfocitos NK preparados y las líneas celulares de cáncer diana en una placa de 96 pocillos de fondo redondeado. Para evitar la secreción de citocinas acumuladas en la célula, se añadió de forma simultánea GolgiStop (BD Pharmingen, 554724).

Pocillo 1: linfocitos NK suspendidos 100 μ l, medio RPMI 100 μ l, anti CD107a humano-APC (BD Pharmingen, 560664) 1 μ l

Pocillo 2: linfocitos NK suspendidos 100 μ l, línea celular de cáncer diana suspendida 100 μ l, anti CD107a humano-APC (BD Pharmingen, 560664) 1 μ l

Pocillo 3: linfocitos NK suspendidos 100 μ l, línea celular de cáncer diana suspendida 100 μ l, control de isotipo k de IgG 1 de ratón APC (BD Pharmingen, 555751) 5 μ l

La placa de 96 pocillos se envolvió en papel de aluminio y después se conservó en un incubador a 37 °C durante 4 horas. Después de 4 horas se retiró el sobrenadante de la placa de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de tampón FACS, 5 μ l de 7-AAD (BD, 559925), anti CD3 humano-PerCP-Cy5.5 (eBioscience, 45-0036-42) 1 μ l y anti CD56 humano-APC-eFluor780 (eBioscience, 47-0567-42) 1 μ l.

Se tiñó la placa de 96 pocillos conservando durante 30 minutos a 4 °C y después se añadieron 200 μ l de tampón FACS, y se centrifugó (2.000 rpm) durante 3 minutos (2 veces).

Se retiró el sobrenadante de la placa de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 200 μ l de Cytotfix/Cytoperm (BD, 51-2090KZ). Se mezcló bien la mezcla en cada pocillo mediante pipeteo y después se conservó a 4 °C (durante 30 minutos para fijar).

Tras la fijación se añadieron a cada pocillo 200 μ l de tampón Perm/Wash (BD, 51-2090KZ) que se diluyó 10 veces con agua destilada y se centrifugó la placa de 96 pocillos (2.000 rpm) durante 3 minutos (2 veces).

Tras retirar el sobrenadante se añadió un conjunto de anticuerpos como se expone a continuación.

Pocillo 1 y 2: Perm/Wash diluido 100 μ l, anti IFN-g humano-FITC (BD, 554700) 1 μ l, anti TNF- α humano-PE-Cy7 (eBioscience, 25-7349-82) 1 μ l

Pocillo 3: Perm/Wash diluido 100 μ l, control de isotipo k de IgG 1 de ratón FITC (BD, 555748) 5 μ l, control de isotipo k de IgG de ratón PE-Cy7 (BD, 557872) 5 μ l

Se tiñeron las citocinas conservando la placa de 96 pocillos durante 30 minutos a 4 °C. Tras la tinción, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de tampón Perm/Wash (BD, 51-2090KZ) que se diluyó 10 veces con agua destilada y la placa de 96 pocillos se centrifugó (2.000 rpm) durante 3 minutos (2 veces).

Para finalizar, se resuspendió cada pocillo añadiendo 200 μ l de tampón Perm/Wash diluido (BD, 51-2090KZ), se evaluó la capacidad de secreción de citocinas por FACS-Fortessa(BD).

La FIG. 15 muestra la eficacia *in vitro* (citotoxicidad y capacidad de la secreción de citocinas) de los linfocitos NK en siguiente diversas líneas celulares de cáncer y líneas celulares infectadas con virus;

- (a) Líneas celulares K562 (leucemia)
- (b) Líneas celulares Raji (linfoma)
- (c) Líneas celulares SK-N-SH (neuroblastoma)
- (d) Líneas celulares SNUOT-Rb1 (retinoblastoma)
- (e) Línea celular U87-MG (glioblastoma)
- (f) Líneas celulares OVCAR-3 (cáncer de ovario)
- (g) Líneas celulares Huh-7 (carcinoma hepatocelular, CHC)
- (h) Líneas celulares SNU398 (CHC infectado con VHB)
- (i) Líneas celulares Huh-7.5 (CHC infectado con VHC)

Los linfocitos NK mostraron una excelente citotoxicidad celular para la mayoría de las líneas celulares de cáncer. Además, los linfocitos NK mostraron buena citotoxicidad para líneas celulares infectadas con virus.

