

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 310**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C07K 14/55** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2020 PCT/KR2020/016376**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2021 WO21101270**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2020 E 20890969 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 4063491**

54 Título: **Composición para cultivar linfocitos citolíticos naturales y método para preparar linfocitos citolíticos naturales usando los mismos**

30 Prioridad:

**20.11.2019 KR 20190149779**  
**10.02.2020 KR 20200015802**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.02.2025**

73 Titular/es:

**GI CELL, INC. (100.00%)**  
**B-1553, 14, Galmachi-ro 288beon-gil, Jungwon-gu**  
**Seongnam-si, Gyeonggi-do 13201, KR**

72 Inventor/es:

**JANG, MYOUNG HO;**  
**HONG, CHUN-PYO;**  
**KO, DONG WOO y**  
**LEE, JUNE SUB**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 997 310 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

Composición para cultivar linfocitos citolíticos naturales y método para preparar linfocitos citolíticos naturales usando los mismos

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de una composición para cultivar linfocitos citolíticos naturales y a un método para producir linfocitos citolíticos naturales usando la misma.

10

**Antecedentes de la técnica**

Se han desarrollado diversos tratamientos, tales como la operación quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, la radioterapia y la quimioterapia, para tratar el cáncer, pero como se han notificado varios efectos secundarios, y recientemente se ha desarrollado una inmunoterapia que usa la función inmunitaria de un paciente. En particular, se ha estudiado la inmunoterapia que usa linfocitos citolíticos naturales que pueden producirse y congelarse a gran escala.

15

Específicamente, los linfocitos citolíticos naturales son un tipo de linfocito que se distribuye en la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos periféricos y la sangre periférica del cuerpo. Constituyen aproximadamente el 10 % de los linfocitos de la sangre periférica y desempeñan una función importante en la respuesta inmunitaria innata (Ann Rev Immunol., 24: 257-286, 2006)). Además, los linfocitos citolíticos naturales son positivos para CD56 y CD16, pero negativos para CD3. Los linfocitos citolíticos naturales destruyen células mediante la liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzima. Los linfocitos citolíticos naturales secretan diversas citocinas, tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-10.

20

25

Además, los linfocitos citolíticos naturales expresan varios receptores en la superficie celular, y estos receptores están implicados en la adhesión celular, la activación de la capacidad para destruir células o la inhibición de la capacidad para destruir células. Sin embargo, la mayoría de los linfocitos citolíticos naturales en el cuerpo de un sujeto normal existen en un estado inactivo. Por lo tanto, existe la necesidad de linfocitos citolíticos naturales activados para eliminar el cáncer. Además, para los linfocitos citolíticos naturales presentes en el cuerpo de un paciente con cáncer, los linfocitos citolíticos naturales tienen defectos funcionales debido al mecanismo de evasión inmunitaria de las células neoplásicas. Por lo tanto, es muy importante activar los linfocitos citolíticos naturales para usarlos como un agente terapéutico. Además, es esencial desarrollar una técnica para proliferar masivamente y congelar linfocitos citolíticos naturales en la sangre de un sujeto normal o un paciente porque el número de linfocitos citolíticos naturales presentes en el cuerpo es limitado.

30

35

Por otro lado, IL-2, también llamada factor de crecimiento de linfocitos T (TCGF), es una glucoproteína globular que desempeña una función central en la producción, supervivencia y homeostasis de los linfocitos. IL-2 tiene un tamaño de proteína de 15,5 kDa a 16 kDa y consiste en 133 aminoácidos. IL-2 media en diversas respuestas inmunitarias uniéndose al receptor de IL-2 que tiene tres subunidades distintas.

40

Además, CD80 se conoce como B7-1 y es uno de los miembros de la familia B7 entre las proteínas unidas a membrana implicadas en la regulación inmunitaria uniéndose al ligando y transmitiendo así respuestas coestimuladoras y respuestas coinhibitorias. CD80 es una proteína transmembrana expresada en la superficie de los linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y monocitos. Se sabe que CD80 se une a CD28, CTLA4 (CD152) y PD-L1.

45

Como tal, es ampliamente conocido que los linfocitos citolíticos naturales son importantes para el tratamiento antineoplásico, pero los métodos específicos que pueden amplificar los linfocitos citolíticos naturales para usarlos de manera eficaz aún son insuficientes.

50

Park *et al.* (Annals of Oncology, 30;S5, 2019) divulgan GI101, que comprende el dominio extracelular de CD80, que se une a CTLA4 y PD-L1, junto con una variante de IL-2 de acción prolongada que se une preferentemente a IL2R $\beta$ .

55

Kong *et al.* (Biochemistry and Cell Biology, 85;6 685-695, 2007) divulgan la proteína de fusión IL2-B7.1(IgV+C), que demostró mostrar una fuerte estimulación de la proliferación de linfocitos T.

Sauve *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences 88;11 4636-4640, 1991) usan análogos de IL2 para identificar residuos que interactúan con la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 humano.

60

El documento US5299109 divulga análogos de IL-2 de "baja toxicidad" y sus usos en estrategias de tratamiento de inmunoterapia humana e inmunoterapia adoptiva.

65

El documento WO2017079117 A1 divulga polipéptidos del dominio extracelular de CD80 y moléculas de fusión de dominio extracelular de CD80 y su uso en el tratamiento del cáncer.

**Descripción detallada de la invención**

**Problema técnico**

5 Por consiguiente, los presentes inventores prepararon linfocitos citolíticos naturales usando un dímero de proteína de fusión que comprende la proteína IL-2 y la proteína CD80, como resultado de la investigación para preparar linfocitos citolíticos naturales activados en una gran cantidad. Además, los presentes inventores han identificado que los linfocitos citolíticos naturales así preparados tienen una actividad aumentada y exhiben excelentes efectos antineoplásicos y, por lo tanto, han completado la presente invención.

10

**Solución al problema**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

15 Para lograr el objeto anterior, de acuerdo con una realización de ejemplo, se proporciona el uso de una composición para cultivar linfocitos citolíticos naturales incluyendo, como principio activo, un dímero de proteína de fusión que comprende una variante de IL-2 y un fragmento de CD80, como se define en las reivindicaciones.

20 De acuerdo con otra realización de ejemplo, se proporciona un método para cultivar linfocitos citolíticos naturales que incluye: i) aislar células que no expresan CD3 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC); ii) aislar células que expresan CD56 de las células que no expresan CD3, aisladas en la etapa anterior; y iii) cultivar las células aisladas en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma, como se define en las reivindicaciones.

25 También se describen en el presente documento linfocitos citolíticos naturales preparadas mediante el método para cultivar linfocitos citolíticos naturales.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar el cáncer que incluye los linfocitos citolíticos naturales como principio activo.

30

**Efecto de la invención**

35 La composición de la presente invención para cultivar linfocitos citolíticos naturales que incluye, como principio activo, una proteína de fusión que comprende una variante de IL-2 y un fragmento de CD80 promueve la proliferación de linfocitos citolíticos naturales, induce la expresión de CD16 y NKp46, y aumenta la expresión y secreción de granzima B y perforina y, por lo tanto, puede usarse de manera útil en la producción de linfocitos citolíticos naturales que tienen una excelente función inmunitaria antineoplásica.

**Breve descripción de los dibujos**

40

Las realizaciones de ejemplo se pueden entender con más detalle a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

45 La figura 1A es un diagrama esquemático de un dímero de proteína de fusión usado en la presente invención; la figura 1B muestra una imagen de SDS-PAGE que confirma el dímero de proteína de fusión obtenido (GI-101); la figura 1C muestra un contenido del dímero de proteína de fusión (GI-101) de acuerdo con la absorbancia; la figura 1D muestra un resultado del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del dímero de proteína de fusión obtenido (GI-101);

50 la figura 2A muestra imágenes de SDS-PAGE que confirman el dímero de proteína de fusión hCD80-Fc obtenido; la figura 2B muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del dímero de proteína de fusión hCD80-Fc obtenido;

la figura 3A muestra una imagen de SDS-PAGE que confirma el dímero de proteína de fusión Fc-II<sub>2</sub>v2 obtenido; la figura 3B muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del dímero de proteína de fusión Fc-II<sub>2</sub>v2 obtenido;

55 la figura 3C muestra imágenes de SDS-PAGE que confirman el dímero de proteína de fusión Fc-II<sub>2</sub>wt obtenido; la figura 3D muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del dímero de proteína de fusión Fc-II<sub>2</sub>wt obtenido;

la figura 4A muestra una imagen de SDS-PAGE que confirma el hCD80-Fc-II<sub>2</sub>wt obtenido; la figura 4B muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del dímero de proteína de fusión hCD80-Fc-II<sub>2</sub>wt obtenido;

60 las figuras 5A y 5B muestran el número de linfocitos NK cuando se cultivan en una condición AIM-V (RS al 5 %); las figuras 6A y 6B muestran la viabilidad de los linfocitos NK cuando se cultivan en una condición AIM-V (RS al 5 %);

65 las figuras 7A y 7B muestran el número de linfocitos NK cuando se cultivan en una condición AIM-V (hABS al 5 %); las figuras 8A y 8B muestran la viabilidad de los linfocitos NK cuando se cultivan en una condición AIM-V (hABS al 5 %);

las figuras 9A y 9B muestran el número de linfocitos NK cuando se cultivan en una condición X-VIVO (hABS al 5 %);  
 las figuras 10A y 10B muestran la viabilidad de los linfocitos NK cuando se cultivan en una condición X-VIVO (hABS al 5 %);  
 5 las figuras 11A y 11B muestran el número de linfocitos NK cuando se cultivan en una condición NK MACS (hABS al 5 %);  
 las figuras 12A y 12B muestran la viabilidad de los linfocitos NK cuando se cultivan en una condición NK MACS (hABS al 5 %);  
 la figura 13 muestra el resultado del análisis FACS que confirma la pureza de los linfocitos citolíticos naturales  
 10 cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (RS al 5 %);  
 la figura 14 muestra el resultado del análisis FACS que confirma la pureza de los linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 la figura 15 muestra el resultado del análisis FACS que confirma la pureza de los linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio X-VIVO15 (hABS al 5 %);  
 15 la figura 16 muestra el resultado del análisis FACS que confirma la pureza de los linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio NK MACS (hABS al 5 %);  
 la figura 17 muestra el resultado del análisis para los marcadores de activación de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (RS al 5 %);  
 la figura 18 muestra el resultado del análisis para los marcadores de inhibición de linfocitos citolíticos naturales  
 20 cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (RS al 5 %);  
 la figura 19 muestra el resultado del análisis para los marcadores de activación de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 la figura 20 muestra el resultado del análisis para los marcadores de inhibición de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 25 la figura 21 muestra el resultado del análisis para los marcadores de activación de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio X-VIVO (hABS al 5 %);  
 la figura 22 muestra el resultado del análisis para los marcadores de inhibición de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio X-VIVO (hABS al 5 %);  
 la figura 23 muestra el resultado del análisis para los marcadores de activación de linfocitos citolíticos naturales  
 30 cultivados en una composición que contiene un medio NK MACS (hABS al 5 %);  
 la figura 24 muestra el resultado del análisis para los marcadores de inhibición de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio NK MACS (hABS al 5 %);  
 la figura 25 muestra el resultado del análisis para los marcadores de citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (RS al 5 %);  
 35 la figura 26 muestra el resultado del análisis para los marcadores de citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 la figura 27 muestra el resultado del análisis para los marcadores de citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales cultivados en una composición que contiene un medio X-VIVO15 (hABS al 5 %);  
 la figura 28 muestra el resultado del análisis para los marcadores de citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales  
 40 cultivados en una composición que contiene un medio NK MACS (hABS al 5 %);  
 la figura 29 muestra los resultados de analizar la capacidad de desgranulación de linfocitos citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 la figura 30 muestra los resultados de analizar el efecto de destrucción de células neoplásicas de linfocitos  
 45 citolíticos naturales cultivados durante 21 días frente a una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio AIM-V (hABS al 5 %);  
 la figura 31 muestra los resultados de analizar la capacidad de desgranulación de linfocitos citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio X-VIVO15 (hABS al 5 %);  
 50 la figura 32 muestra los resultados de analizar el efecto de destrucción de células neoplásicas de linfocitos citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio X-VIVO15 (hABS al 5 %);  
 la figura 33 muestra los resultados de analizar la capacidad de desgranulación de linfocitos citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio NK MACS (hABS al 5 %); y  
 la figura 34 muestra los resultados de analizar el efecto de destrucción de células neoplásicas de linfocitos  
 60 citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición que contiene GI-101 (50 nM), GI-101\_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), o CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) en un medio NK MACS (hABS al 5 %).

**Mejor modo para realizar la invención**

65 **Composición y medio para la proliferación de linfocitos NK**

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición para cultivar un linfocito citolítico natural (NK) como se define en las reivindicaciones incluyendo, como principio activo, un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma, en donde la proteína de fusión es como se define en las reivindicaciones. Además, se proporciona un medio de cultivo de linfocitos citolíticos naturales que incluye el dímero de proteína de fusión como principio activo.

La composición para cultivar el linfocito citolítico natural puede incluir además uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un medio, un suero, un complemento y una combinación de los mismos.

El medio de cultivo de linfocitos NK puede ser un medio en el que el dímero de proteína de fusión que comprende la proteína IL-2 y la proteína CD80 se añade a un medio de cultivo celular. En este caso, el medio de cultivo celular puede incluir uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, azúcares, sales inorgánicas y vitaminas. Preferentemente, el medio de cultivo celular puede incluir todos los aminoácidos, azúcares, sales inorgánicas y vitaminas. Como una realización específica, el medio de cultivo de linfocitos NK puede incluir al menos uno de los componentes de la Tabla 1 a la Tabla 4 a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo celular" significa un medio usado para cultivar células, específicamente linfocitos NK, y más específicamente células CD3-CD56+. Esto incluye los componentes necesarios para el crecimiento y la supervivencia celular *in vitro*, o incluye componentes que ayudan al crecimiento y la supervivencia celular. Específicamente, los componentes pueden ser vitaminas, aminoácidos esenciales o no esenciales y oligoelementos. El medio puede ser un medio usado para el cultivo de células, preferentemente células eucariotas y, más preferentemente, linfocitos NK.

El medio de cultivo celular puede incluir un componente aminoacídico, un componente vitamínico, un componente de sal inorgánica, otro componente y agua purificada, en donde:

a) el componente aminoacídico es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-treonina, L-serina, L-cisteína, L-metionina, ácido L-aspártico, L-asparagina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-lisina, L-arginina, L-histidina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, L-prolina,  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ornitina, citrulina, homoserina, triyodotironina, tiroxina y dioxifenilalanina, o una combinación de los mismos, y preferentemente al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, L-alanina, L-arginina, L-cisteína, L-glutamina, L-histidina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, L-serina, L-treonina y L-valina, o una combinación de los mismos;

b) el componente vitamínico es al menos una vitamina seleccionada del grupo que consiste en biotina, D-pantotenato de calcio, ácido fólico, niacinamida, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B12, cloruro de colina, i-inositol y ácido ascórbico, o una combinación de los mismos, y preferentemente al menos una vitamina seleccionada del grupo que consiste en i-inositol, clorhidrato de tiamina, niacinamida e clorhidrato de piridoxina, o una combinación de los mismos;

c) el componente de sal inorgánica es al menos una sal inorgánica seleccionada del grupo que consiste en cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (anhidro), sulfato de cobre pentahidrato (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), sulfato de hierro (III) heptahidrato (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), cloruro de magnesio (anhidro), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) (anhidro), cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), hidrogenofosfato de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), dihidrogenofosfato de sodio monohidrato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), sulfato de cinc heptahidrato (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), nitrato de hierro (III) nonahidrato (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O) e hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), o una combinación de los mismos, y preferentemente al menos una sal inorgánica seleccionada del grupo que consiste en cloruro de sodio (NaCl), hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (anhidro) y dihidrogenofosfato de sodio monohidrato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), o una combinación de los mismos;

d) el otro componente es al menos otro componente seleccionado del grupo que consiste en D-glucosa (dextrosa), piruvato de sodio, hipoxantina Na, timidina, ácido linoleico, ácido lipoico, adenosina, citidina, guanosina, uridina, 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxicitidina HCl y 2'-desoxiguanosina, o una combinación de los mismos, y puede ser preferentemente piruvato de sodio; y

e) el agua purificada se usa para disolver el aminoácido, la vitamina, la sal inorgánica y el otro componente, y puede obtenerse mediante uno o más procesos de destilación, o purificarse a través de un filtro.

Además, el medio de cultivo celular puede incluir además un factor de crecimiento o una citocina. El factor de crecimiento puede ser IGF, bFGF, TGF, HGF, EGF, VEGF, PDGF o similares solos o al menos dos de los mismos, pero sin limitarse a los mismos. La citocina puede ser IL-1, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-15, IL-17, IL-21 o similares solas o al menos dos de las mismas, pero sin limitarse a las mismas.

Además, el medio de cultivo celular puede incluir además un anticuerpo para activar linfocitos citolíticos naturales. El anticuerpo para activar linfocitos citolíticos naturales puede ser un anticuerpo anti CD3, un anticuerpo anti CD2, un anticuerpo anti CD335 o similares solo o al menos dos de los mismos, pero sin limitarse a los mismos. Además, se puede incluir una perla a la que se une el anticuerpo para activar linfocitos citolíticos naturales. Además, puede usarse una proteína de fusión que incluya dos o más tipos de anticuerpos, o fragmentos de región variable de los mismos, para activar los linfocitos citolíticos naturales.

En particular, el medio de cultivo de NK puede incluir además una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en IL-15, IL-21 y una combinación de las mismas.

La IL-15 y la IL-21 pueden ser un tipo de interleucina (IL) y se refieren a sustancias bioactivas proteínicas producidas por células inmunocompetentes tales como linfocitos o monocitos y macrófagos. La IL-15 y la IL-21 pueden usarse cuando se cultivan linfocitos citotóxicos naturales usando células mononucleares como células fuente al promover la proliferación de linfocitos citotóxicos naturales, pero existe un problema de baja tasa de proliferación y pureza cuando solo se usan estas solas o en combinación (Biossel L. *et al.*, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 1031-1038, 2008).

Específicamente, el medio puede ser un medio convencional para el cultivo de células animales, tal como DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), EDM (medio de diferenciación endotelial), MEM (medio esencial mínimo), BME (medio basal de Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, a-MEM (medio esencial mínimo a), G-MEM (medio esencial mínimo de Glasgow), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio AIM-V, medio X-VIVO™ 15, medio NK MACS. En una realización de la presente invención, se usaron medio AIM-V, X-VIVO™ 15 y medio NK MACS como medio.

Como se usa en la presente invención, el término "suero" significa sobrenadante transparente separado de la sangre después de que la sangre se ha coagulado completamente. Además, se requiere añadir suero a un medio sintético para cultivar células animales, y es común usar suero bovino, de caballo o humano. Para el suero de origen bovino, puede usarse suero fetal bovino (FBS), suero bovino de recién nacido, suero de ternera, suero bovino o similares, dependiendo del momento de la extracción de la sangre. Para el suero de origen humano, se usa suero humano de un donante cuyo tipo de sangre es AB, y puede usarse suero AB humano que carece de anticuerpos contra antígenos de tipo sanguíneo A y B de modo que pueda minimizar la reactividad inmunitaria. Además, se puede usar RS de células inmunitarias CTS, o similar, como una alternativa al "suero". En una realización de la presente invención, se usó suero AB humano o RS de células inmunitarias CTS.

GLUTAMAX (GIBCO®), una alternativa a la L-glutamina, puede usarse como complementos para mejorar la estabilidad y la actividad celular durante el cultivo celular. Además, el complemento puede ser un complemento NK MACS (Miltenyi Biotec, 130-113-102).

#### **Dímero de proteína de fusión que comprende proteína IL-2 y proteína CD80**

Como se usa en el presente documento, el término "IL-2" o "interleucina 2", a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier IL-2 de tipo natural obtenida de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos, por ejemplo, primates (tales como seres humanos) y roedores (tales como ratones y ratas). La IL-2 puede obtenerse de células animales, y también incluye una obtenida de células recombinantes capaces de producir IL-2. Además, la IL-2 puede ser IL-2 de tipo natural o una variante de la misma.

En la presente memoria descriptiva, la IL-2, o una variante de la misma, puede expresarse colectivamente mediante la expresión "proteína IL-2" o "polipéptido IL-2". IL-2, una proteína IL-2, un polipéptido IL-2 y una variante de IL-2 se unen específicamente a, por ejemplo, un receptor de IL-2. Esta unión específica puede identificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

IL-2 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36. En este caso, IL-2 también puede estar en una forma madura. Específicamente, la IL-2 madura puede no comprender una secuencia señal y puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En este caso, IL-2 puede usarse bajo un concepto que abarca un fragmento de IL-2 de tipo natural en el que una porción del extremo N o C de la IL-2 de tipo natural está truncada.

Además, el fragmento de IL-2 puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos contiguos están truncados desde el extremo N de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36. Además, el fragmento de IL-2 puede estar en una forma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos contiguos están truncados desde el extremo C de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36.

Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de IL-2" se refiere a una forma en la que se sustituye una porción de aminoácidos de la IL-2 de longitud completa o del fragmento de IL-2 descrito anteriormente. Es decir, una variante de IL-2 puede tener una secuencia de aminoácidos diferente de la IL-2 de tipo natural, o un fragmento de la misma. Sin embargo, una variante de IL-2 puede tener una actividad equivalente o similar a la de la IL-2 de tipo natural. En este caso, "actividad de IL-2" puede referirse, por ejemplo, a la unión específica a un receptor de IL-2, cuya unión específica se puede medir mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Específicamente, la variante de IL-2 que se va a usar en la invención se obtiene mediante la sustitución de al menos los aminoácidos 38 y 42 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Específicamente, la variante de IL-2 que se va a usar en la invención se obtiene mediante la sustitución de al menos

los aminoácidos 38 y 42 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 por otro aminoácido. Además, cuando IL-2 está en una forma en la que una porción del extremo N en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 está truncada, el aminoácido en una posición que corresponde de manera complementaria a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 puede sustituirse por otro aminoácido. Por ejemplo, cuando IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, su variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de al menos uno de los aminoácidos 58, 62, 65, 81 o 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 por otro aminoácido. Estos residuos de aminoácidos corresponden a los respectivos residuos de aminoácidos 38, 42, 45, 61 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. De acuerdo con una realización, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos pueden sustituirse siempre que dicha variante de IL-2 mantenga la actividad de IL-2. De acuerdo con otra realización, pueden sustituirse de dos a cinco aminoácidos.

En una realización, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen dos aminoácidos. Específicamente, la variante de IL-2 se obtiene mediante la sustitución de los aminoácidos 38 y 42 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen tres aminoácidos. Específicamente, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42 y 45 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, en una realización, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42 y 61 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, en una realización, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen cuatro aminoácidos. Específicamente, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42, 45 y 61 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, en una realización, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42, 45 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, en una realización, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de los aminoácidos 38, 42, 61 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen cinco aminoácidos. Específicamente, la variante de IL-2 puede obtenerse mediante la sustitución de cada uno de los aminoácidos 38, 42, 45, 61 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 por otro aminoácido.

En este caso, el "otro aminoácido" introducido por la sustitución puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Sin embargo, con respecto a la sustitución de aminoácidos para la variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38 no puede estar sustituido por arginina, el aminoácido 42 no puede estar sustituido por fenilalanina, el aminoácido 45 no puede estar sustituido por tirosina, el aminoácido 61 no puede estar sustituido por ácido glutámico, y el aminoácido 72 no puede estar sustituido por leucina.

Con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38, arginina, puede sustituirse por un aminoácido distinto de arginina. Preferentemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 38, arginina, puede sustituirse por alanina (R38A).

Con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 42, fenilalanina, puede sustituirse por un aminoácido distinto de fenilalanina. Preferentemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 42, fenilalanina, puede sustituirse por alanina (F42A).

Con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 45, tirosina, puede sustituirse por un aminoácido distinto de tirosina. Preferentemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 45, tirosina, puede sustituirse por alanina (Y45A).

Con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 61, ácido glutámico, puede sustituirse por un aminoácido distinto de ácido glutámico. Preferentemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 61, ácido glutámico, puede sustituirse por arginina (E61R).

Con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 72, leucina, puede sustituirse por un aminoácido distinto de leucina. Preferentemente, con respecto a la sustitución de aminoácidos para una variante de IL-2, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, el aminoácido 72, leucina, puede sustituirse por glicina (L72G).

## ES 2 997 310 T3

Específicamente, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

5 Específicamente, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante sustituciones de aminoácidos en dos, tres, cuatro o cinco posiciones entre las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G.

Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen dos aminoácidos. Específicamente, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A y F42A.

10 Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen tres aminoácidos. Específicamente, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A y Y45A. Además, en una realización, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A y E61R. Además, en una realización, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A y L72G.

15 Además, una variante de IL-2 puede estar en una forma en la que se sustituyen cuatro aminoácidos. Específicamente, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A y E61R. Además, en una realización, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A y L72G. Además, en una realización, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A, E61R y L72G.

20 Además, una variante de IL-2 puede obtenerse mediante las sustituciones, R38A, F42A, Y45A, E61R y L72G.

Preferentemente, una realización de la variante de IL-2 puede comprender una cualquiera de las siguientes combinaciones de sustitución (a) a (d) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10:

- 25 (a) R38A/F42A  
(b) R38A/F42A/Y45A  
(c) R38A/F42A/E61R  
(d) R38A/F42A/L72G

30 En este caso, cuando IL-2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, una sustitución de aminoácidos puede estar presente en una posición que corresponde de manera complementaria a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Además, incluso cuando IL-2 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, una sustitución de aminoácidos puede estar presente en una posición que corresponde de manera complementaria a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

35 Específicamente, una variante de IL-2 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 22, 23 o 24.

Además, una variante de IL-2 puede caracterizarse por tener baja toxicidad *in vivo*. En este caso, la baja toxicidad *in vivo* puede ser un efecto secundario causado por la unión de IL-2 a la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ). Se han desarrollado diversas variantes de IL-2 para mejorar el efecto secundario causado por la unión de IL-2 a IL-2R $\alpha$ , y dichas variantes de IL-2 pueden ser las divulgadas en la Patente de EE. UU. N.º 5.229.109 y la Patente Coreana N.º 1667096. En particular, las variantes de IL-2 descritas en la presente solicitud tienen baja capacidad de unión a la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) y, por lo tanto, tienen menor toxicidad *in vivo* que la IL-2 de tipo natural.

45 Como se usa en el presente documento, el término "CD80", también denominado "B7-1", es una proteína de membrana presente en células dendríticas, linfocitos B activados y monocitos. CD80 proporciona señales coestimuladoras esenciales para la activación y supervivencia de los linfocitos T. CD80 es conocida como un ligando para las dos proteínas diferentes, CD28 y CTLA-4, presentes en la superficie de los linfocitos T. CD80 puede consistir en 288 aminoácidos y puede tener específicamente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Además, como se usa en el presente documento, la expresión "proteína CD80" se refiere a CD80 de longitud completa o a un fragmento de CD80.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de CD80" se refiere a una forma truncada de CD80. Además, el fragmento de CD80 que se usará en la invención comprende un dominio extracelular de CD80. Una realización del fragmento de CD80 puede obtenerse mediante la eliminación de los aminoácidos 1 a 34 del extremo N, que son una secuencia señal de CD80. Específicamente, una realización del fragmento de CD80 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 35 a 288 en la SEQ ID NO: 11. Además, una realización del fragmento de CD80 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 35 a 242 en la SEQ ID NO: 11. Además, una realización del fragmento de CD80 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 35 a 232 en la SEQ ID NO: 11.

60 Además, una realización del fragmento de CD80 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 35 a 139 en la SEQ ID NO: 11. Además, una realización del fragmento de CD80 puede ser una proteína que consiste en los aminoácidos 142 a 242 en la SEQ ID NO: 11. En una realización, un fragmento de CD80 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

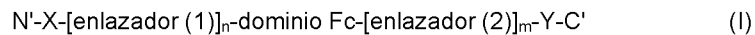
65 Además, la variante de IL-2 y el fragmento de CD80 que se van a usar en la invención se unen entre sí a través de un enlazador o un portador. En la presente descripción, el enlazador y el portador pueden usarse indistintamente.

5 El enlazador une dos proteínas. Una realización del enlazador puede incluir de 1 a 50 aminoácidos, albúmina, o un fragmento de la misma, un dominio Fc de una inmunoglobulina o similares. En este caso, el dominio Fc de una inmunoglobulina se refiere a una proteína que comprende la región constante de cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, y no comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera y la región constante de cadena ligera 1 (CH1) de una inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede ser IgG, IgA, IgE, IgD o IgM, y puede ser preferentemente IgG4. En este caso, el dominio Fc de la inmunoglobulina G4 de tipo natural puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

10 Además, el dominio Fc de una inmunoglobulina puede ser una variante del dominio Fc, así como un dominio Fc de tipo natural. Además, como se usa en el presente documento, la expresión "variante del dominio Fc" puede referirse a una forma que es diferente del dominio Fc de tipo natural en términos de patrón de glucosilación, que tiene una glucosilación alta en comparación con el dominio Fc de tipo natural, o que tiene una glucosilación baja en comparación con el dominio Fc de tipo natural, o una forma desglucosilada. Además, se incluye en el mismo un dominio Fc aglucosilado. El dominio Fc, o una variante del mismo, puede adaptarse para tener un número ajustado de ácidos siálicos, fucosilaciones o glucosilaciones, mediante condiciones de cultivo o manipulación genética de un hospedador.

20 Además, la glucosilación del dominio Fc de una inmunoglobulina puede modificarse mediante métodos convencionales, tales como métodos químicos, métodos enzimáticos y métodos de ingeniería genética usando microorganismos. Además, la variante del dominio Fc puede estar en una forma mixta de las respectivas regiones Fc de inmunoglobulinas, IgG, IgA, IgE, IgD e IgM. Además, la variante del dominio Fc puede estar en una forma en la que algunos aminoácidos del dominio Fc se sustituyen por otros aminoácidos. Una realización de la variante del dominio Fc puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

25 La proteína de fusión que se usará en la invención tiene la siguiente fórmula estructural (I) o (II):



30 En este caso, en las fórmulas estructurales (I) y (II),

35 N' es el extremo N de la proteína de fusión,  
C' es el extremo C de la proteína de fusión,  
X es un fragmento de CD80  
Y es una variante de IL-2,  
los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos, y  
n y m son cada uno independientemente 0 o 1.

40 Preferentemente, la proteína de fusión que se va a usar en la invención puede consistir en la fórmula estructural (I). La variante de IL-2 es como se describe en las reivindicaciones. Además, la proteína CD80 es como se describe en las reivindicaciones. El fragmento de CD80 puede ser un fragmento obtenido por truncamiento de hasta aproximadamente 34 residuos de aminoácidos contiguos del extremo N o C de CD80 de tipo natural. Como alternativa, el fragmento de CD80 puede ser un dominio extracelular similar a inmunoglobulina que tiene la actividad de unirse a los receptores de superficie de linfocitos T CTLA-4 y CD28.

50 Específicamente, la proteína de fusión puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30. De acuerdo con otra realización, la proteína de fusión incluye un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 26, 28 o 30. En este caso, la identidad es, por ejemplo, el porcentaje de homología, y puede determinarse a través de un software de comparación de homología, tal como el software BlastN del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

55 El enlazador peptídico (1) que se va a usar en la invención está incluido entre el fragmento de CD80 y el dominio Fc. El enlazador peptídico (1) puede consistir en de 5 a 80 aminoácidos contiguos, de 20 a 60 aminoácidos contiguos, de 25 a 50 aminoácidos contiguos o de 30 a 40 aminoácidos contiguos. En una realización, el enlazador peptídico (1) puede consistir en 30 aminoácidos. Además, el enlazador peptídico (1) puede comprender al menos una cisteína. Específicamente, el enlazador peptídico (1) puede comprender una, dos o tres cisteínas. Además, el enlazador peptídico (1) puede obtenerse de la bisagra de una inmunoglobulina. En una realización, el enlazador peptídico (1) puede ser un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

65 El enlazador peptídico (2) puede consistir en de 1 a 50 aminoácidos contiguos, de 3 a 30 aminoácidos contiguos o de 5 a 15 aminoácidos contiguos. En una realización, el enlazador peptídico (2) puede ser (G4S)<sub>n</sub> (donde n es un número entero de 1 a 10). En este caso, en (G4S)<sub>n</sub>, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una realización, el enlazador peptídico (2) puede ser un enlazador peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

También se describe en el presente documento un dímero obtenido mediante la unión de dos proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende una proteína IL-2 y una proteína CD80. La proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma, es como se ha descrito anteriormente.

5 En este caso, la unión entre las proteínas de fusión que constituyen el dímero se puede lograr mediante, pero sin limitación, un enlace disulfuro formado por cisteínas presentes en el enlazador. Las proteínas de fusión que constituyen el dímero pueden ser las mismas o diferentes proteínas de fusión entre sí. Preferentemente, el dímero puede ser un homodímero. Una realización de la proteína de fusión que constituye el dímero puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

10

#### **Método de cultivo de linfocitos NK 1**

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para cultivar un linfocito citolítico natural, que incluye: i) aislar una célula que no expresa CD3 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC); ii) aislar una célula que expresa CD56 de la célula que no expresa CD3 aislada en la etapa anterior; y iii) cultivar las células aisladas en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma, como se define en las reivindicaciones.

15

Como se usa en la presente invención, el término "PBMC" significa una célula mononuclear de sangre periférica. La PBMC está compuesta por linfocitos (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales) y monocitos, y se puede aislar de sangre completa mediante Ficoll y centrifugación. Las PBMC pueden aislarse de sangre completa obtenida de un individuo.

20

El dímero de proteína de fusión es como se describe en detalle para una composición para cultivar linfocitos citolíticos naturales. El dímero de proteína de fusión puede tratarse a una concentración de 1 nM a 500 nM. Específicamente, el dímero de proteína de fusión puede tratarse a una concentración de 1 nM a 500 nM, de 5 nM a 300 nM o de 10 nM a 150 nM. En una realización de la presente invención, el dímero de proteína de fusión se trató a una concentración de 1,6 nM o 50 nM.

25

Puede realizarse un método para cultivar las células aisladas usando un método ampliamente conocido en la técnica. Específicamente, la temperatura de cultivo en la etapa de cultivo de las células aisladas puede ser de 27 °C a 40 °C o de 30 °C a 37 °C. En una realización de la presente invención, el cultivo se realizó a una temperatura de 37 °C. Además, en la etapa de cultivo de las células aisladas, la condición de concentración de CO<sub>2</sub> durante el cultivo puede ser del 1 % al 10 %, y preferentemente, puede cultivarse en una condición de CO<sub>2</sub> al 5 %.

30

35

En la etapa de cultivo de las células aisladas, el período de cultivo puede ser de 5 días a 25 días, de 6 días a 23 días o de 7 días a 21 días. En una realización de la presente invención, el período de cultivo fue de 20 días y apareció una diferencia significativa en la proliferación a partir del 5.º día.

#### **40 Linfocitos NK obtenidos y uso de los mismos**

También se describen en el presente documento linfocitos citolíticos naturales preparadas mediante el método para cultivar linfocitos citolíticos naturales.

45 Los linfocitos citolíticos naturales pueden tener una expresión aumentada de CD16 y NKp46. Los linfocitos citolíticos naturales pueden tener una expresión aumentada de granzima B y perforina. Los linfocitos citolíticos naturales cultivados de acuerdo con el método de cultivo de linfocitos citolíticos naturales pueden congelarse y la función de las células no se ve afectada ni siquiera cuando se descongelan de nuevo.

50 Debido a la alta expresión de receptores de activación, tales como CD16 y NKp46, los linfocitos citolíticos naturales exhiben una mayor capacidad de destrucción contra una línea de células neoplásicas y una mayor secreción de granzima B y perforina, y por lo tanto se puede esperar un excelente efecto antineoplásico. Por lo tanto, puede prepararse un agente terapéutico eficaz para tratar el cáncer, usando una gran cantidad de linfocitos citolíticos naturales activados que son clínicamente aplicables. Además, los linfocitos citolíticos naturales pueden tener una alta expresión de NKp30 o DNAM1.

55

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar el cáncer que incluye los linfocitos citolíticos naturales como principio activo.

60 Además, los linfocitos citolíticos naturales preparados mediante el método para cultivar linfocitos citolíticos naturales pueden incluirse en una cantidad del 10 al 95 % en peso basándose en el peso total de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica puede incluir además, además del principio activo, al menos un principio activo que exhibe funciones iguales o similares.

65 Una dosificación de la composición farmacéutica puede ajustarse de acuerdo con diversos factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, los tipos y el contenido de los principios activos y otros ingredientes

incluidos en la composición, los tipos de formulación, y la edad, el peso, el estado de salud general, el género y la dieta de un paciente, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de secreción de una composición, la duración del tratamiento y los fármacos usados simultáneamente.

5 Sin embargo, para un efecto deseable, una dosificación de la composición farmacéutica puede ser de  $1 \times 10^2$  células/kg a  $1,0 \times 10^{13}$  células/kg, y de  $1 \times 10^7$  células/kg a  $1,5 \times 10^{11}$  células/kg, basándose en los linfocitos citolíticos naturales, que son un principio activo. En este caso, la dosis puede administrarse una vez al día, o puede dividirse en varias veces.

10 Además, la composición farmacéutica puede administrarse a un individuo mediante diversos métodos conocidos en la técnica. La vía de administración puede seleccionarse apropiadamente por un experto en la técnica teniendo en cuenta el método de administración, el volumen de fluido corporal, la viscosidad o similares.

15 El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cuello del útero, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.

**Método de tratamiento que usa los linfocitos NK obtenidos**

20 También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer que incluye administrar el linfocito NK a un individuo que tiene cáncer. En este caso, los linfocitos NK y el cáncer son como se han descrito anteriormente. Otro aspecto más de la presente invención proporciona el uso del linfocito NK para tratar el cáncer.

**Método de cultivo de linfocitos NK 2**

También se describe en el presente documento un método para cultivar un linfocito citolítico natural, que incluye: i) aislar una célula que no expresa CD3 de PBMC; y ii) cultivar la célula aislada en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma.

30 También se describen en el presente documento linfocitos citolíticos naturales preparados mediante el método para cultivar un linfocito citolítico natural. También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer, que incluye el linfocito citolítico natural como principio activo. También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer que incluye administrar el linfocito NK a un individuo que tiene cáncer. En este caso, el linfocito NK y el cáncer son como se han descrito anteriormente. También se describe en el presente documento el uso del linfocito NK para tratar el cáncer.

40 Debido a la alta expresión de receptores de activación, tales como CD16 y NKp46, los linfocitos citolíticos naturales exhiben una mayor capacidad de destrucción contra una línea de células neoplásicas y una mayor secreción de granzima B y perforina, y por lo tanto se puede esperar un excelente efecto antineoplásico. Por lo tanto, puede prepararse un agente terapéutico eficaz para tratar el cáncer, usando una gran cantidad de linfocitos citolíticos naturales activados que son clínicamente aplicables. Además, los linfocitos citolíticos naturales pueden tener una alta expresión de NKp30 o DNAM1.

45 El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cuello del útero, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.

**Método de cultivo de linfocitos NK 3**

También se describe en el presente documento un método para cultivar linfocitos citolíticos naturales, que incluye: i) aislar una célula que expresa CD56 de PBMC; y ii) cultivar la célula aislada en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma.

55 También se describe en el presente documento un linfocito citolítico natural preparado mediante el método para cultivar un linfocito citolítico natural. Debido a la alta expresión de receptores de activación, tales como CD16 y NKp46, los linfocitos citolíticos naturales exhiben una mayor capacidad de destrucción contra una línea de células neoplásicas y una mayor secreción de granzima B y perforina, y por lo tanto se puede esperar un excelente efecto antineoplásico. Por lo tanto, puede prepararse un agente terapéutico eficaz para tratar el cáncer, usando una gran cantidad de linfocitos citolíticos naturales activados que son clínicamente aplicables. Además, los linfocitos citolíticos naturales pueden tener una alta expresión de NKp30 o DNAM1.

65 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer, que incluye el linfocito citolítico natural como principio activo. También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer que incluye administrar el linfocito NK a un individuo que tiene cáncer. En este caso, los linfocitos

NK y el cáncer son como se han descrito anteriormente. También se describe en el presente documento el uso de linfocitos NK para tratar el cáncer.

5 El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cuello del útero, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.

#### 10 **Método de cultivo de linfocitos NK 4**

También se describe en el presente documento un método para promover la actividad de los linfocitos citolíticos naturales en PBMC, que incluye cultivar PBMC en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende IL-2, o una variante de la misma, y CD80, o un fragmento de la misma.

15 También se describen en el presente documento PBMC preparadas mediante el método para promover la actividad de los linfocitos citolíticos naturales en las PBMC. Los linfocitos citolíticos naturales en PBMC tienen una alta expresión de un receptor de activación, tal como CD16 y NKp46, de modo que aumentan la capacidad de destrucción celular contra líneas de células neoplásicas y la secreción de granzima B y perforina y, por lo tanto, se pueden esperar excelentes efectos antineoplásicos. Por lo tanto, se puede preparar un agente terapéutico eficaz para tratar el cáncer usando PBMC que incluyan una gran cantidad de linfocitos citolíticos naturales activados que sean clínicamente aplicables. Además, los linfocitos citolíticos naturales en PBMC pueden tener una alta expresión de NKp30 o DNAM1.

20 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer que incluye las PBMC como principio activo. También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer que incluye la administración de los linfocitos NK a un individuo que tiene cáncer. En este caso, los linfocitos NK y el cáncer son como se han descrito anteriormente. También se describe en el presente documento el uso de linfocitos NK para tratar el cáncer.

30 El cáncer puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cuello del útero, cáncer de tiroides, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, tumor cerebral, neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales y linfoma.

#### 35 **Modo de realizar la invención**

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son solo para ilustrar la presente divulgación, y el alcance de la presente divulgación no se limita a los mismos.

#### 40 **I. Preparación de GI-101, linfocitos citolíticos naturales y composición de cultivo de linfocitos citolíticos naturales**

##### **Ejemplo preparatorio 1. Preparación de una variante de hCD80-Fc-IL-2 (2M): GI-101**

45 Para producir una proteína de fusión que incluyera un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una variante de IL-2, se sintetizó un polinucleótido que incluía una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) que codificaba una proteína de fusión que comprendía un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra de Ig conjugada con un enlazador (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5) y una variante de IL-2 (2M) en la que se sustituyen dos aminoácidos (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) en este orden desde el extremo N mediante el servicio de síntesis génica Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific Inc., y se clonó en un vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (EXPI-CHO™) para expresar una proteína de fusión de SEQ ID NO: 9. Después de introducir el vector, las células se cultivaron en un entorno de 37 °C, a 125 rpm y con CO<sub>2</sub> al 8 % durante 7 días y a continuación se recogieron para purificar una proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión purificado se denominó "GI-101".