La capacidad de secreción de citocinas de los linfocitos NK se observó en alguna línea celular, en especial, los linfocitos NK mostraron una fuerte capacidad de secreción de citocinas frente a las líneas celulares K562 y las líneas celulares de cáncer infectadas con virus (líneas celulares de CHC infectadas con VHB y VHC).

5 En conclusión, se confirma que los linfocitos NK producidos de acuerdo con la presente invención tienen una excelente eficacia (citotoxicidad y capacidad de secreción de citocinas) frente a diversas líneas celulares de cáncer y líneas celulares infectadas con virus.

Aplicabilidad industrial

10 Como se describe anteriormente, cuando se utiliza la tecnología de cultivo de linfocitos NK, es decir, cuando los linfocitos NK se producen realizando un cultivo estacionario en un medio que contiene anticuerpo anti-CD3 y citocinas, mientras se realiza la estimulación repetida con células alimentadoras, seguido de cultivo en suspensión, pueden producirse de forma eficaz linfocitos NK que tienen alta pureza, alta citotoxicidad y alta viabilidad celular mediante un procedimiento adecuado desde el punto de vista clínico, en comparación con un procedimiento convencional. Los linfocitos NK producidos mediante el procedimiento de la presente invención tienen excelente estabilidad de almacenamiento prolongado, debido a que la viabilidad celular y la citotoxicidad de los mismos pueden mantenerse de forma estable durante de un periodo largo de tiempo.

15 En particular, cuando se añade albúmina a una composición que contiene los linfocitos NK producidos mediante el procedimiento de la presente invención, la citotoxicidad y la viabilidad celulares pueden aumentarse enormemente. Además, debido a las características del procedimiento de producción de la presente invención, la citotoxicidad (es decir, el efecto terapéutico) y la viabilidad celular de los linfocitos NK pueden mantenerse incluso cuando se descongelan tras la congelación. Por lo tanto, los linfocitos NK pueden almacenarse fácilmente y suministrarse en un estado líquido o congelado, sin necesidad de un procedimiento de tratamiento adicional.

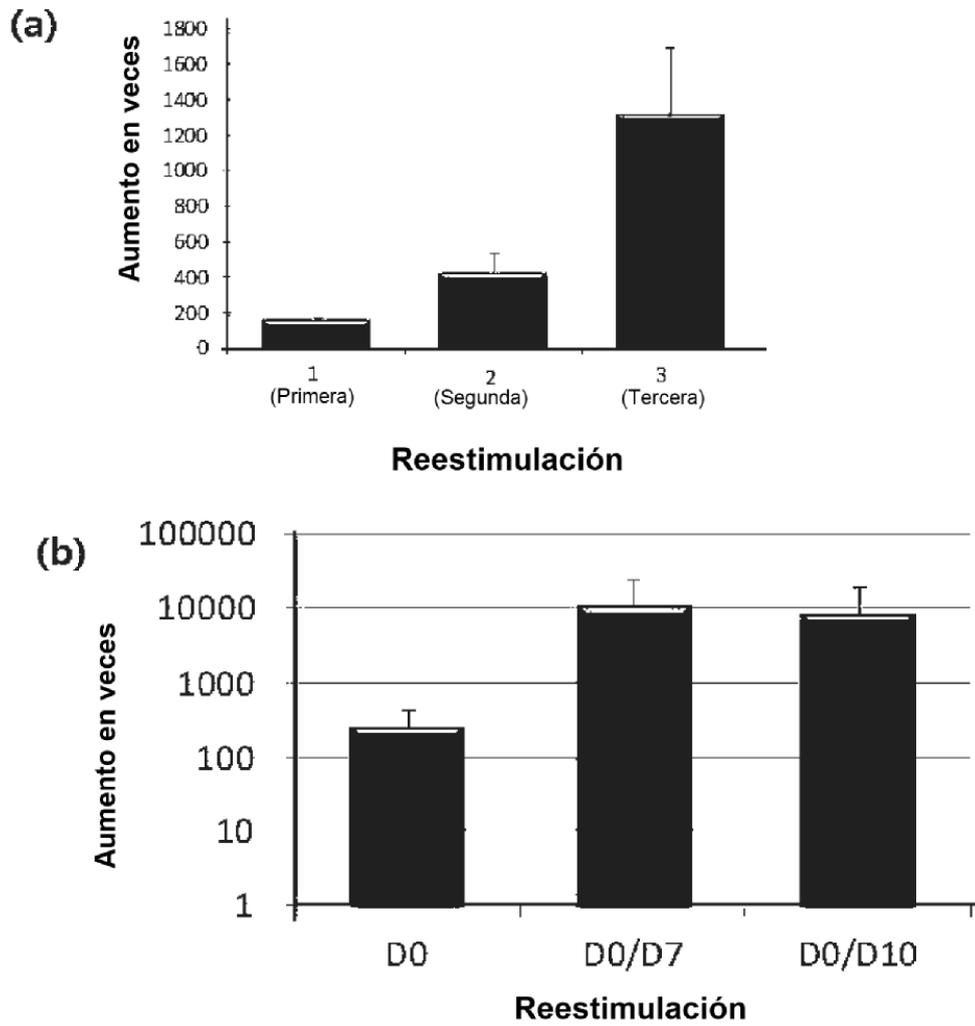
20 Los linfocitos NK producidos mediante la presente invención pueden presentar de forma estable su efecto *in vivo* y, por lo tanto, puede utilizarse de forma eficaz para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas una composición que contenga los mismos como principio activo.

25

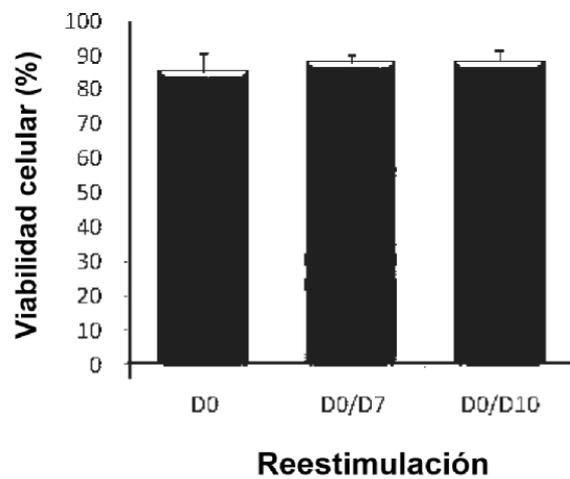
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de linfocitos NK *in vitro*, que comprende las etapas de:
 - (i) aislar leucocitos de sangre periférica y linfocitos NK de sangre periférica humana;
 - 5 (ii) estimular linfocitos NK llevando a cabo un cultivo estacionario durante 2-15 días en un medio que contiene anticuerpo anti CD3, citocina y células alimentadoras, para provocar el contacto célula-célula;
 - (iii) después de la finalización del cultivo estacionario de la etapa (ii), reestimar las células mediante la adición de citocina, anticuerpo anti CD3 y células alimentadoras, y llevar a cabo un cultivo estacionario para provocar el contacto célula-célula;
 - 10 (iv) después de la finalización del cultivo estacionario, añadir a las células un medio que contenga una citocina necesaria para el cultivo estacionario o en suspensión, y llevar a cabo un cultivo estacionario o en suspensión mientras se mantienen la concentración celular y la concentración de citocina a niveles constantes.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (iii) de reestimulación de las células y de llevar a cabo el cultivo estacionario se repite dos o más veces.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo estacionario de la etapa (iii) se realiza durante 2-7 días.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo en suspensión de la etapa (iv) se realiza utilizando un reactor seleccionado del grupo que consiste en un matraz de agitación, un incubador agitador, un fermentador, un matraz T y una bolsa de cultivo celular desechable.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo estacionario de la etapa (ii) o (iii), y el cultivo estacionario o en suspensión de la etapa (iv) se realizan en el mismo reactor o en uno distinto.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las concentraciones de células y de citocina en el medio se miden durante el cultivo estacionario o en suspensión de la etapa (iv), y el medio que contiene citocina se añade para mantener la concentración celular y de citocina a niveles constantes.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti CD3 es uno o más seleccionado del grupo que consiste en OKT3, UCHT1 y HIT3a.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la citocina es una o más seleccionada del grupo que consiste en interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18) e interleucina 21 (IL-21).
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica inactivadas.