55 La purificación se realizó usando cromatografía que incluía la resina de proteína A MabSelect SuRe. La proteína de fusión se unió en la condición de Tris 25 mM, NaCl 25 mM y a pH 7,4. A continuación, se eluyó con NaCl 100 mM y ácido acético 100 mM a pH 3. Después de poner el 20 % de Tris-HCl 1 M a pH 9 en un tubo de recolección, se recogió la proteína de fusión. La proteína de fusión recogida se dializó en un tampón PBS durante 16 horas hasta el cambio.

60 A continuación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en el tiempo usando cromatografía de exclusión por tamaño con la columna TSKgel G3000SWXI (TOSOH Bioscience) para obtener una alta concentración de proteína de fusión. En este momento, la proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR), y se tiñó con azul de Coomassie para confirmar su pureza (figura 1B). Se confirmó que la proteína de fusión estaba incluida en una concentración de 2,78 mg/ml, como se detectó usando NanoDrop (figura 1C). Además, el resultado analizado usando cromatografía de exclusión por tamaño es como

se muestra en la figura 1D.

**Ejemplo preparatorio 2. Preparación de un dímero de la variante de Fc-IL-2 (2M): Fc-IL-2v2**

5 Para producir una proteína de fusión que comprendiera un dominio Fc y una variante de IL-2, se sintetizó un polinucleótido que incluía una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 45) que codificaba una proteína de fusión que comprendía un péptido señal (SEQ ID NO: 1), una bisagra de Ig conjugada con un enlazador (SEQ ID NO: 38), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5) y una variante de IL-2 (2M) en la que se sustituyen dos aminoácidos (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) en este orden desde el extremo N mediante el servicio de síntesis génica  
10 Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific Inc., y se clonó en un vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (EXPI-CHO™) para expresar una proteína de fusión de SEQ ID NO: 44. Después de introducir el vector, las células se cultivaron en un entorno de 37 °C, a 125 rpm y con CO<sub>2</sub> al 8 % durante 7 días y a continuación se recogieron para purificar un dímero de proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión purificado se denominó "Fc-IL2v2".  
15

La purificación y recogida de la proteína de fusión se realizó de la misma manera que en el Ejemplo preparatorio 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR), y se tiñó con azul de Coomassie para confirmar su pureza (figura 3A). Como resultado, se confirmó que la proteína de fusión forma un dímero. Además, el resultado analizado usando cromatografía de exclusión por tamaño es como se muestra en la figura 3B.  
20

**Ejemplo preparatorio 3. Preparación de un dímero de Fc-IL-2: Fc-IL-2wt**

25 Para producir una proteína de fusión que comprendiera un dominio Fc y una IL-2 de tipo natural, se sintetizó un polinucleótido que incluía una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 43) que codificaba una proteína de fusión que comprendía un péptido señal (SEQ ID NO: 1), una bisagra de Ig (SEQ ID NO: 38), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5) y una IL-2 de tipo natural (SEQ ID NO: 10) en este orden desde el extremo N mediante el servicio de síntesis génica Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific Inc., y se clonó en un vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (EXPI-CHO™) para expresar una proteína de fusión de SEQ ID NO:  
30 42. Después de introducir el vector, las células se cultivaron en un entorno de 37 °C, a 125 rpm y con CO<sub>2</sub> al 8 % durante 7 días y a continuación se recogieron para purificar un dímero de proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión purificado se denominó "Fc-IL2wt".

La purificación y recogida de la proteína de fusión se realizó de la misma manera que en el Ejemplo preparatorio 1. La proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR), y se tiñó con azul de Coomassie para confirmar su pureza (figura 3C). Como resultado, se confirmó que la proteína de fusión forma un dímero. Además, el resultado analizado usando cromatografía de exclusión por tamaño es como se muestra en la figura 3D.  
35

**Ejemplo preparatorio 4. Preparación de un dímero de tipo natural de hCD80-Fc-IL-2: hCD80-Fc-IL-2wt**

Para producir una proteína de fusión que comprendiera un fragmento de CD80 humano, un dominio Fc y una proteína de tipo natural IL-2, se sintetizó un polinucleótido que incluía una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41) que codificaba una proteína de fusión que comprendía un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID  
45 NO: 2), una bisagra de Ig conjugada con un enlazador (SEQ ID NO: 3), un dominio Fc (SEQ ID NO: 4), un enlazador (SEQ ID NO: 5) e IL-2 de tipo natural (SEQ ID NO: 10) en este orden desde el extremo N mediante el servicio de síntesis génica Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific Inc., y se clonó en un vector pcDNA3\_4. Además, el vector se introdujo en células CHO (EXPI-CHO™) para expresar una proteína de fusión de SEQ ID NO: 46. Después de introducir el vector, las células se cultivaron en un entorno de 37 °C, a 125 rpm y con CO<sub>2</sub> al 8 % de concentración  
50 durante 7 días y a continuación se recogieron para purificar un dímero de proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión purificado se denominó "hCD80-Fc-IL2wt".

La purificación se realizó usando cromatografía que incluía la resina de proteína A MabSelect SuRe. La proteína de fusión se unió en la condición de Tris 25 mM, NaCl 25 mM y a pH 7,4. A continuación, se eluyó con NaCl 100 mM y ácido acético 100 mM a pH 3. Después de poner el 20 % de Tris-HCl 1 M a pH 9 en un tubo de recolección, se recogió la proteína de fusión. La proteína de fusión recogida se dializó en un tampón PBS durante 16 horas hasta el cambio.  
55

A continuación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en el tiempo usando cromatografía de exclusión por tamaño con la columna TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience) para obtener una alta concentración  
60 de proteína de fusión. En este momento, la proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR), y se tiñó con azul de Coomassie para confirmar su pureza (figura 4A). Como resultado, se confirmó que la proteína de fusión forma un dímero. Además, el resultado analizado usando cromatografía de exclusión por tamaño es como se muestra en la figura 4B.

**Ejemplo preparatorio 5. Preparación de un dímero de hCD80-Fc: hCD80-Fc**

Para producir una proteína de fusión que comprendiera un fragmento de CD80 humano y un dominio Fc, se sintetizó un polinucleótido (SEQ ID NO: 39) que incluía una secuencia de nucleótidos que codificaba una proteína de fusión que comprendía un péptido señal (SEQ ID NO: 1), un fragmento de CD80 (SEQ ID NO: 2), una bisagra de Ig conjugada con un enlazador (SEQ ID NO: 3) y un dominio Fc (SEQ ID NO: 4) en este orden desde el extremo N mediante el servicio de síntesis génica Invitrogen GeneArt de ThermoFisher Scientific Inc., y se clonó en un vector pcDNA3.4. Además, el vector se introdujo en células CHO (EXPI-CHO™) para expresar una proteína de fusión de SEQ ID NO: 40. Después de introducir el vector, las células se cultivaron en un entorno de 37 °C, a 125 rpm y con CO<sub>2</sub> al 8 % durante 7 días y a continuación se recogieron para purificar un dímero de proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión purificado se denominó "hCD80-Fc".

La purificación se realizó usando cromatografía que incluía la resina de proteína A MabSelect SuRe. La proteína de fusión se unió en la condición de Tris 25 mM, NaCl 25 mM y a pH 7,4. A continuación, se eluyó con NaCl 100 mM y ácido acético 100 mM a pH 3. Después de poner el 20 % de Tris-HCl 1 M a pH 9 en un tubo de recolección, se recogió la proteína de fusión. La proteína de fusión recogida se dializó en un tampón PBS durante 16 horas hasta el cambio.

A continuación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en el tiempo usando cromatografía de exclusión por tamaño con la columna TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience) para obtener una alta concentración de proteína de fusión. En este momento, la proteína de fusión aislada y purificada se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR), y se tiñó con azul de Coomassie para confirmar su pureza (figura 2A). Como resultado, se confirmó que la proteína de fusión forma un dímero. Además, el resultado analizado usando cromatografía de exclusión por tamaño es como se muestra en la figura 2B.

#### Ejemplo de preparación 1. Preparación de un medio de cultivo de linfocitos citotóxicos naturales

Las composiciones de medios de cultivo de linfocitos citotóxicos naturales se prepararon añadiendo respectivamente sustancias correspondientes a las condiciones de adición 1 a 4 de la Tabla 5 a cada medio de cultivo basal que tenía la composición de la Tabla 1 a la Tabla 4 a continuación.

[Tabla 1]

Medio de cultivo basal 1				
Componentes	Fabricante	N.º de cat.	Dosis	Concentración final
RS (reemplazo sérico) de células inmunitarias CTS™	Thermo	A2596102	0,5 ml	5 %
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5 ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	añadir inmediatamente antes de usar	66,7 UI
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	añadir inmediatamente antes de usar	0,341 UI
Perlas anti CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biologend	317326		10 ng/ml
Medio AIM-V	GIBCO	0870112-DK	a 50 ml	

[Tabla 2]

Medio de cultivo basal 2				
Componentes	Fabricante	N.º de cat.	Dosis	Concentración final
Suero AB humano	Sigma	H4522	2,5 ml	5 %
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5 ml	1X

(continuación)

Medio de cultivo basal 2				
Componentes	Fabricante	N.º de cat.	Dosis	Concentración final
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	añadir inmediatamente antes de usar	66,7 UI
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	añadir inmediatamente antes de usar	0,341 UI
Perlas anti CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biologend	317326		10 ng/ml
Medio AIM-V	GIBCO	0870112-DK	a 50 ml	

[Tabla 3]

Medio de cultivo basal 3				
Componentes	Fabricante	N.º de cat.	Dosis	Concentración final
Suero AB humano	Sigma	H4522	2,5 ml	5 %
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5 ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	añadir inmediatamente antes de usar	66,7 UI
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	añadir inmediatamente antes de usar	0,341 UI
Perlas anti CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biologend	317326		10 ng/ml
Medio X-VIVO™ 15	Lonza	04-418Q	a 50 ml	

5

[Tabla 4]

Medio de cultivo basal 4				
Componentes	Fabricante	N.º de cat.	Dosis	Concentración final
Suero AB humano	Sigma	H4522	2,5 ml	5 %
Complemento NK MACS	Miltenyi Biotec	130-113-102	500 µl	1 %
Perlas anti CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biologend	317326		10 ng/ml
Medio NK MACS		130-112-968	a 50 ml	

[Tabla 5]

Adición de material				
Clasificación	Componentes	Fabricante	Dosis	Concentración final
Condición de adición 1	GI-101	GI-Innovation	añadir inmediatamente antes de usar	1,6 nM/50 nM
Condición de adición 2	GI-101 TS	GI-Cell	añadir inmediatamente antes de usar	1,6 nM/50 nM
Condición de adición 3	CD80-Fc+Fc-IL2WT	GI-Cell	añadir inmediatamente antes de usar	CD80-Fc(1,6 nM)+Fc-IL2WT(1,6 nM)/ CD80-Fc(50 nM)+Fc-IL2WT(50 nM)
Condición de adición 4	CD80-Fc+Fc-IL2v2	GI-Cell	añadir inmediatamente antes de usar	CD80-Fc(1,6 nM)+Fc-IL2v2(1,6 nM)/CD80-Fc(50 nM)+Fc-IL2v2(50 nM)

10 **Ejemplo 1. Preparación de linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+) procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

15 Para obtener células CD3(-), el número de PBMC (células mononucleares de sangre periférica, Zen-Bio. Inc, NC 27709, EE. UU., N.º de cat.: SER-PBMC-200-F) se contó usando un contador de células automático ADAM-MC2 (NanoEnTek, adquirido a Cosmo Genetech Co., Ltd.). Las PBMC se transfirieron a un tubo nuevo y a continuación se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. Se incluyeron de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 % (v/v) y EDTA a una concentración de 2 mM en PBS para preparar el tampón MACS (pH 7,2). Después de completar la centrifugación, se trató un sedimento celular con 80 µl de tampón MACs y 20 µl de perlas magnéticas CD3 (Miltenyi Biotec, 130-050-101) por 1 x 10<sup>7</sup> células para suspenderlo y, a continuación, se incubó a una temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Se añadieron 10 ml de tampón MACs para el lavado y se centrifugaron a 20 300 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y, a continuación, el sedimento celular se suspendió de nuevo en 0,5 ml de tampón MACs.

En primer lugar se vertieron 2 ml de tampón MACs en la columna LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania, N.º de cat.: 130-042-901) y, a continuación, se hizo fluir la suspensión celular. A continuación, se obtuvieron las células CD3(-) que pasaron por la columna LD. En este momento, las células CD3(-) se obtuvieron haciendo fluir 2 ml de tampón MACs tres veces para que las células que quedaban en la columna LD pudieran separarse lo suficiente. Las células CD3(-) obtenidas se contaron usando un contador de células, a continuación se colocaron en un tubo nuevo y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. A continuación, el sobrenadante se eliminó y a continuación se añadieron 80 µl de tampón MACs y 20 µl de perlas magnéticas CD56 (Miltenyi biotech, N.º de Cat.: 130-050-401) por  $1 \times 10^7$  células, seguido de una incubación a una temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Se añadieron 10 ml de tampón MACs para el lavado y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y, a continuación, el sedimento celular se suspendió de nuevo en 0,5 ml de tampón MACs.

En primer lugar se vertieron 3 ml de tampón MACs en la columna LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania, N.º de cat.: 130-042-901) y, a continuación, se hizo fluir la suspensión celular. En este momento, se hicieron fluir 2 ml de tampón MACs tres veces para que las células que quedaban en la columna LS pudieran separarse lo suficiente. A continuación, después de que la columna LS se separase de un soporte magnético, se añadieron 5 ml de tampón MACs y se aplicó presión con un pistón para obtener linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+). Los linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+) obtenidos se pusieron en un tubo nuevo y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante, las células se suspendieron en los medios de cultivo basales que se muestran en la Tabla 1 a la Tabla 4 teniendo en cuenta las condiciones de cultivo. El número de células suspendidas se contó usando un contador de células.

### **Ejemplo 2. Cultivo de linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+) procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

100 µl de CD335 (NKp46)-biotina y 100 µl de CD2-biotina incluidos en un kit de activación/expansión de linfocitos NK (N.º de cat.: 130-112-968) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) se pusieron en un microtubo de 1,5 ml y se mezclaron, a continuación se añadieron 500 µl de partículas MACSiBead anti biotina y se mezclaron. A continuación, se añadieron 300 µl de tampón MACs y se mezclaron a razón de 2 °C a 8 °C durante 2 horas usando un rotador de microtubos. Teniendo en cuenta el número de células, se transfirieron 5 µl de perlas de activación de NK por  $1 \times 10^6$  células a un nuevo tubo. Se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, el medio NK MACs (N.º de cat.: 130-094-483) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a usar se añadió en función de 5 µl por  $10^6$  linfocitos NK, y se liberaron las perlas, seguido de la inoculación en los linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+) aislados en el Ejemplo 1.

A continuación, los linfocitos citotóxicos naturales CD3(-)CD56(+) preparados se suspendieron en una composición de medio de cultivo que contenía un aditivo preparado en el Ejemplo de preparación 1 de modo que el número total de células fuera  $2,5 \times 10^5$ , y se sembraron en una placa de 48 pocillos, seguido de un cultivo en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación, el número de células se determinó cada 2 días para realizar un subcultivo en el orden de una placa de 48 pocillos, una placa de 24 pocillos, una placa de 12 pocillos, una placa de 6 pocillos y un matraz 25T cuando las células tenían una confluencia del 80 % o más del recipiente de cultivo (confluencia), y finalmente todas las células se recogieron el día 21.

### **Ejemplo 3. Recuento del número de células y comparación de la viabilidad celular**

El número total de células y la viabilidad de los linfocitos citotóxicos naturales cultivados se contaron usando un contador de células (ADAM-MC2) los días 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 21. En este momento, se contó el número de células en las fechas anteriores a medida que las células alcanzan el 80 % de confluencia, lo que es un criterio para el subcultivo porque la tasa de proliferación de las células varía según el material tratado y el tipo de medio de cultivo.

Los resultados de la comparación del número total de células y la viabilidad de las células CD3-CD56+ cultivadas en las condiciones de la composición del medio de cultivo preparada en el Ejemplo de preparación 1 se muestran en las Tablas 6 a 13 y en las figuras 5A a 12B.

Como resultado, se confirmó que todas las composiciones de medio de cultivo a las que se añadió GI-101 preparado mediante el Ejemplo de preparación 1 tenían un número total de linfocitos citotóxicos naturales mayor que el grupo de control (adición de CD80-Fc+Fc-IL2v2 o CD80-Fc+Fc-IL2WT), independientemente de la concentración de tratamiento en cuatro condiciones de medio de cultivo basal (Tablas 1 a 4) (figuras 5A, 5B, 7A, 7B, 9A, 9B, 11A y 11B).

Además, incluso para la viabilidad celular, cuando se añadió GI-101, todas las composiciones de medio de cultivo exhibieron una alta viabilidad independientemente del medio de cultivo basal y la concentración (figuras 6A, 6B, 8A, 8B, 10A, 10B, 12A y 12B).

Basándose en los resultados, se confirmó que GI-101 desempeña una función importante en la mejora de la capacidad de proliferación y la viabilidad de los linfocitos citotóxicos naturales en comparación con el grupo de control (adición de CD80-Fc+Fc-IL2v2 o CD80-Fc+Fc-IL2WT), independientemente del medio de cultivo basal y la concentración.

[Tabla 6]

NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (x 10 <sup>5</sup> )										
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+							
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21
Tabla 1	50 nM	GI-101	2,50	3,17	8,56	-	23,84	-	27,38	23,76
		GI-101WT	2,50	2,36	6,40	-	-	-	15,45	13,33
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	2,62	6,61	-	16,16	-	21,93	13,19
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	1,87	-	11,04	13,92	-	17,86	13,33
	1,6 nM	GI-101	2,50	2,27	6,79	-	13,98	-	15,62	11,19
		GI-101WT	2,50	1,92	4,65	-	-	-	-	3,58
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	0,23	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	1,76	-	-	6,96	-	6,64	4,46

{Tabla 7}

		VIABILIDAD CELULAR (%)													
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+												
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21					
Tabla 1	50 nM	GI-101	-	76,58	82,41	-	90,94	-	86,68	84,19					
		GI-101WT	-	75,98	83,42	-	-	-	89,27	89,53					
		CD80-Fc+Fc-IL2Y2	-	78,18	81,73	-	90,57	-	88,76	89,64					
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	83,64	-	86,50	92,19	-	89,52	82,36					
Tabla 1	1,6 nM	GI-101	-	75,08	82,94	-	87,85	-	90,34	88,22					
		GI-101WT	-	77,55	82,32	-	-	-	-	87,01					
		CD80-Fc+Fc-IL2Y2	-	49,77	-	-	-	-	-	-					
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	74,51	-	-	86,47	-	88,90	93,29					

[Tabla 8]

NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (x 10 <sup>7</sup> )												
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+									
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21		
Tabla 2	50 nM	GI-101	2.5	11,71	38,81	-	214,88	415,25	-	-	694,59	
		GI-101WT	2.5	8,57	30,58	62,31	96,42	-	-	-	152,16	
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	2.5	8,12	-	-	90,54	122,27	-	-	153,14	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.5	7,80	29,97	-	92,32	118,56	-	-	152,23	
	1,6 nM	GI-101	2.5	5,60	28,69	-	55,39	-	-	-	94,22	
		GI-101WT	2.5	6,58	14,92	-	35,18	-	-	-	37,81	
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	2.5	6,02	19,85	-	56,26	-	-	-	75,83	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.5	6,04	18,39	-	46,50	-	-	-	55,51	

[Tabla 9]

VIABILIDAD CELULAR (%)

Condición de cultivo	Conc.	Material tratado	Células CD3-CD56+											
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21				
Tabla 2	50 nM	GI-101	-	93,31	95,64	-	96,47	96,58	-	-	93,21			
		GI-101WT	-	94,38	95,45	96,06	94,96	-	-	92,14				
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	-	93,32	-	-	97,01	95,96	-	91,73				
	1.6 nM	CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91,51	96,49	-	96,19	95,23	-	91,81				
		GI-101	-	91,81	93,75	-	95,14	-	-	85,22				
		GI-101WT	-	93,56	93,56	-	94,81	-	-	88,63				
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	-	93,57	94,00	-	94,36	-	-	89,53				
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	90,87	94,04	-	95,01	-	-	87,36				

[Tabla 10]

NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (x 10 <sup>3</sup> )												
Condición de cultivo	Conc.	Materia aplicado	Células CD3-CD56+									
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21		
Tabla 3	50 nM	Gl-101	2,50	6,07	24,64	-	46,13	61,25	-	99,60		
		Gl-101WT	2,50	6,98	24,90	-	49,75	64,15	-	67,71		
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	4,11	-	21,60	-	-	-	-	56,02	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	5,73	23,52	-	51,17	66,32	-	76,19		
	1,6 nM	Gl-101	2,50	6,47	25,14	-	54,13	69,59	-	86,68		
		Gl-101WT	2,50	3,34	-	-	-	-	-	10,91		
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	1,07	-	-	-	-	-	-		
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	4,61	13,16	-	16,27	-	-	13,16		

{Tabla 11}

		VIABILIDAD CELULAR (%)													
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+												
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21					
Tabla 3	50 nM	GI-101	-	89,72	90,65	-	90,59	88,11	-	82,08					
		GI-101WT	-	90,74	92,95	-	93,20	90,52	-	87,38					
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	-	87,57	-	88,80	-	-	-	87,63					
	1,6 nM	CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88,60	93,44	-	95,13	94,99	-	91,38					
		GI-101	-	90,07	92,11	-	92,64	90,80	-	85,62					
		GI-101WT	-	85,76	-	-	-	-	-	75,98					
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	-	66,33	-	-	-	-	-						
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88,05	90,17	-	89,08	-	-	79,81					

{Tabla 12}

NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (x 10 <sup>3</sup> )												
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+									
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21		
Tabla 4	50 nM	Gi-101	2.50	6.31	37.36	58.21	-	146.76	-	467.75		
		Gi-101WT	2.50	5.74	30.24	52.00	-	126.99	-	347.59		
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	2.50	6.96	31.20	51.52	-	130.65	-	285.63		
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	6.30	35.52	50.08	-	147.54	-	350.28		
	1,6 nM	Gi-101	2.50	6.75	37.28	63.68	-	166.42	-	419.02		
		Gi-101WT	2.50	2.46	-	8.08	9.84	-	-	8.93		
		CD80-Fc+Fc-IL2V2	2.50	0.73	-	-	-	-	-	-		
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	3.86	18.85	-	48.90	67.86	-	134.21		

[Tabla 13]

VIABILIDAD CELULAR (%)												
Condición de cultivo	Conc.	Material aplicado	Células CD3-CD56+									
			DÍA 0 (siembra)	DÍA 5	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 21		
Tabla 4	50 nM	GI-101	-	94.72	96.93	97.24	-	96.20	-	96.04		
		GI-101WT	-	94.90	96.79	96.11	-	63.11	-	64.73		
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	95.33	97.83	96.70	-	95.73	-	96.43		
	1,6 nM	CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	95.99	97.86	97.52	-	97.09	-	96.39		
		GI-101	-	94.75	97.72	96.89	-	94.67	-	95.00		
		GI-101WT	-	89.00	-	88.06	-	-	-	88.22		
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	75.94	-	-	-	-	-			
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91.40	96.61	-	96.49	-	95.99			

## II. Caracterización de linfocitos citolíticos naturales usando una composición de cultivo de linfocitos citolíticos naturales

### Ejemplo 4. Medición de la pureza de los linfocitos citolíticos naturales

5 Los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ obtenidos a partir del Ejemplo 2 se centrifugaron respectivamente a 300 x g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante, y se añadió 1 ml de tampón FACS para liberar el sedimento. A continuación, se añadieron FBS al 3 % (v/v), EDTA 10 mM, HEPES 20 mM, 10 µg/ml de polimixina B, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y piruvato de sodio 1 mM a PBS para preparar el tampón FACS, y se añadió  
10 1 ml del tampón FACS preparado para suspender de nuevo el sedimento celular. A continuación, se diluyó con tampón FACS a razón de  $2 \times 10^6$  células/ml usando un contador de células.