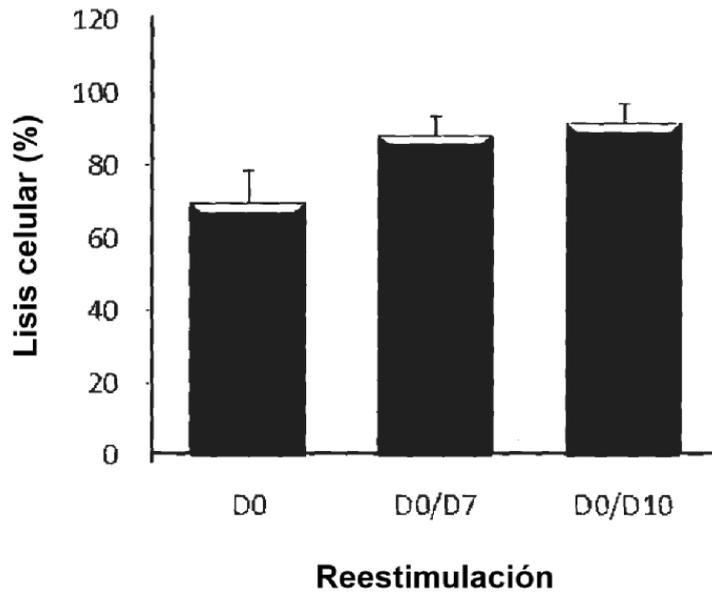
[Fig. 1]



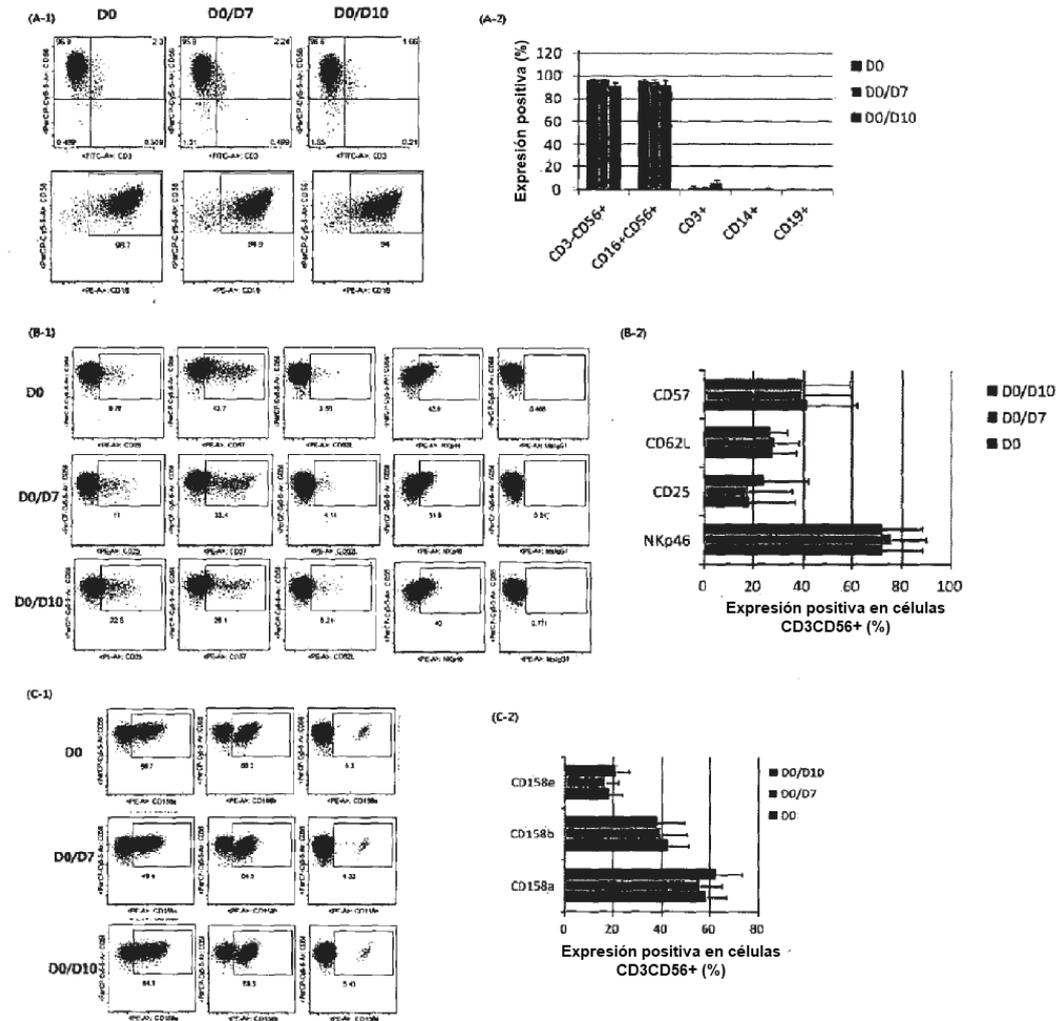
[Fig. 2]



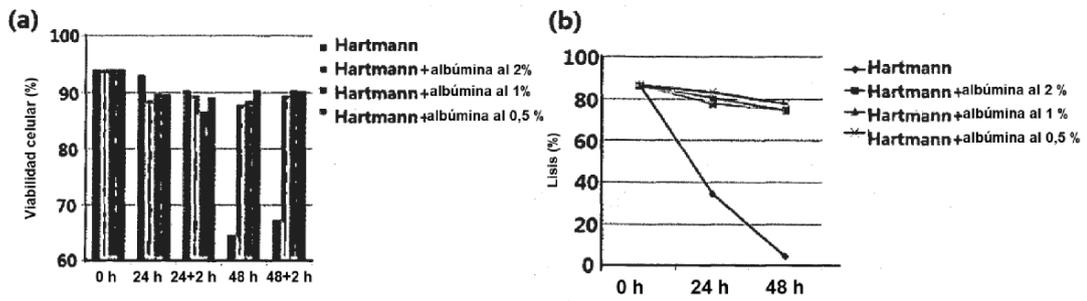
[Fig. 3]



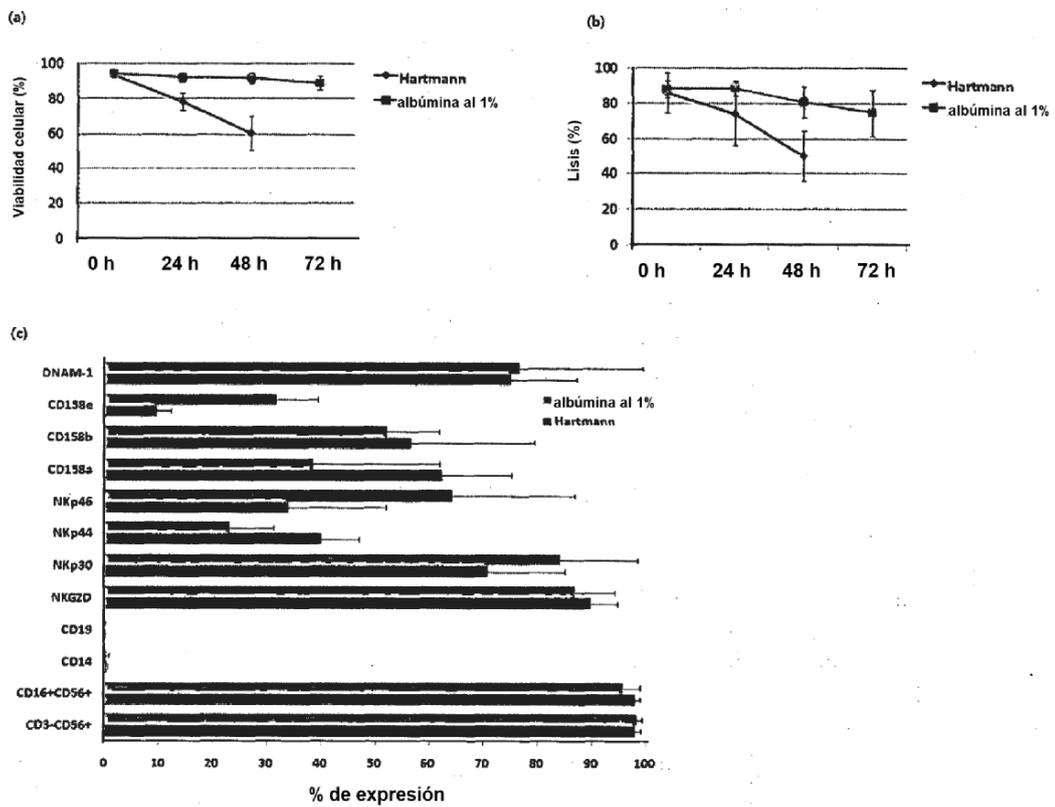
[Fig. 4]