Se añadieron 100 µl de la solución celular diluida a cada uno de un tubo FACS de 5 ml y se añadieron 100 µl de tampón FACS, seguido del tratamiento con un anticuerpo anti CD3 humano marcado con PerCP (anti CD3 humano PerCP (clon UCHT1)) y un anticuerpo anti CD56 humano marcado con PE/cy7 (anti CD56 humano PE/cy7 (clon B159)). A continuación, después de la incubación a 4 °C durante 20 minutos, se añadieron 200 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 200 µl de tampón FACS para la suspensión y, a continuación, se determinó el fenotipo de las células usando un citómetro de flujo (CYTEK® Aurora, Cytex, Fremont, CA, EE. UU.).  
15 20

La información sobre los anticuerpos usados en el experimento se muestra en la Tabla 14. Además, las purezas de los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ cultivados durante 21 días en las condiciones de las composiciones de medio de cultivo preparadas en el Ejemplo de preparación 1 se midieron y se muestran en las figuras 13 a 16.

25

[Tabla 14]

	Diana	Color	Clon	Productor	N.º de cat.
Marcador NK	CD3	PerCP	UCHT1	BioLegend	300428
	CD56	APC/cy7	5.1H11	BioLegend	362512

### Ejemplo 5. Identificación de marcadores de activación e inhibición para linfocitos citolíticos naturales

30 Los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ obtenidos a partir del Ejemplo 2 se centrifugaron respectivamente a 300 x g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante, y se añadió 1 ml de tampón FACS para liberar el sedimento.

Se añadieron FBS al 3 % (v/v), EDTA 10 mM, HEPES 20 mM, 10 µg/ml de polimixina B, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y piruvato de sodio 1 mM a PBS para preparar el tampón FACS, y se añadió 1 ml del tampón FACS preparado para suspender de nuevo el sedimento celular. A continuación, se diluyó con tampón FACS a razón de  $2 \times 10^6$  células/ml usando un contador de células. Se añadieron 100 µl de la solución celular diluida a cada uno de un tubo FACS de 5 ml y se confirmaron usando un anticuerpo anti CD16 humano marcado con Pe-CF594 (anti CD16 humano PE-CF594 (clon 3G8)), anticuerpo anti DNAM1 humano marcado con APC (anti DNAM1 humano APC (clon 11A8)), anticuerpo anti NKG2C humano marcado con BV605 (anti NKG2C humano BV605 (clon 134591)), anticuerpo anti NKG2D humano marcado con BV650 (anti NKG2D humano BV650 (clon 1D11)), anticuerpo anti NKp46 humano marcado con BB515 (anti NKp46 humano BB515 (clon 9E2)), anticuerpo anti NKp30 humano marcado con BV480 (anti NKp30 humano marcado con BV480 (clon p30-15)), anticuerpo anti PD-1 humano marcado con PE (anti PD-1 humano PE (clon EH12.2H7)) y anticuerpo anti NKG2A humano marcado con APC (anti NKG2A humano APC (clon 131411)), usando un citómetro de flujo. A continuación, después de la incubación a 4 °C durante 20 minutos, se añadieron 100 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos.  
35 40 45

El sobrenadante se eliminó y se añadieron 200 µl de tampón FACS para la suspensión y, a continuación, se determinó el fenotipo de las células usando un citómetro de flujo (CYTEK® Aurora, Cytex, Fremont, CA, EE. UU.). La información de los anticuerpos usados en el experimento se muestra en la Tabla 15. Los marcadores de activación e inhibición para los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ cultivados durante 21 días en las condiciones de las composiciones de medio de cultivo preparadas en el Ejemplo de preparación 1 se identificaron y se muestran en las figuras 17 a 24.  
50

[Tabla 15]

	Diana	Color	Clon	Productor	N.º de cat.
Marcador de activación	CD16	PE-CF594	3G8	BD	562293
	DNAM1	APC	11A8	BioLegend	338312
	NKp46	BB515	9E2	BD	564536
	NKp30	BV480	p30-15	BD	746491
Marcador de inhibición	PD-1	PE	EH12.2H7	BioLegend	329906
	NKG2A	APC	131411	R&D systems	FAB1059A-100

### Ejemplo 6. Determinación de la capacidad secretora de granzima B, perforina e interferón gamma de los linfocitos citolíticos naturales

55

Para determinar la capacidad secretora de granzima B y perforina de los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ obtenidos a partir del Ejemplo 2, se midió la cantidad de expresión de granzima B, perforina e interferón gamma en los linfocitos citolíticos naturales mediante tinción intracelular. Los linfocitos citolíticos naturales cultivados se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se eliminó. A continuación, se diluyó con cada composición de cultivo a razón de 2 x 10<sup>6</sup> células/ml usando un contador de células.

Se dispensaron 200 µl de las células preparadas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y a continuación se añadió cóctel de estimulación (1x) al 1 % (v/v) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se incubó a 37 °C, en condiciones de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación, las placas se centrifugaron en condiciones de 300 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se eliminó. A continuación, se añadieron FBS al 3 % (v/v), EDTA 10 mM, HEPES 20 mM, 10 µg/ml de polimixina B, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y piruvato de sodio 1 mM a PBS para preparar el tampón FACS, y se añadieron 100 µl de tampón FACS preparado para suspender de nuevo el sedimento celular. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 100 µl de tampón BD CYTOFIX/CYTOPERM™ (tampón de permeación/fijación, BD science) para la fijación y la permeación y a continuación se suspendió, seguido de incubación a 4 °C durante 30 minutos. Se añadieron 100 µl más de tampón FACS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos.

Se trataron un anticuerpo anti granzima B humana marcado con PE/cy7 (anti granzima B humana PE/cy7 (clon NGZB)), un anticuerpo anti perforina humana marcado con APC (anti perforina humana APC (clon B-D48)) y un anticuerpo anti interferón gamma humano marcado con BV421 (anti IFN-gamma humano BV421 (clon B27)). A continuación, después de la incubación a 4 °C durante 20 minutos, se añadieron 100 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos. Después de eliminar el sobrenadante y añadir 200 µl de tampón FACS (tampón de fijación) a la suspensión, se determinó la cantidad de expresión de las células usando un citómetro de flujo.

La información de los anticuerpos usados en el experimento se muestra en la Tabla 16. Los marcadores para los linfocitos citolíticos naturales CD3-CD56+ cultivados durante 21 días en las condiciones de las composiciones de medio de cultivo preparadas en el Ejemplo de preparación 1 se identificaron y se muestran en las figuras 25 a 28.

[Tabla 16]

	Diana	Color	Clon	Productor	N.º de cat.
Citotoxicidad	Perforina	APC	B-D48	BioLegend	353312
	IFN-γ	BV421	B27	BioLegend	506538
	Granzima B (GB11)	PE/cy7	NGZB	ebioscience	25-8898-82

### III. Análisis de la capacidad de destrucción de células neoplásicas de los linfocitos citolíticos naturales de acuerdo con una composición de cultivo

#### Ejemplo 8. Confirmación de la capacidad de desgranulación y el efecto de destrucción de los linfocitos citolíticos naturales contra las células neoplásicas

Específicamente, una línea de células cancerosas K562 (Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) se diluyó en PBS hasta obtener la cantidad de células que se muestra en la Tabla 17 a continuación y se distribuyó en cada pocillo.

[Tabla 17]

E:D	1:1	1:5	1:10
(E) Linfocitos NK	2,5 x 10 <sup>5</sup> células	1 x 10 <sup>5</sup> células	1 x 10 <sup>5</sup> células
(D) K562	2,5 x 10 <sup>5</sup> células	5 x 10 <sup>5</sup> células	1 x 10 <sup>6</sup> células

Específicamente, una línea de células cancerosas K562 se diluyó con cada composición de cultivo a razón de 1 x 10<sup>7</sup> células/ml y a continuación se distribuyó de acuerdo con el número de células especificado en la tabla anterior para cada pocillo. A continuación, los linfocitos citolíticos naturales también se diluyeron con cada composición de cultivo a razón de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml, a continuación se distribuyeron de acuerdo con el número de células especificado en la tabla anterior para cada pocillo y se centrifugaron a 30 x g durante 3 minutos. A continuación, después de un cultivo a 37 °C, en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 4 horas, se trataron un anticuerpo anti CD3 humano marcado con BV421 (anti CD3 humano BV421 (clon UCHT1)), un anticuerpo anti CD16 humano marcado con PE (anti CD16 humano PE (clon 3G8)), un anticuerpo anti CD56 humano marcado con PE/cy7 (anti CD56 humano PE/cy7 (clon B159)) y un anticuerpo anti CD107a humano marcado con FITC (anti CD107a humano FITC (clon H4A3)) y se incubaron en hielo durante 20 minutos.

A continuación, se añadieron 100 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 1.300 rpm, en condiciones de 4 °C durante 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, la solución de tinción de viabilidad 7-AAD se trató y la luz se bloqueó para que reaccionara a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 1.300 rpm, en condiciones de 4 °C durante 5 minutos. Se añadieron de nuevo 200 µl de

## ES 2 997 310 T3

tampón FACS y se centrifugaron a 1.300 rpm, en condiciones de 4 °C durante 5 minutos. Después de repetir el proceso anterior una vez más, el sobrenadante se eliminó y se añadieron 400 µl de tampón FACS, seguido del análisis usando un citómetro de flujo (CYTEL® Aurora, Cytex, Fremont, CA, EE. UU.).

- 5 La capacidad de desgranulación y el efecto de destrucción de los linfocitos citolíticos naturales cultivados durante 21 días en una composición en la que se añadieron 50 nM del aditivo de la Tabla 5 al medio de cultivo basal de las Tablas 1 a 4, respectivamente, se muestran en las figuras 29 a 34.

REIVINDICACIONES

1. Un uso de una composición para cultivar *in vitro* un linfocito citolítico natural aislada sin células CD3+ o CD56-, comprendiendo la composición como principio activo un dímero de proteína de fusión que comprende una variante de IL-2 y un fragmento de CD80,

en donde la proteína de fusión comprende las siguientes fórmulas estructurales (I) o (II):

$N'-X-[\text{enlazador (1)}]_n\text{-dominio Fc-}[\text{enlazador (2)}]_m\text{-Y-C'}$  - fórmula (I)

$N'-Y-[\text{enlazador (1)}]_n\text{-dominio Fc-}[\text{enlazador (2)}]_m\text{-X-C'}$  - fórmula (II),

en donde, N' es el extremo N de la proteína de fusión,  
 C' es el extremo C de la proteína de fusión,  
 X es el fragmento de CD80,  
 Y es la variante de IL-2,  
 los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos, y  
 n y m son cada uno independientemente 0 o 1,

en donde la variante de IL-2 comprende una sustitución de los aminoácidos 38 y 42 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,  
 en donde el fragmento de CD80 comprende el dominio extracelular de CD80.

2. El uso de la composición de la reivindicación 1, en donde la variante de IL-2 comprende además una sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos 45, 61 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

3. El uso de la composición de la reivindicación 1, en donde la variante de IL-2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

4. El uso de la composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento de CD80 consiste en los aminoácidos 35 a 242 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

5. El uso de la composición de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

6. Un método para cultivar *in vitro* un linfocito citolítico natural, que comprende:  
 cultivar los linfocitos NK aislados sin células CD3+ o CD56- en presencia de un dímero de proteína de fusión que comprende una variante de IL-2 y un fragmento de CD80,

en donde la proteína de fusión comprende las siguientes fórmulas estructurales (I) o (II):

$N'-X-[\text{enlazador (1)}]_n\text{-dominio Fc-}[\text{enlazador (2)}]_m\text{-Y-C'}$  - fórmula (I)

$N'-Y-[\text{enlazador (1)}]_n\text{-dominio Fc-}[\text{enlazador (2)}]_m\text{-X-C'}$  - fórmula (II),

en donde, N' es el extremo N de la proteína de fusión,  
 C' es el extremo C de la proteína de fusión,  
 X es el fragmento de CD80,  
 Y es la variante de IL-2,  
 los enlazadores (1) y (2) son enlazadores peptídicos, y  
 n y m son cada uno independientemente 0 o 1,

en donde la variante de IL-2 comprende una sustitución de los aminoácidos 38 y 42 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,  
 en donde el fragmento de CD80 comprende el dominio extracelular de CD80.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el período de cultivo en la etapa de cultivo es de 5 días a 25 días.

8. El método de la reivindicación 6, en donde la variante de IL-2 comprende además una sustitución de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos 45, 61 y 72 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

FIG. 1A

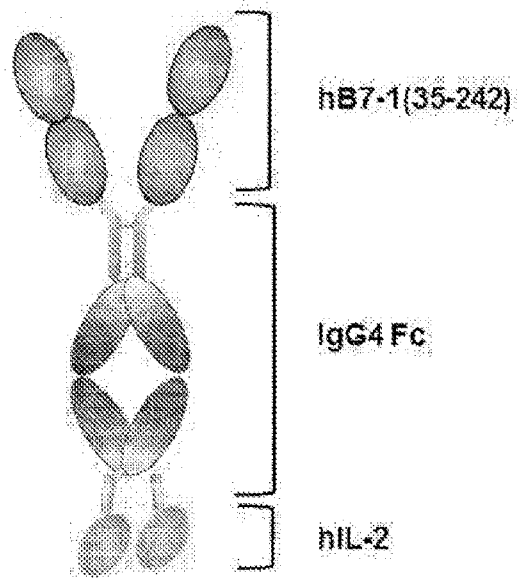


FIG. 1B

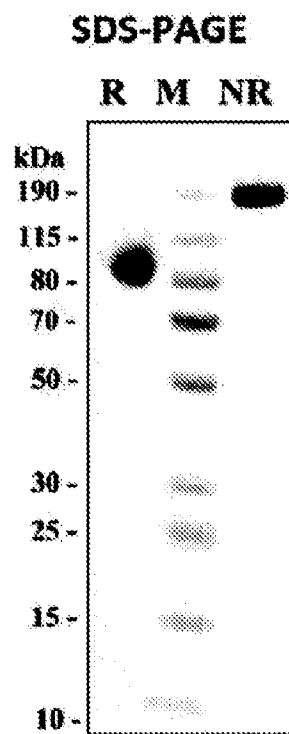


FIG. 1C

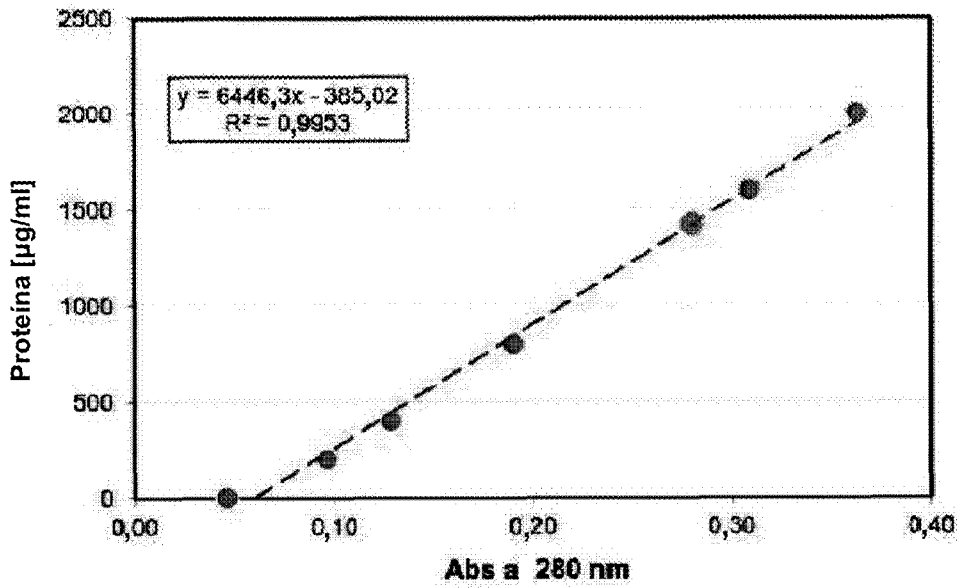


FIG. 1D

### Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica

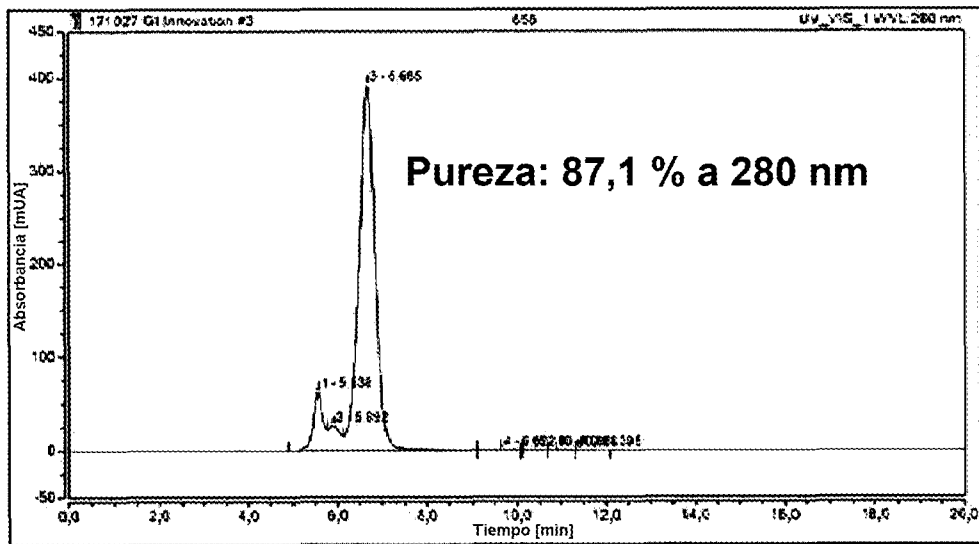
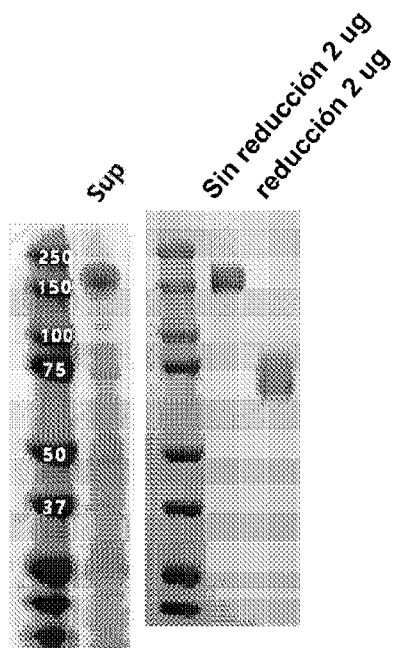
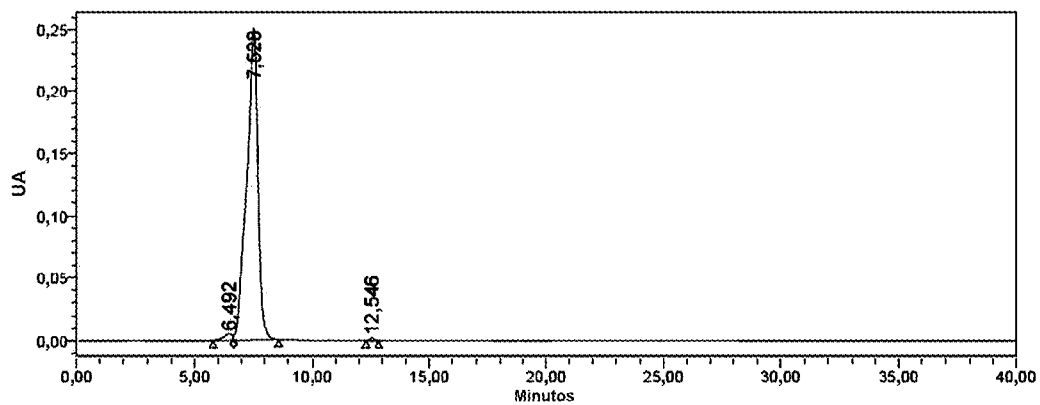


FIG. 2A



Tamaño esperado  
(kDa)  
monómero: 50,5  
Dímero: 101

FIG. 2B



	TR	Área	% de área	Altura
1	6,492	143663	1,66	5185
2	7,528	8497629	98,06	250509
3	12,546	24077	0,28	2005

FIG. 3A

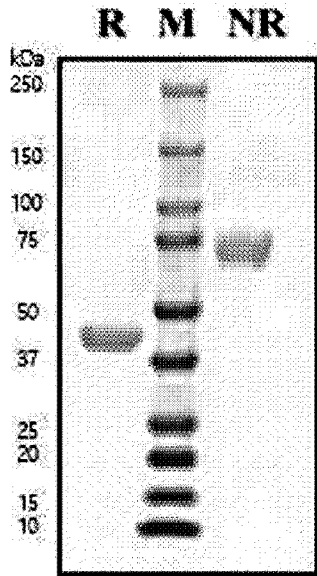
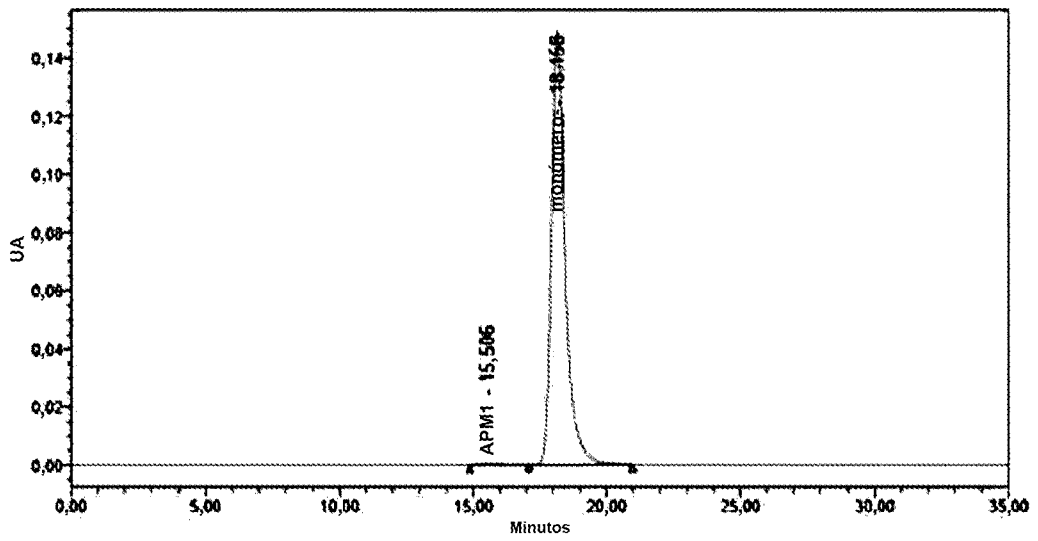
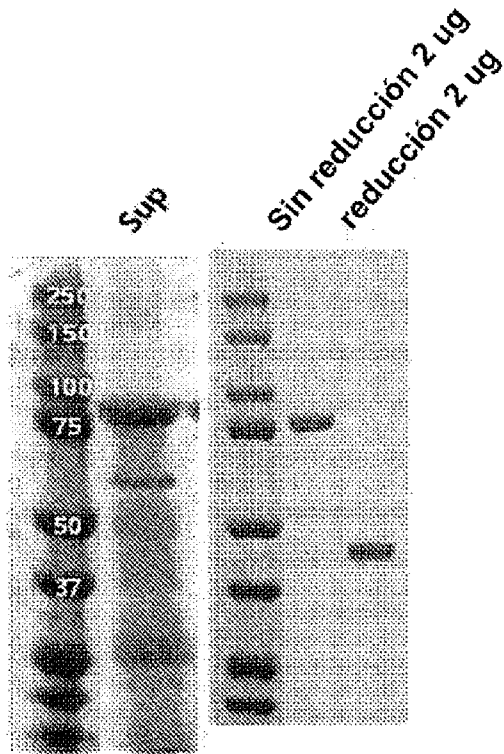


FIG. 3B



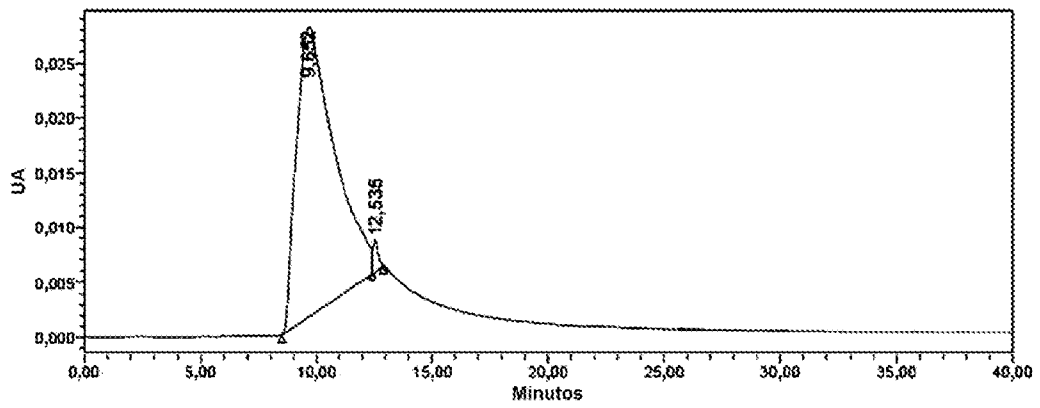
	Nombre del pico	TR	Área	% de área	Altura
1	HMW1	15,506	28137	0,52	426
2	Monomer	18,158	5363386	99,48	148945

FIG. 3C



Tamaño esperado (kDa)  
 monómero: 41,3  
 Dímero: 82,6

FIG. 3D



	TR	Área	% de área	Altura
1	9,652	2996084	98,41	26478
2	12,535	48430	1,59	2882

FIG. 4A

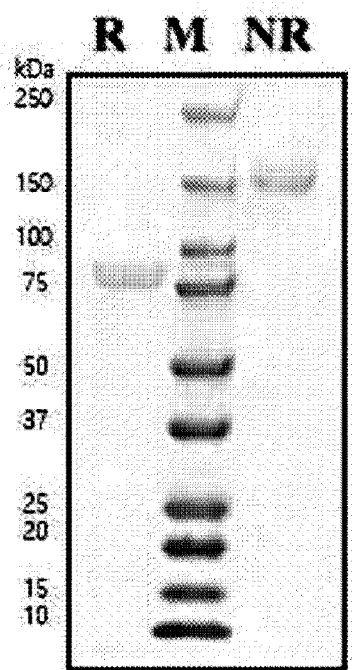
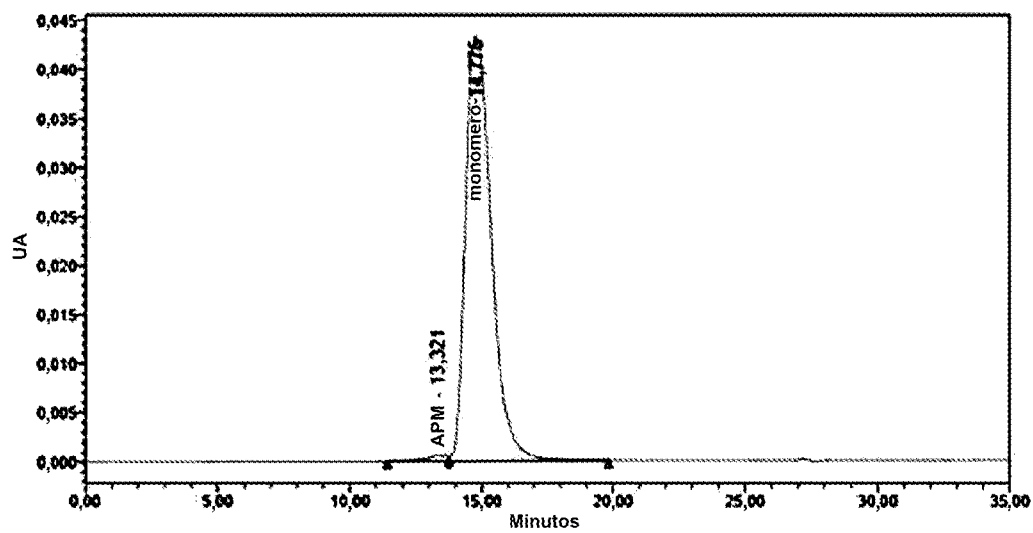


FIG. 4B



	Nombre del pico	TR	Área	% de área	Altura
1	APM	13,321	33675	1,13	625
2	monómero	14,775	2952831	98,87	43291