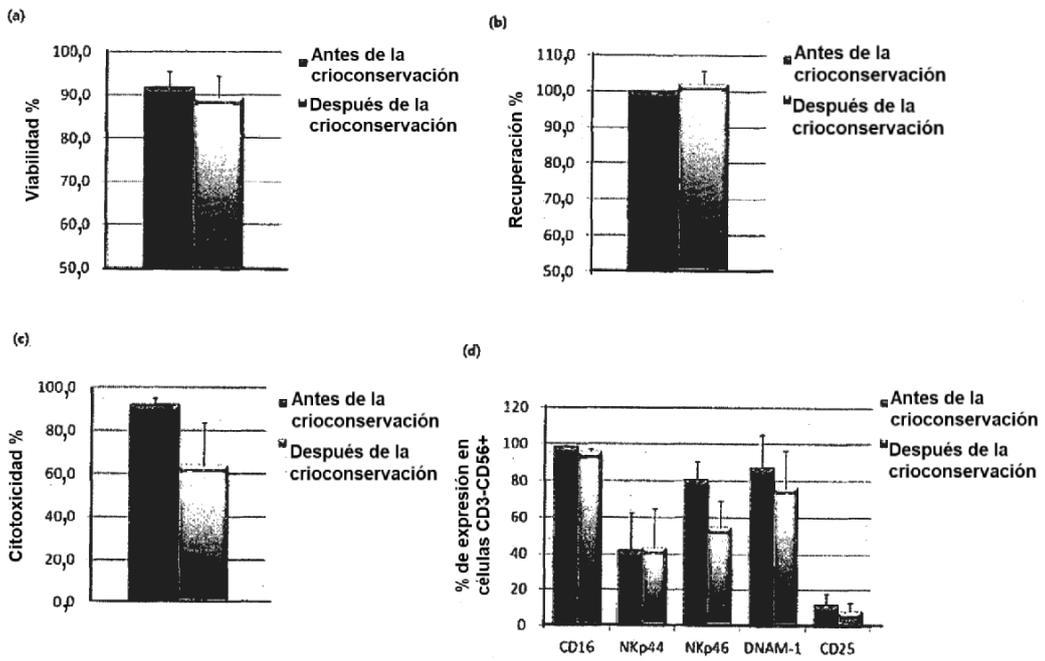
[Fig. 5]



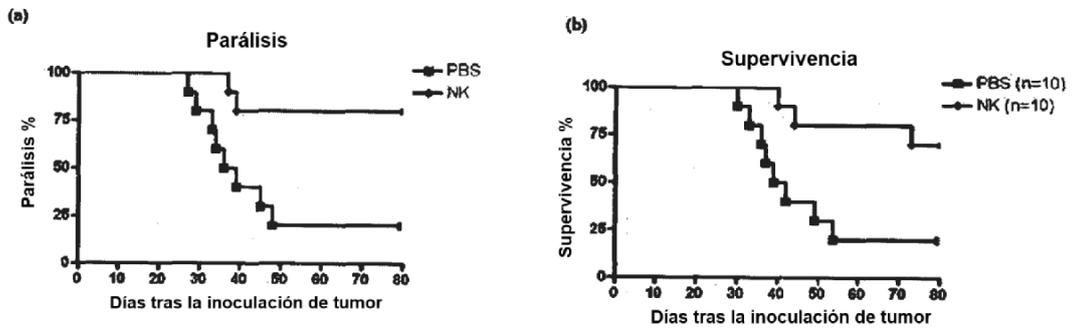
[Fig. 6]



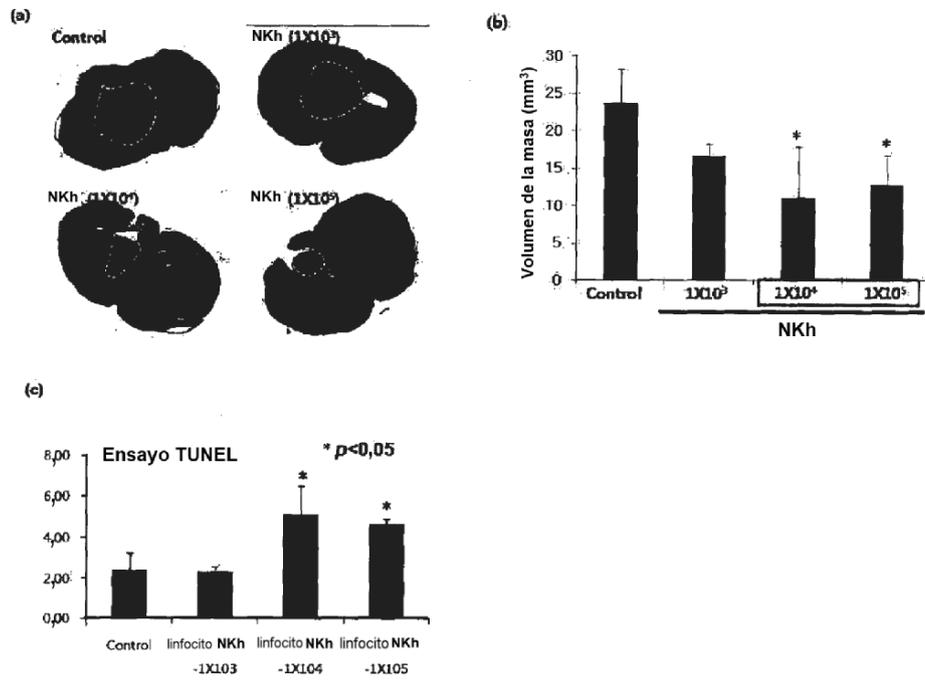
[Fig. 7]