FIG. 5A

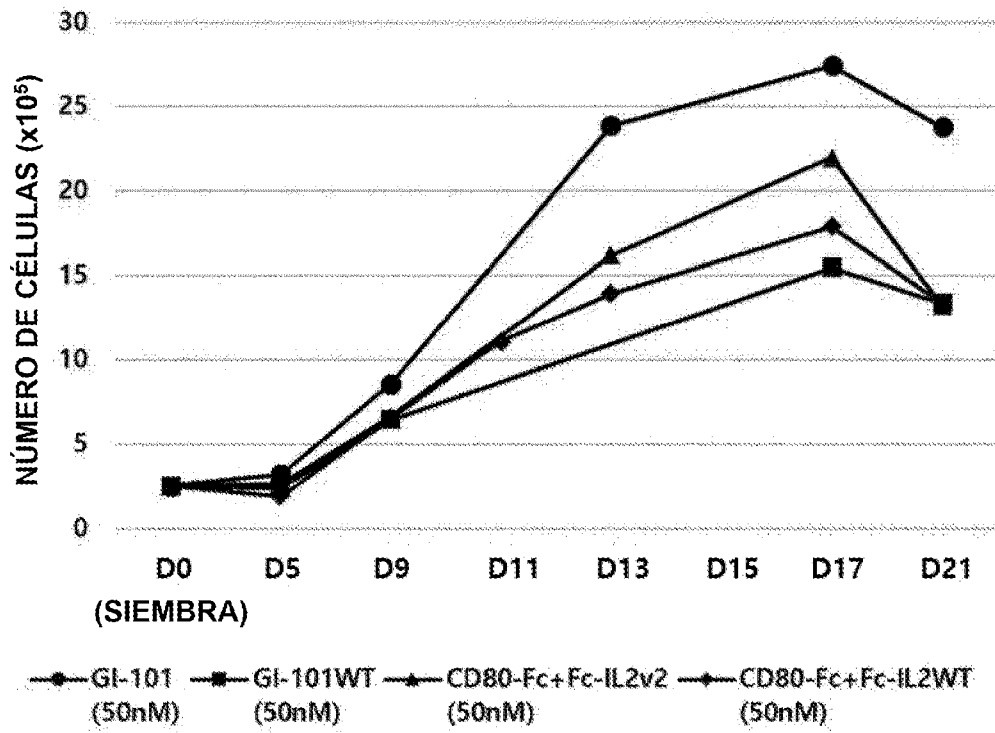


FIG. 5B

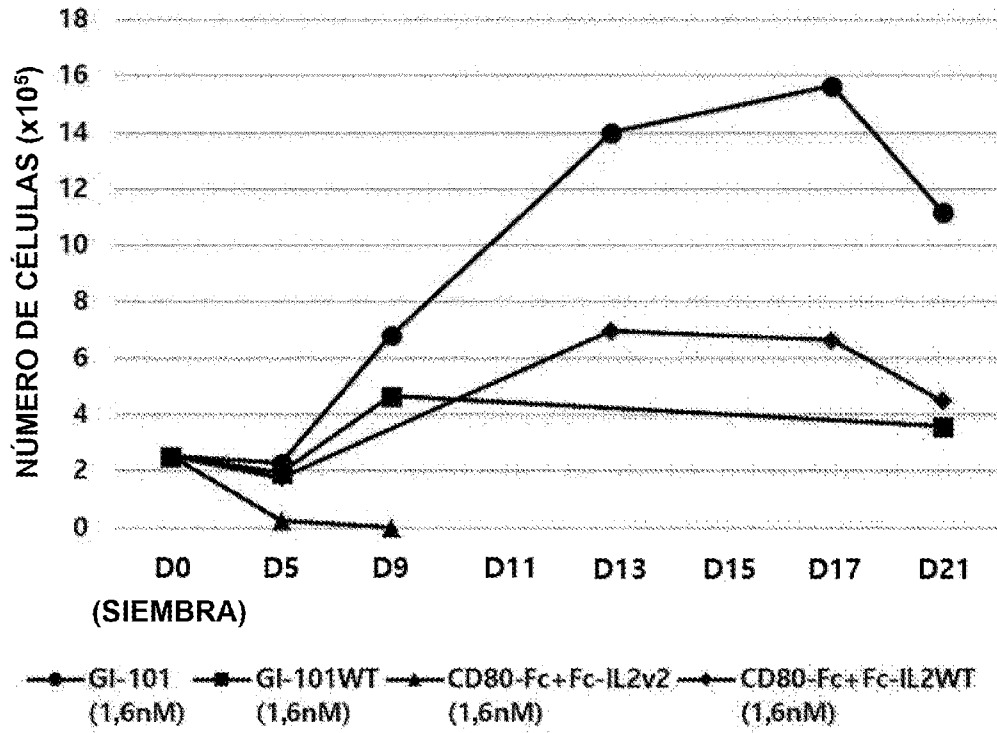


FIG. 6A

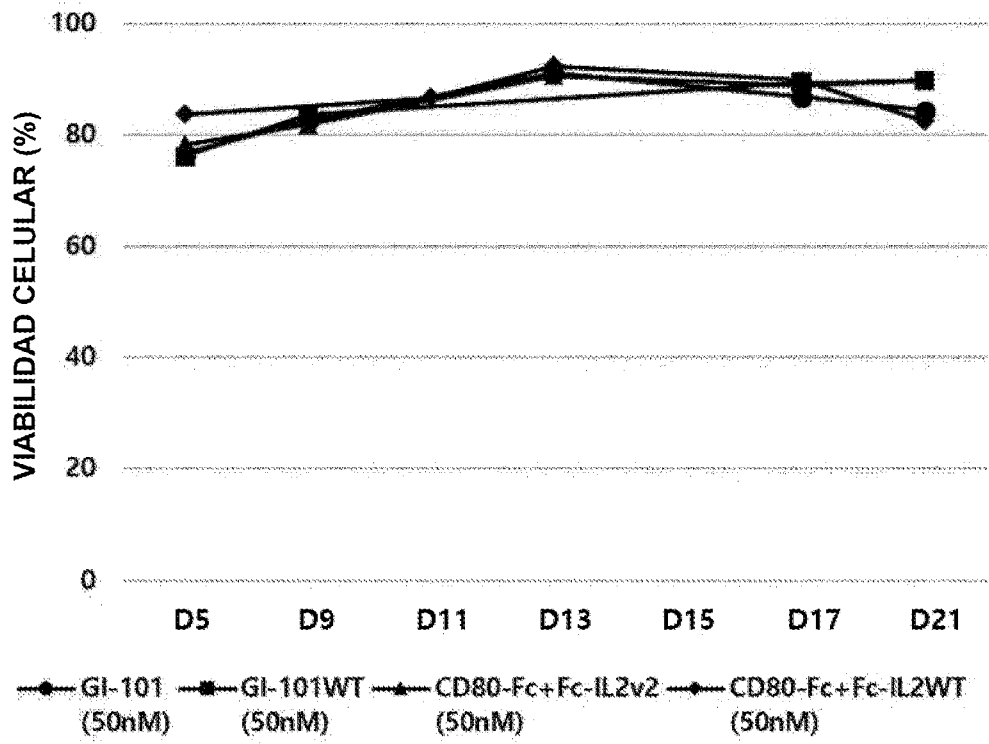


FIG. 6B

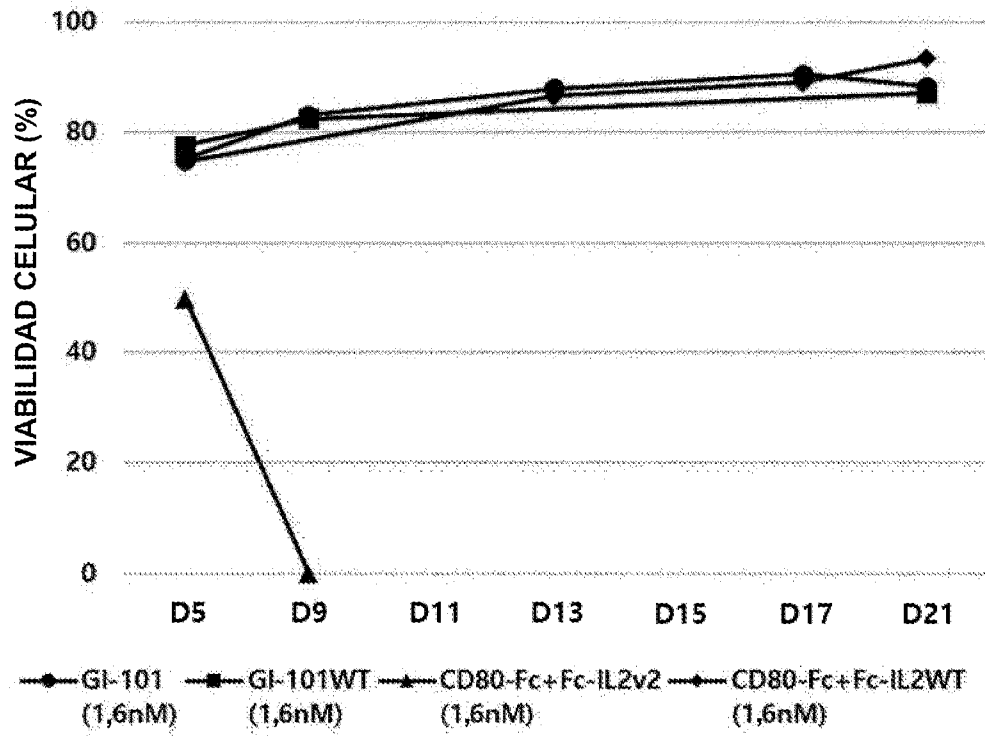


FIG. 7A

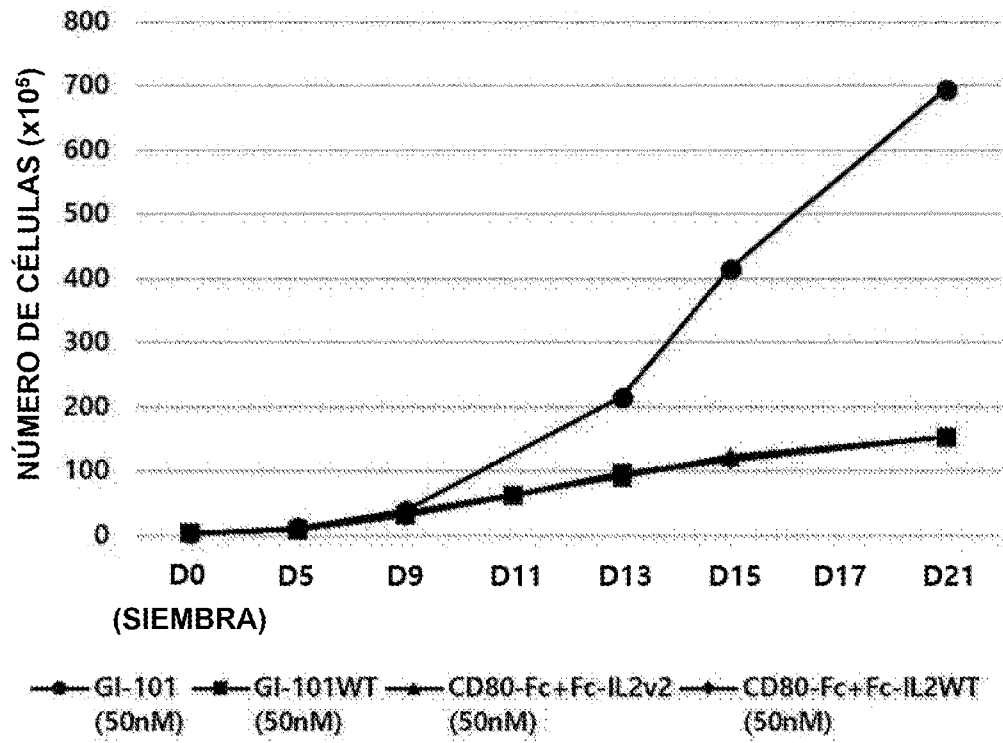


FIG. 7B

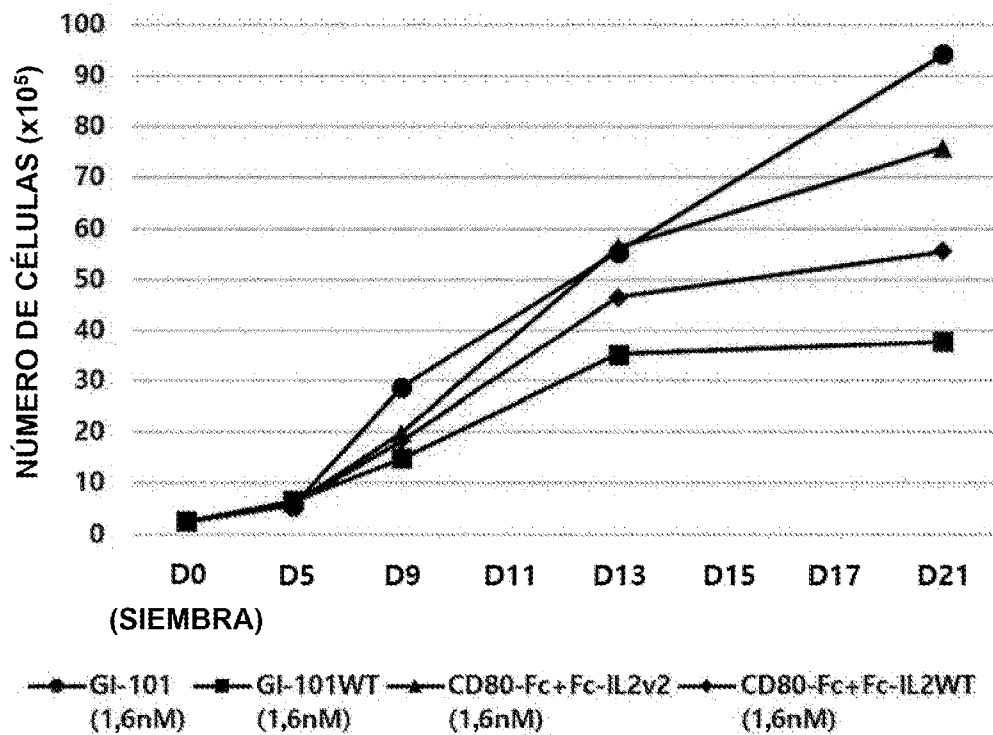


FIG. 8A

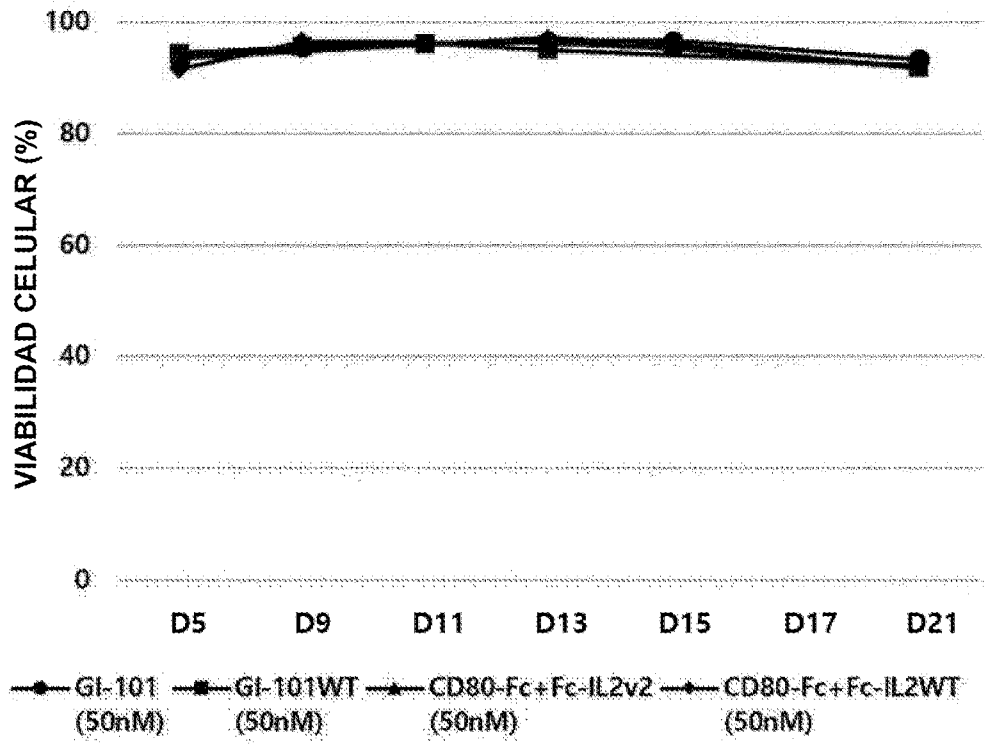


FIG. 8B

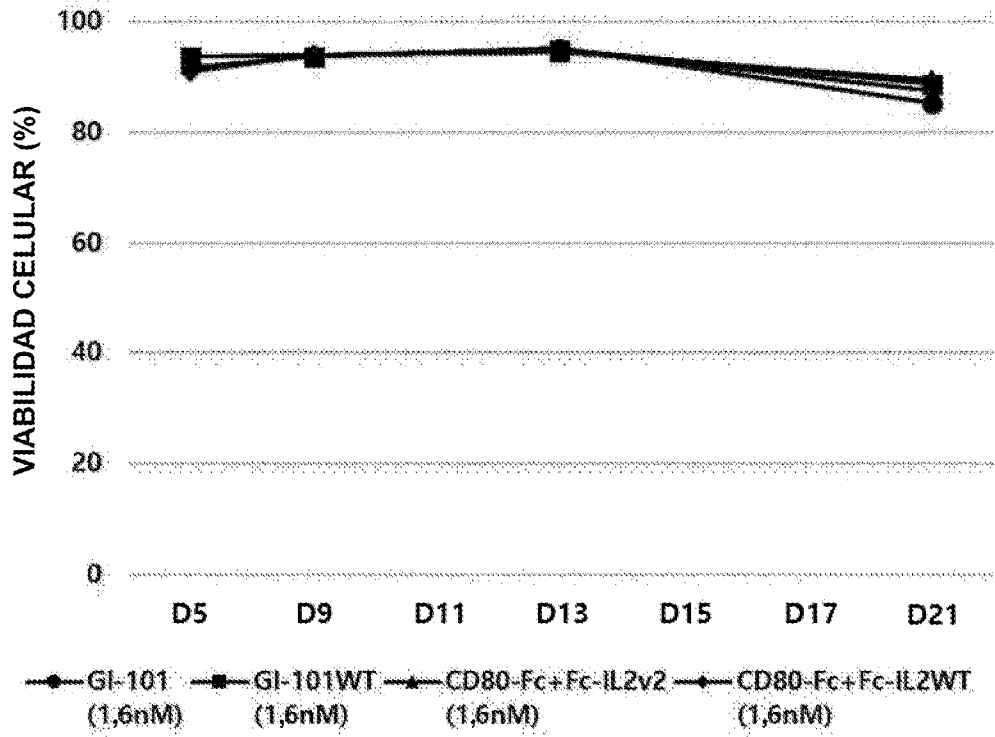


FIG. 9A

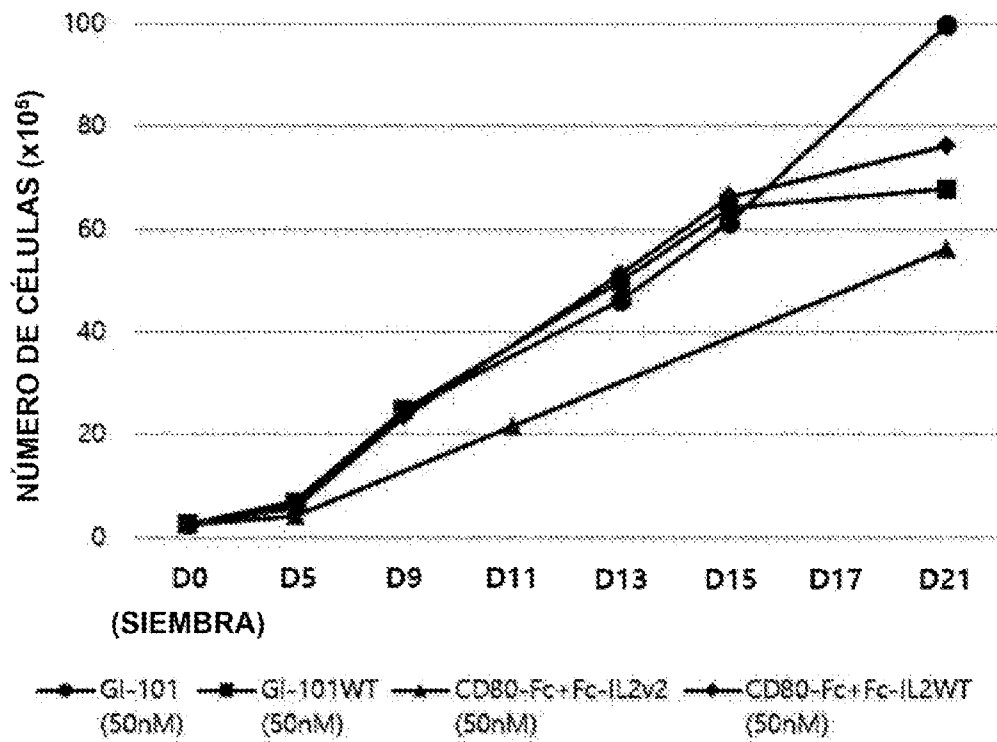


FIG. 9B

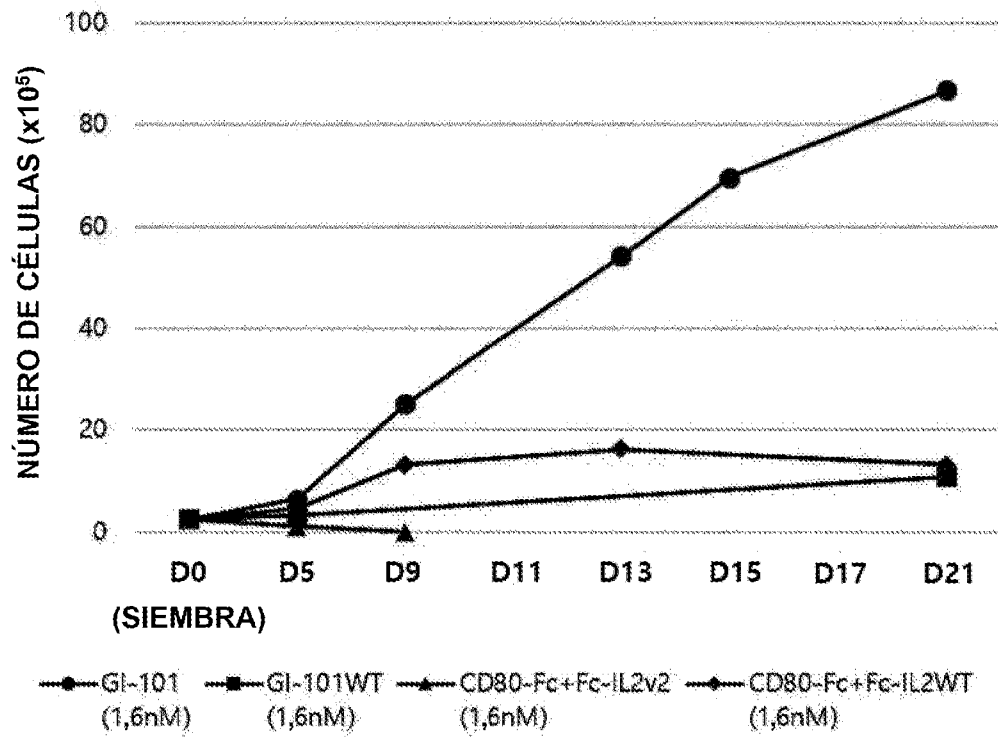


FIG. 10A

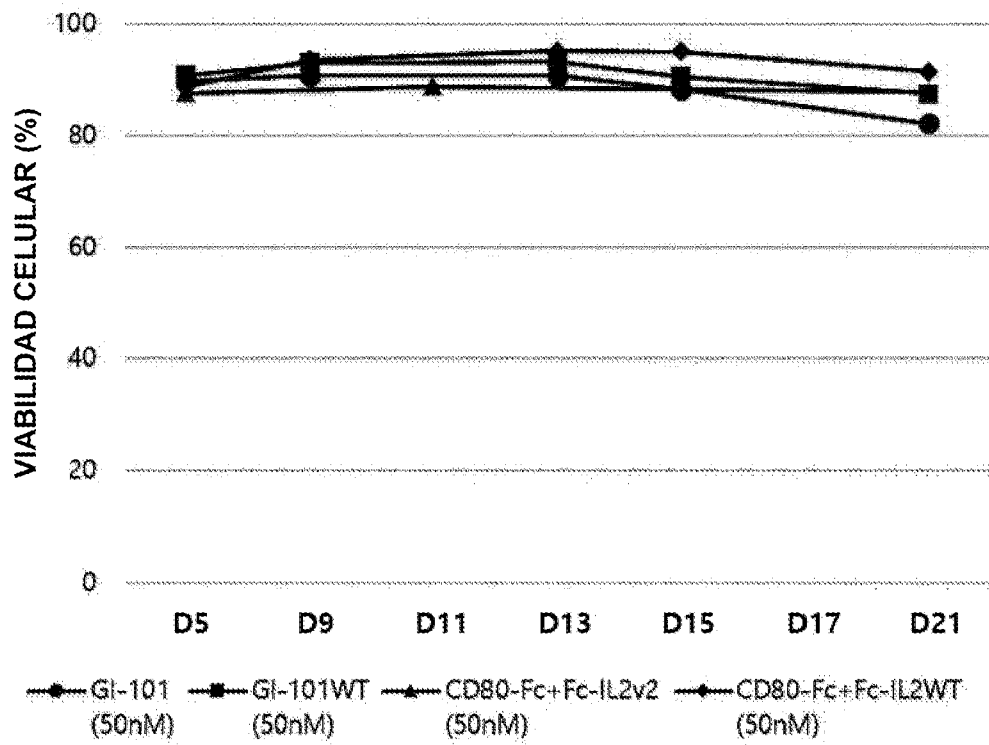


FIG. 10B

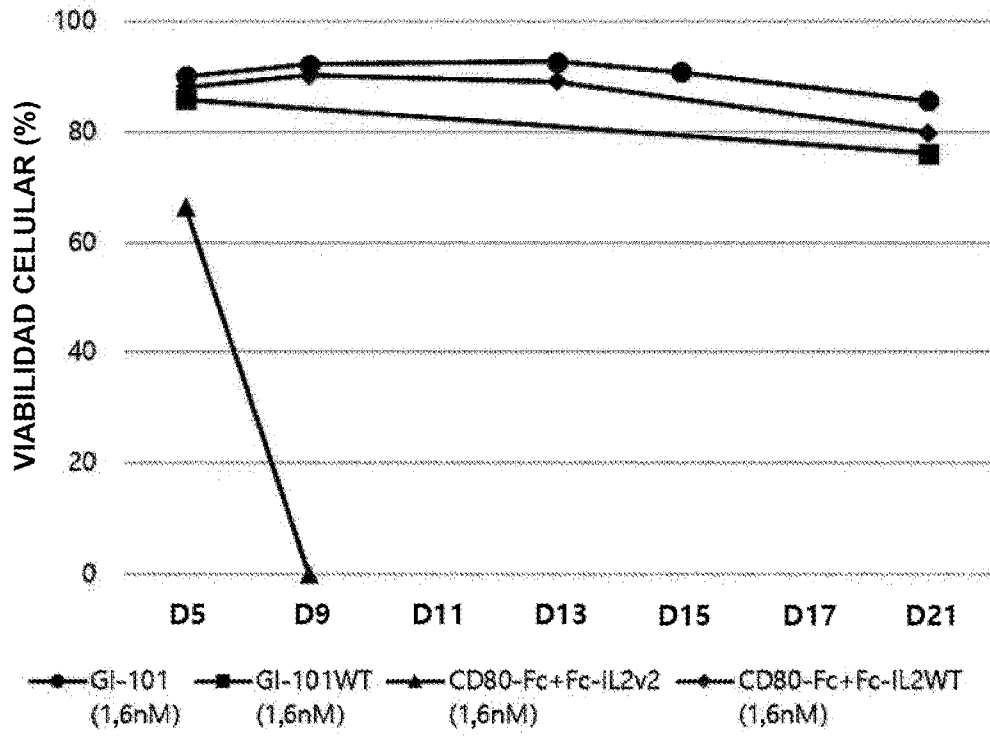


FIG. 11A

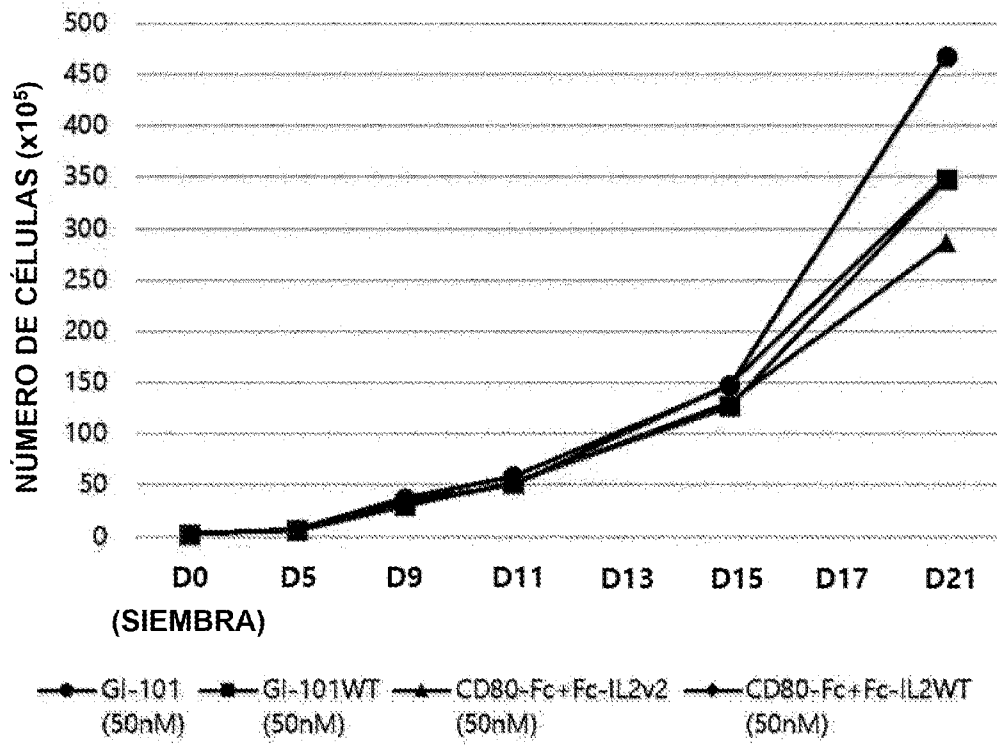


FIG. 11B

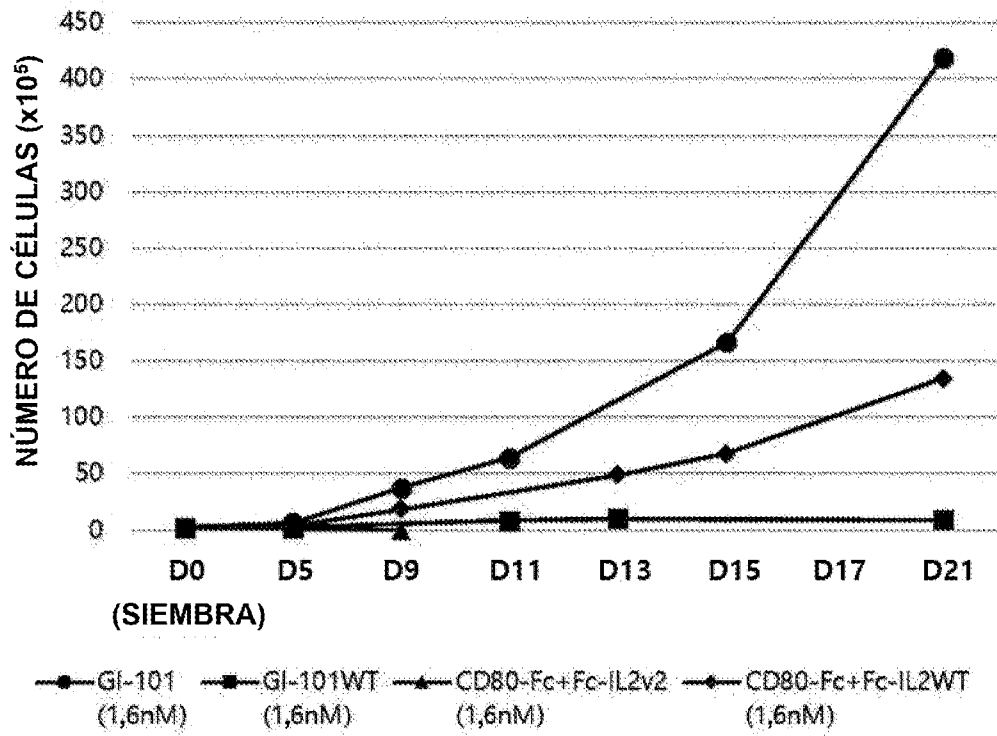


FIG. 12A

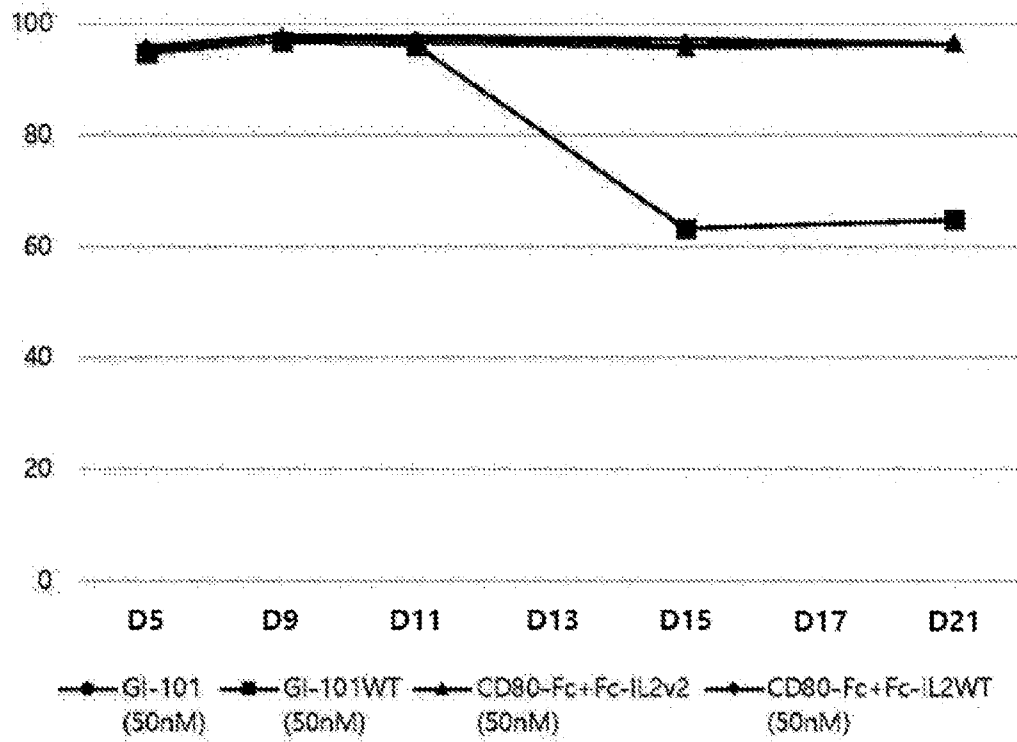


FIG. 12B

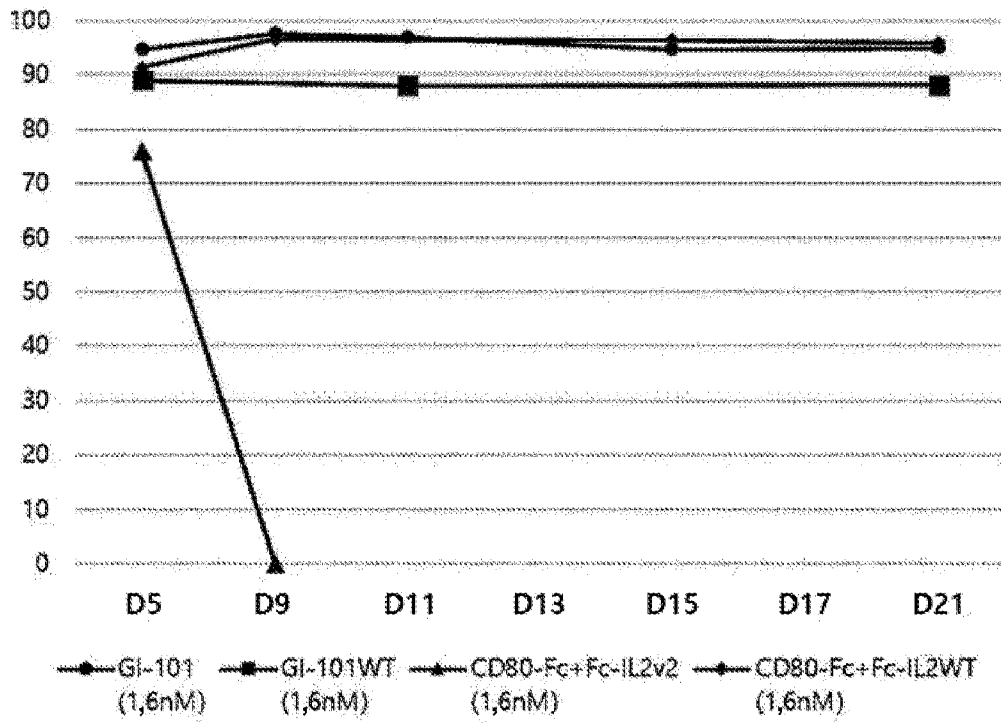


FIG. 13

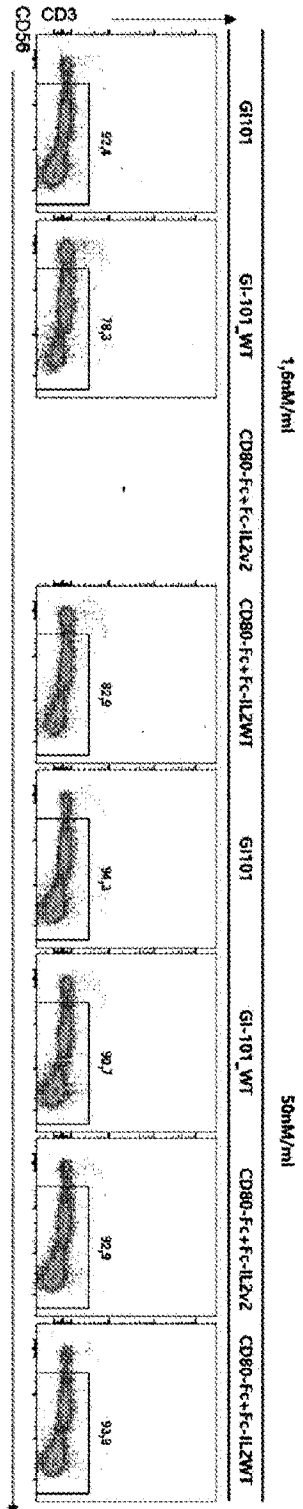


FIG. 14

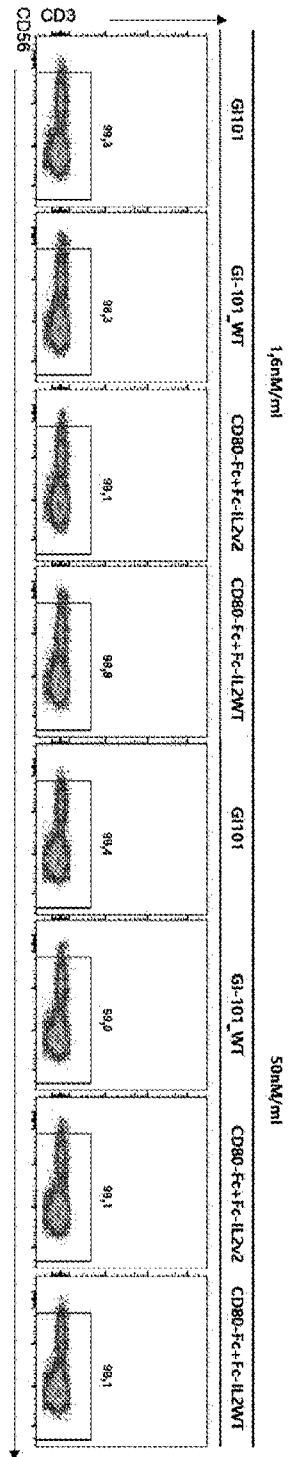


FIG. 15

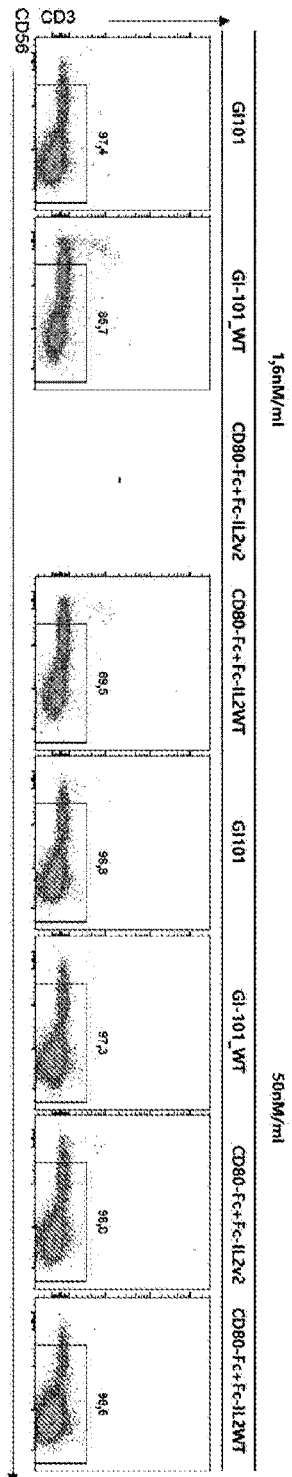


FIG. 16

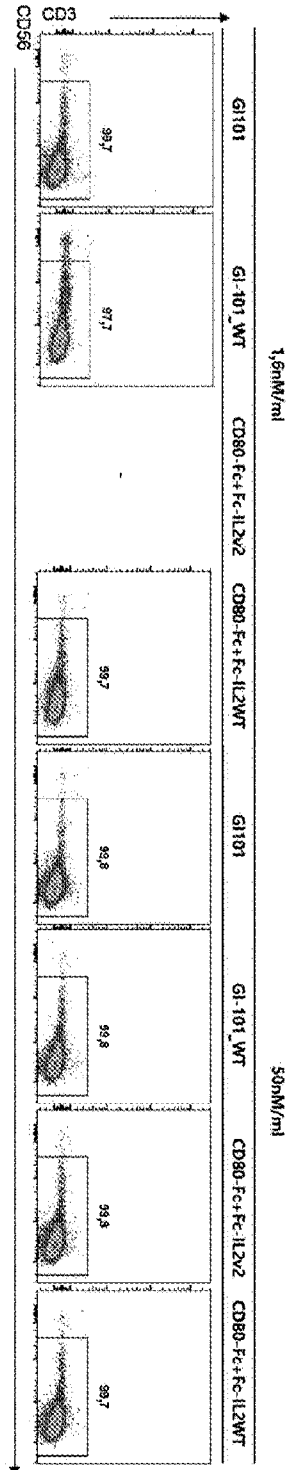


FIG. 17

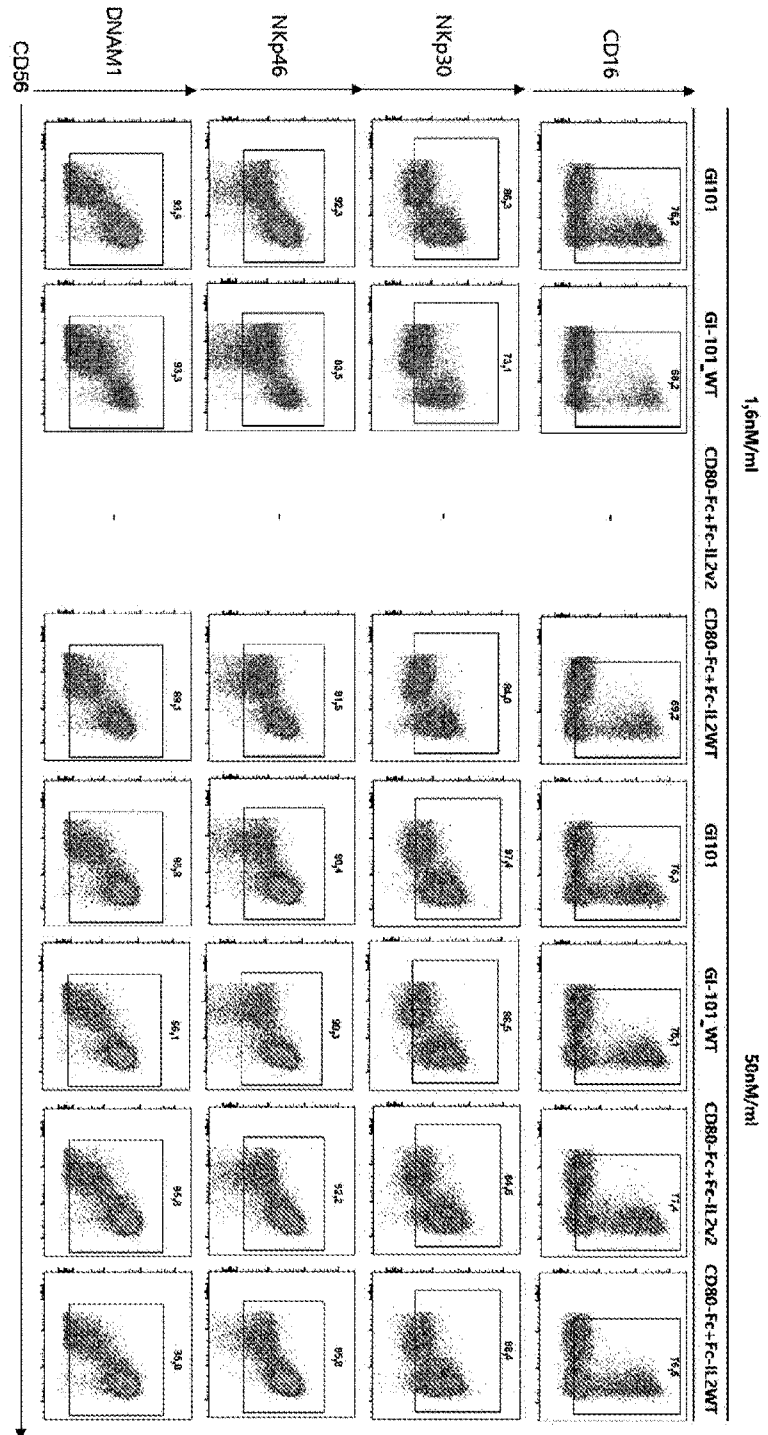


FIG. 18