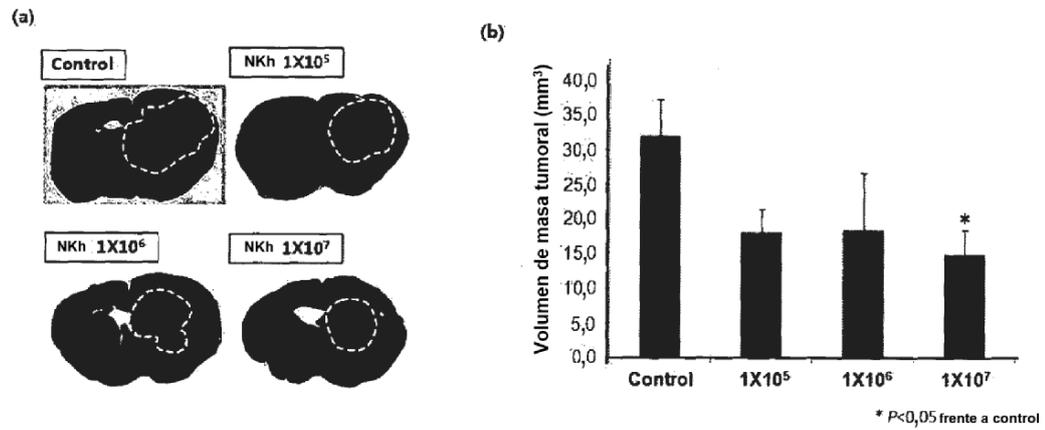
[Fig. 8]



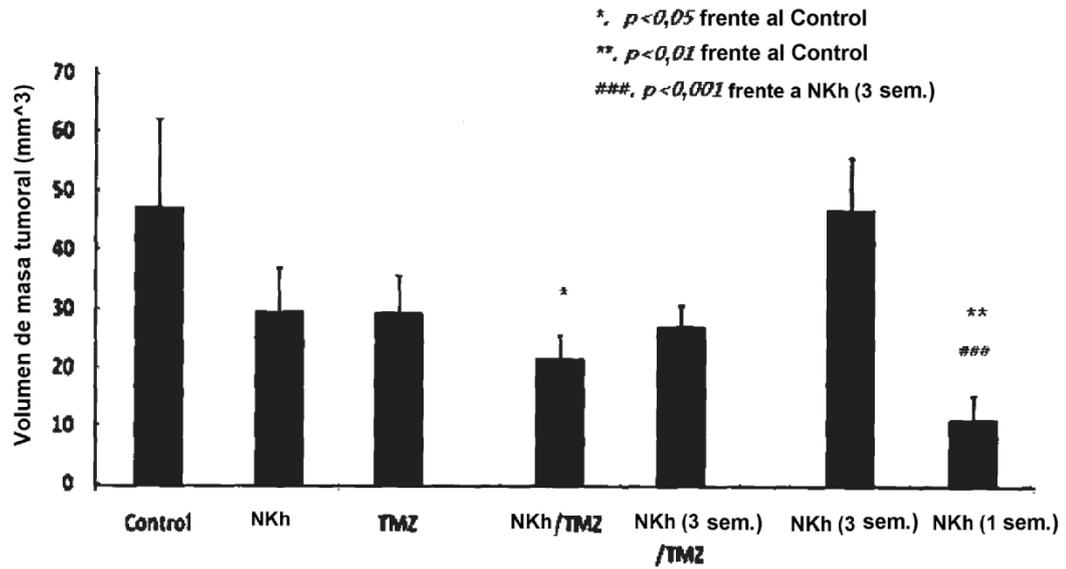
[Fig. 9]



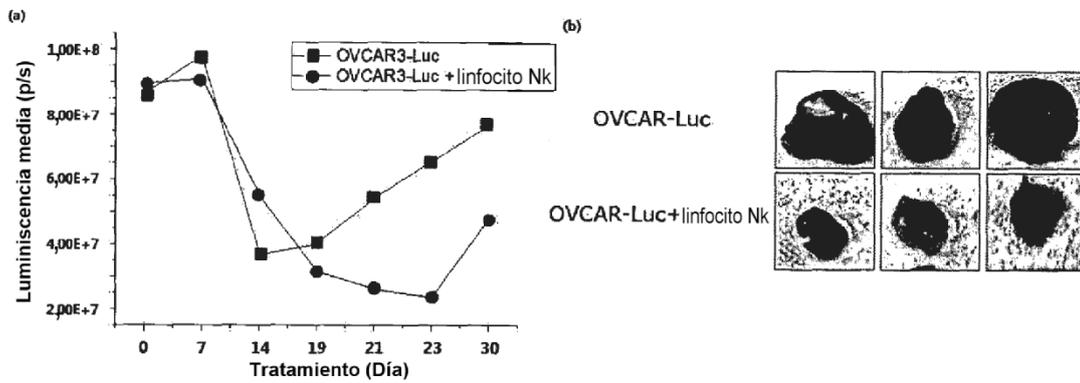
[Fig. 10]



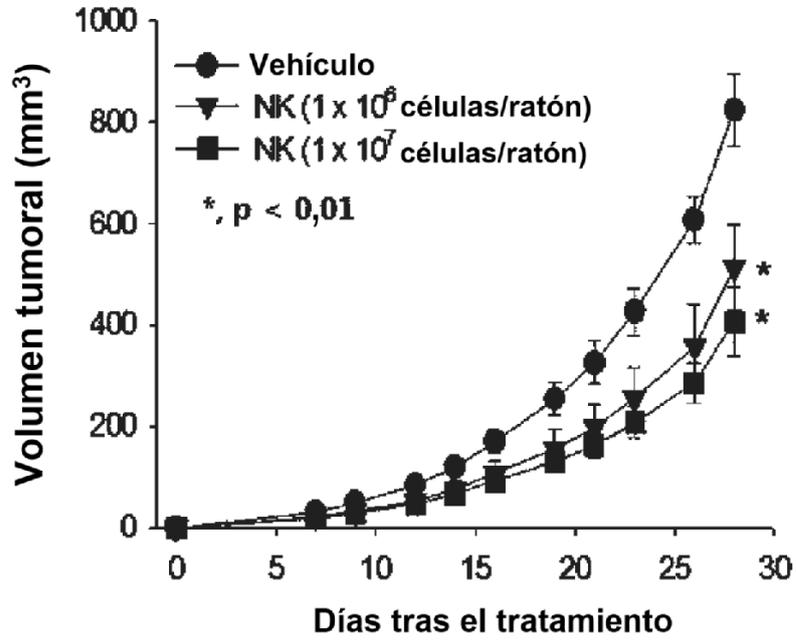
[Fig. 11]



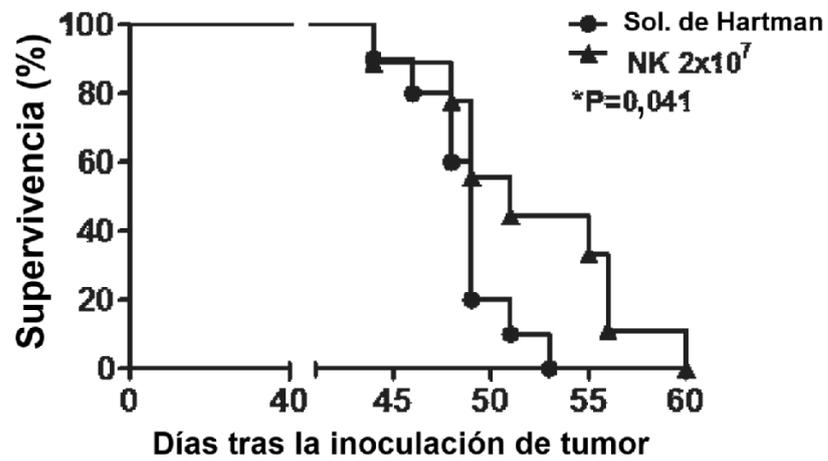
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