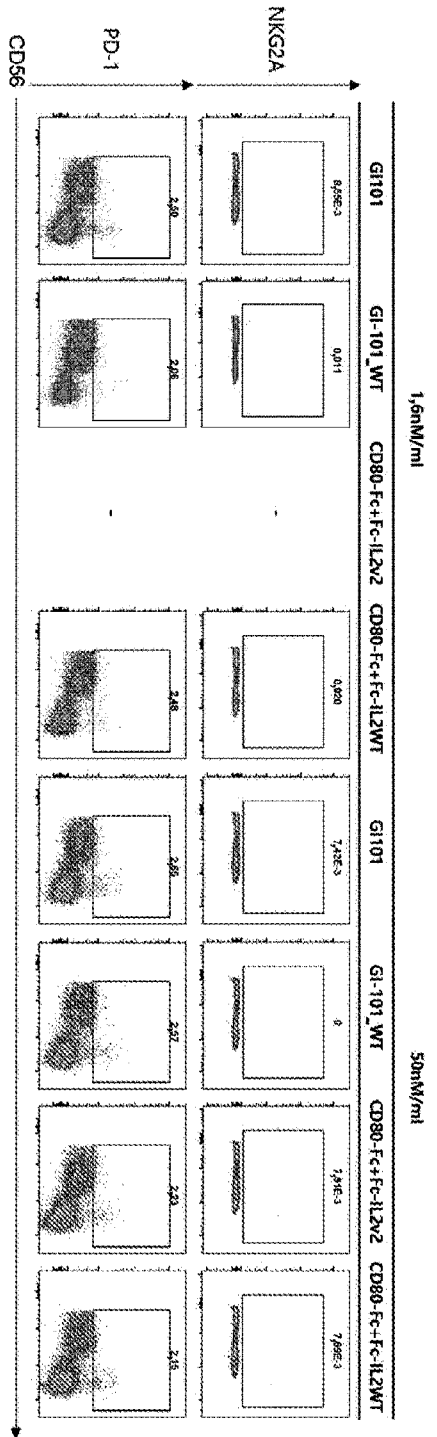


FIG. 19

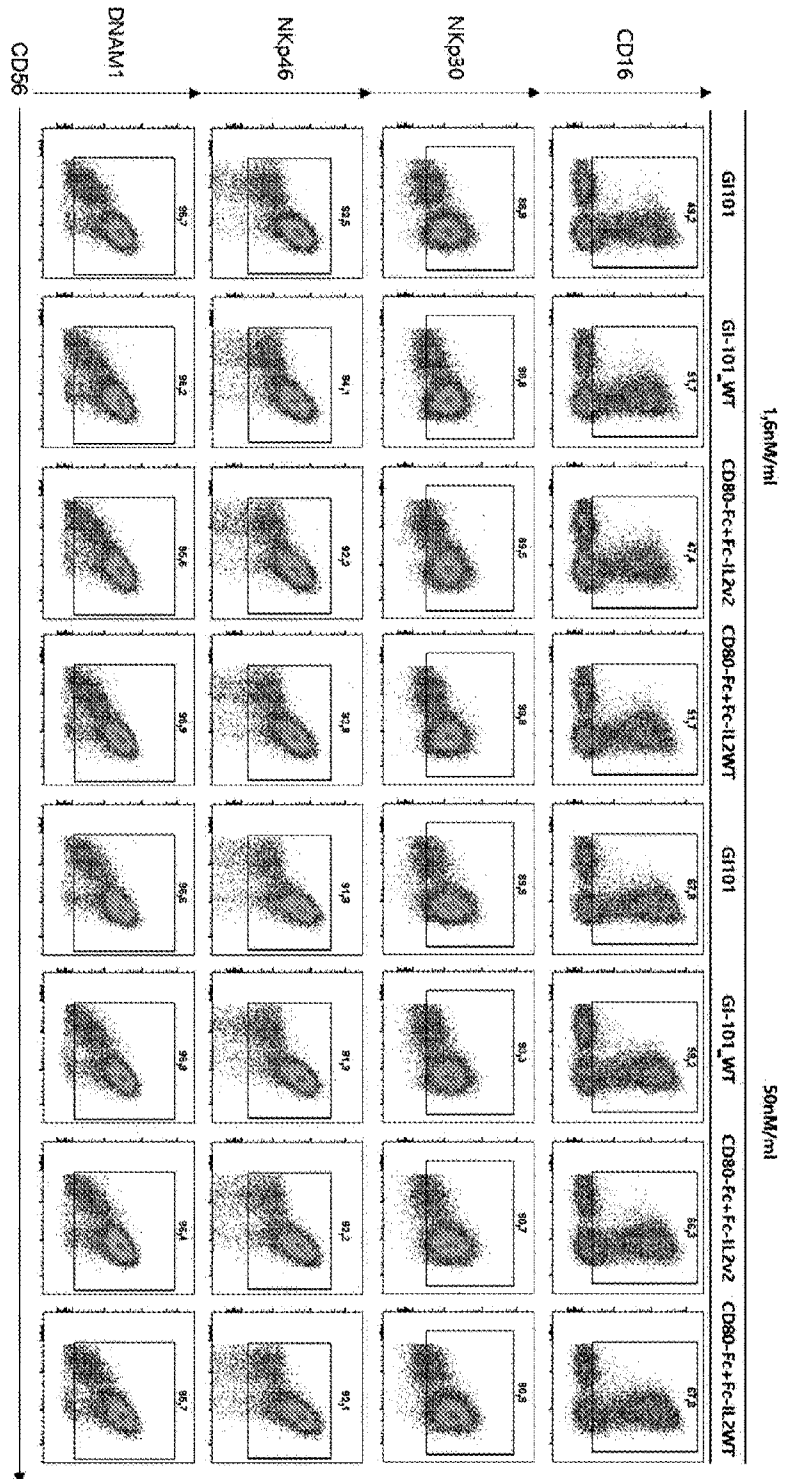


FIG. 20

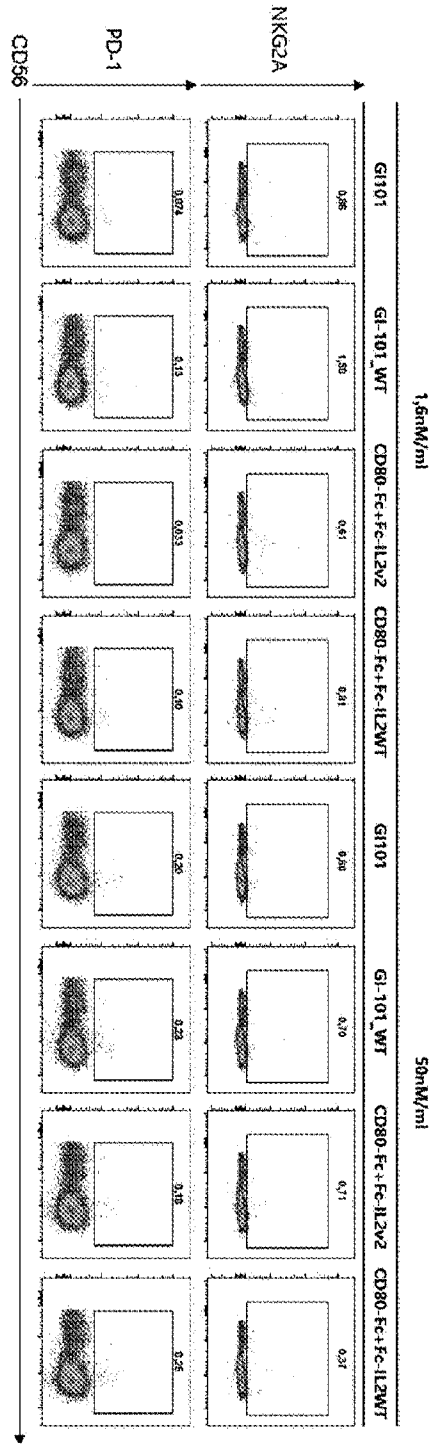


FIG. 21

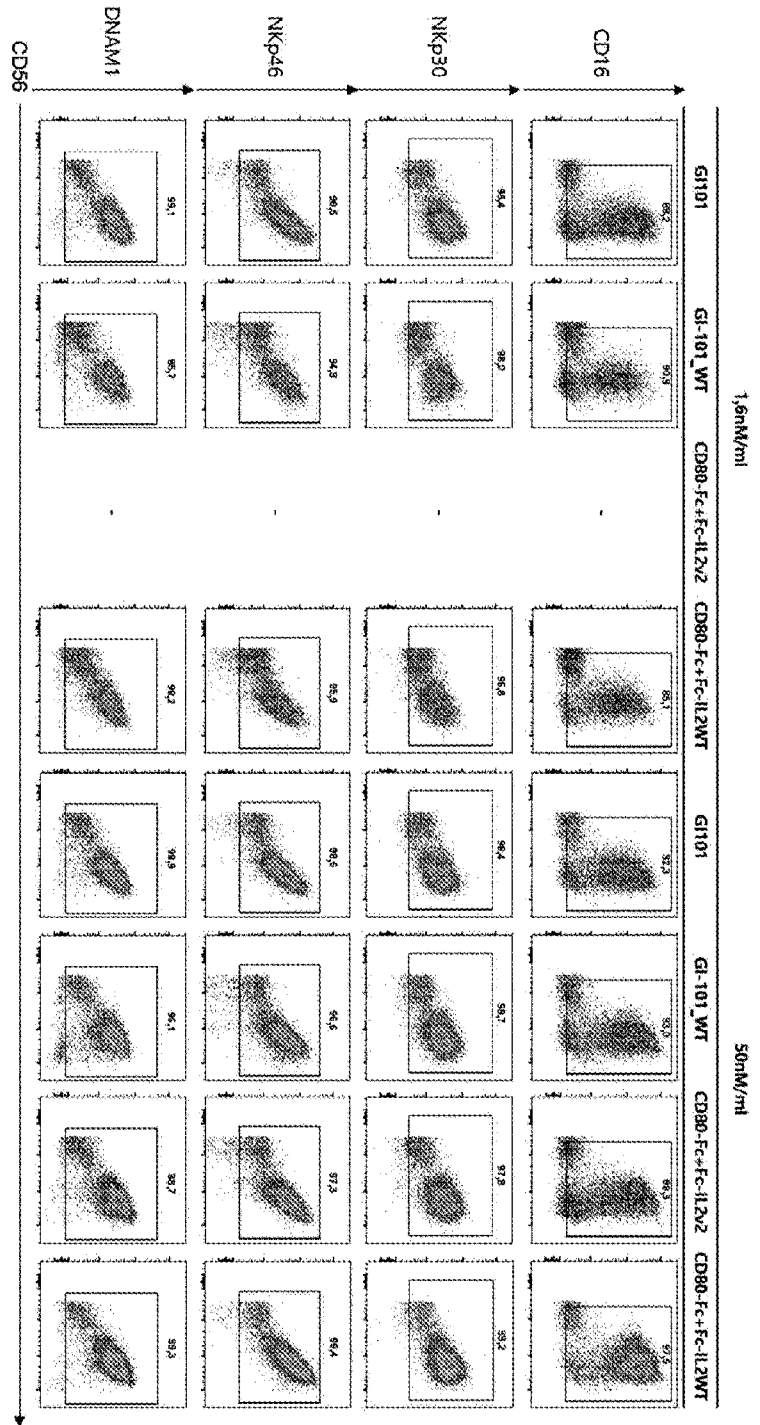


FIG. 22

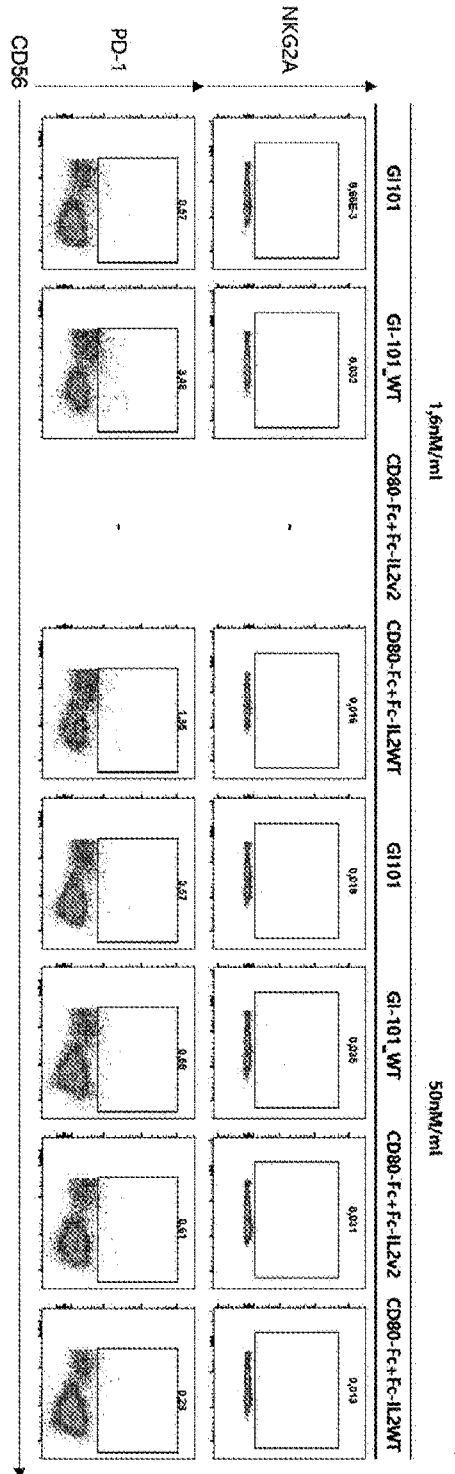


FIG. 23

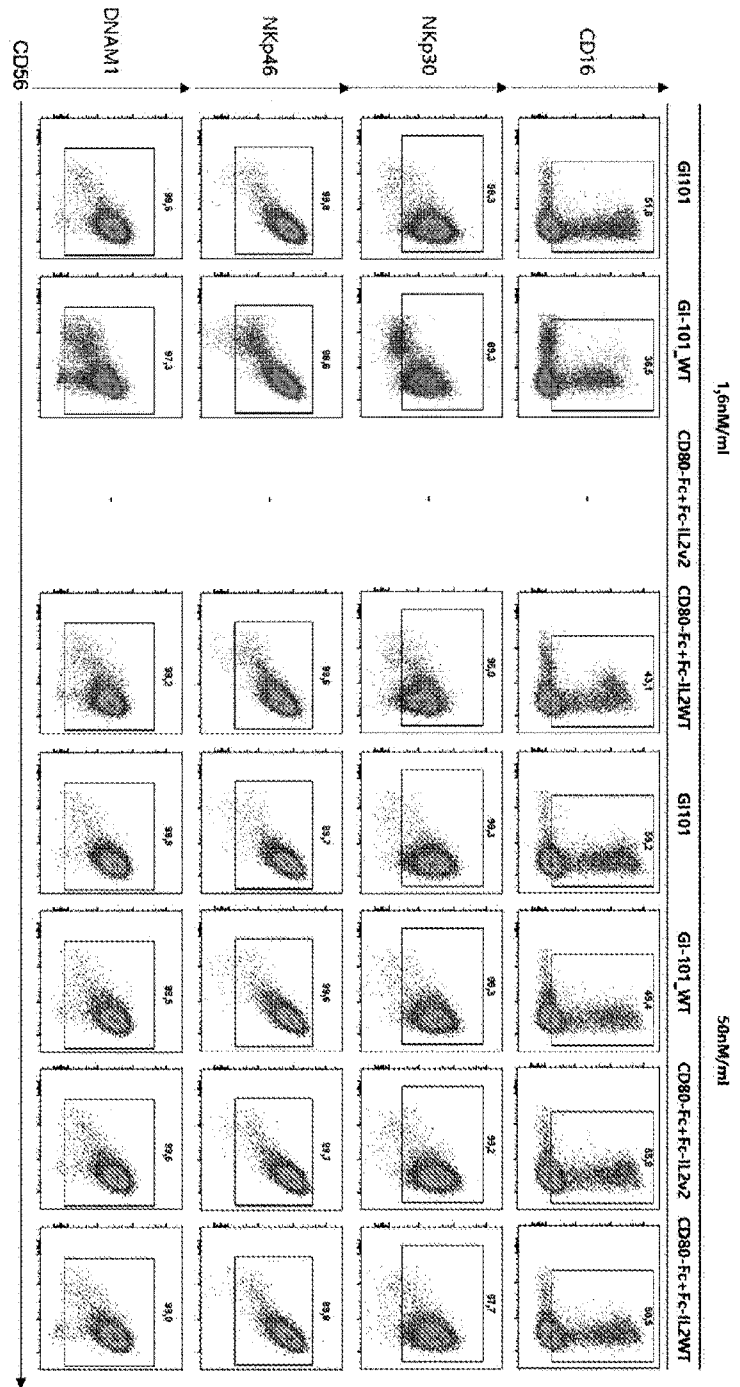


FIG. 24

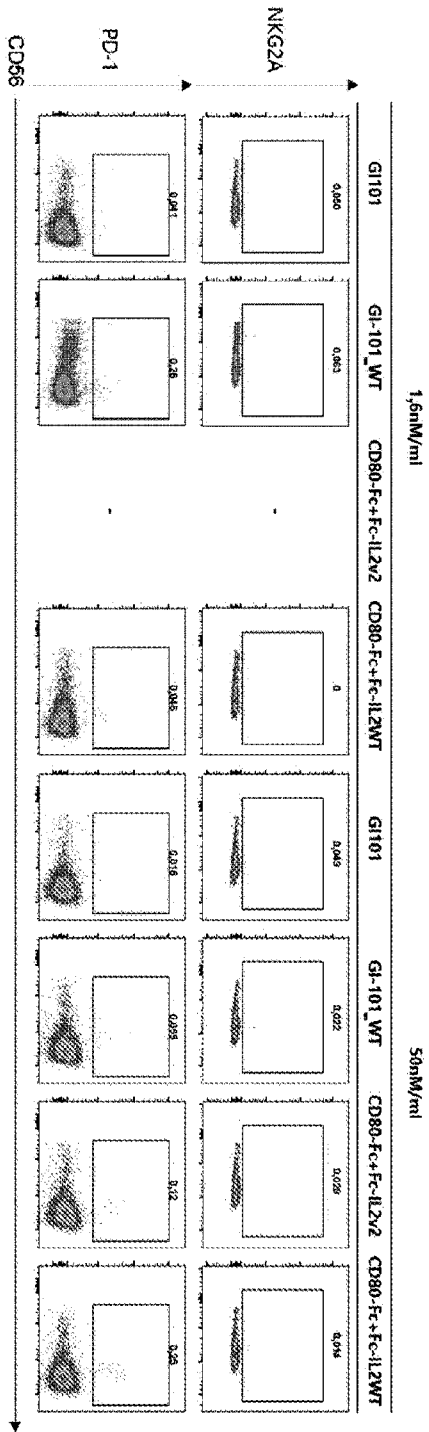


FIG. 25

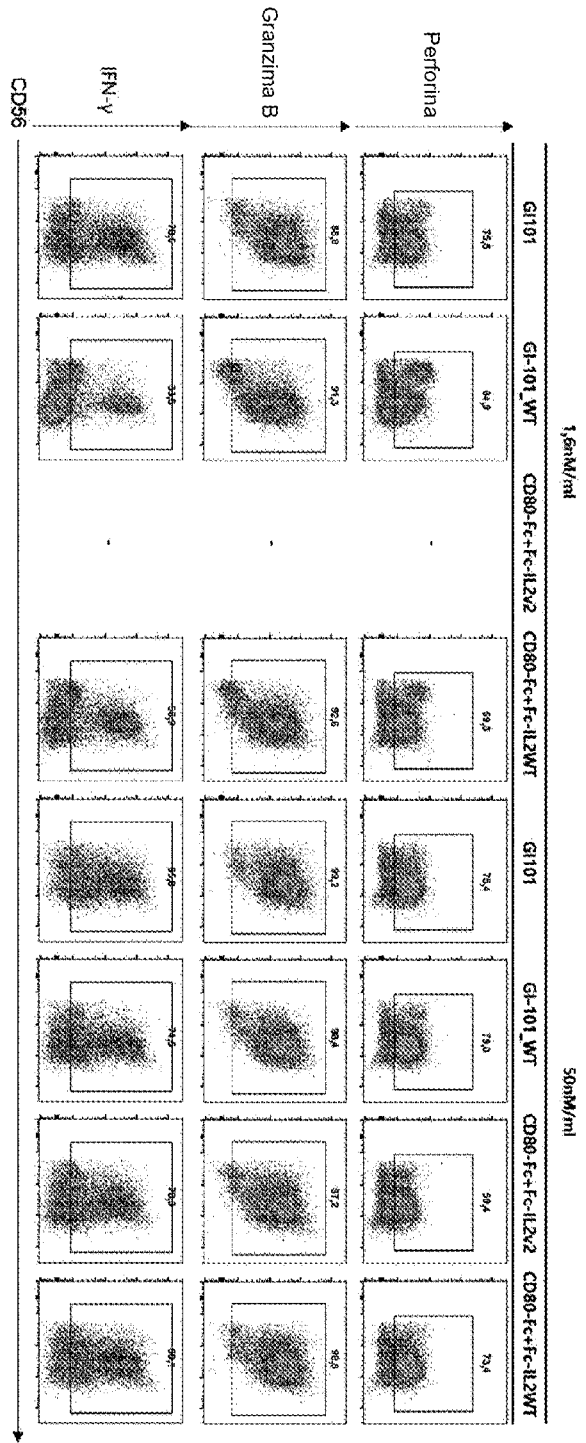


FIG. 26

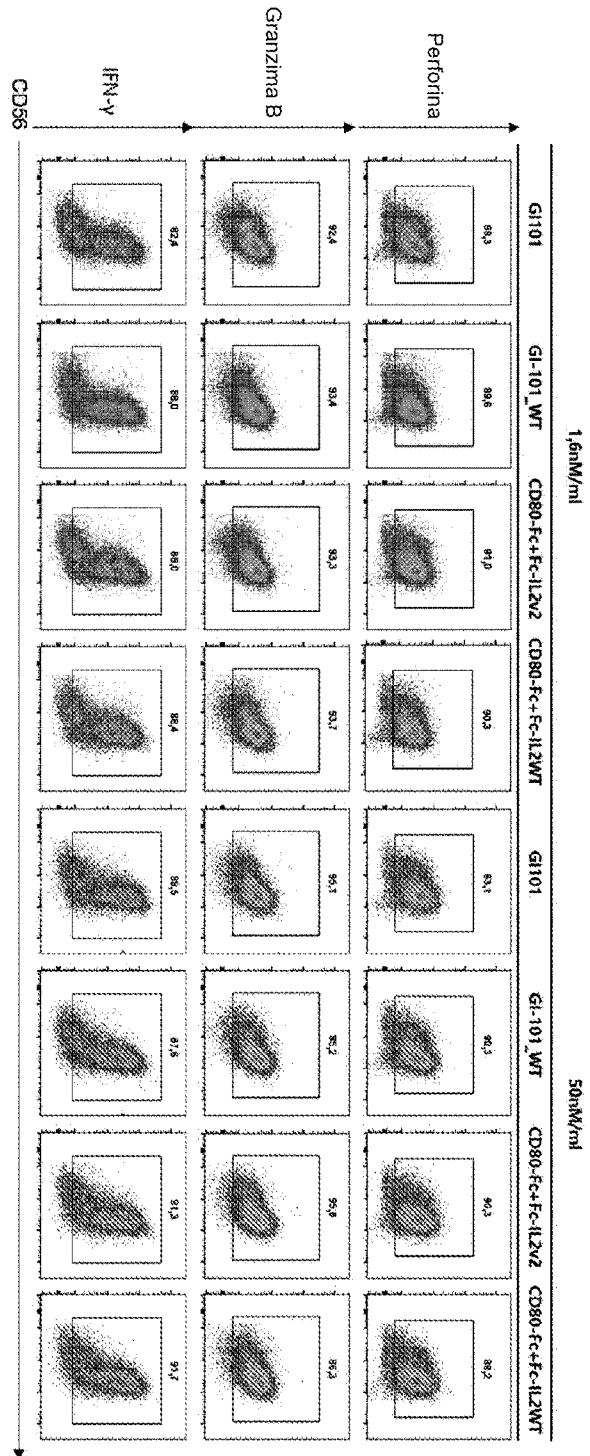


FIG. 27

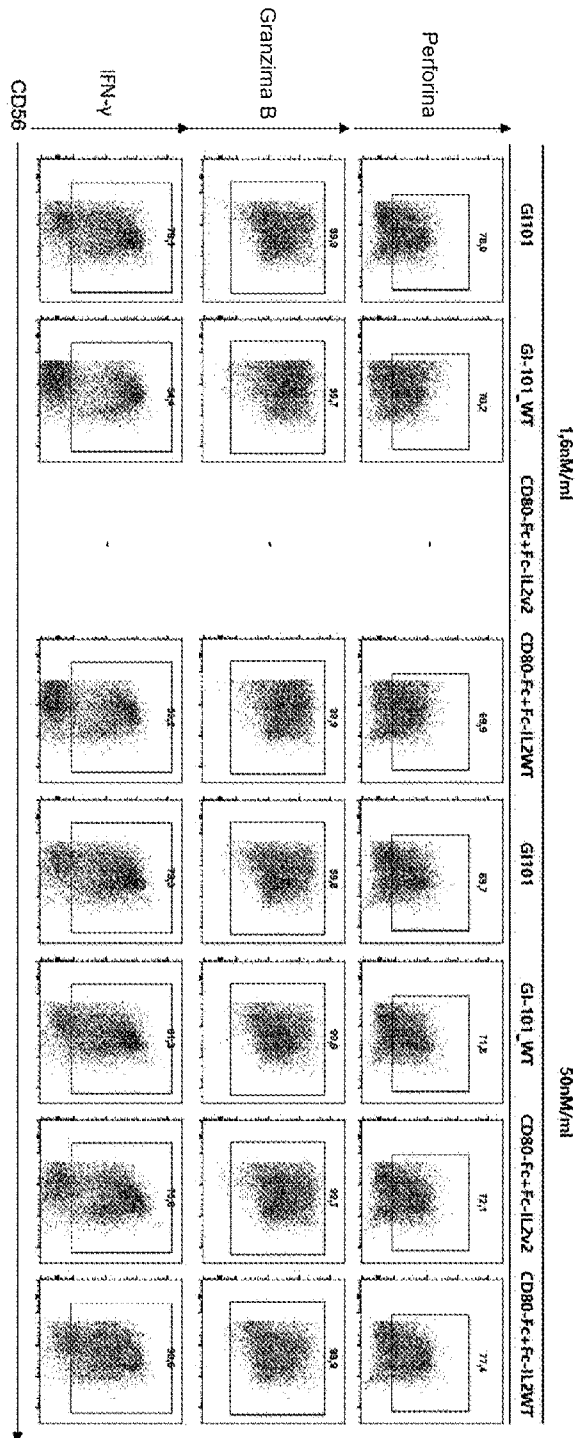


FIG. 28

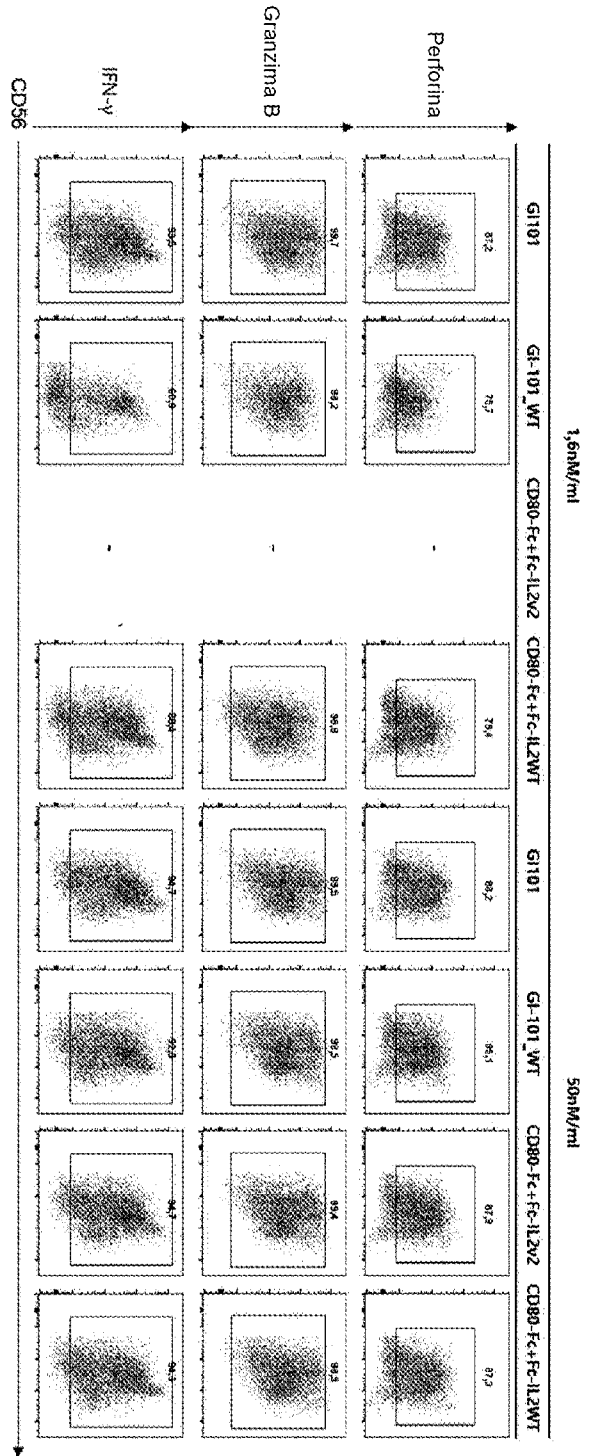


FIG. 29

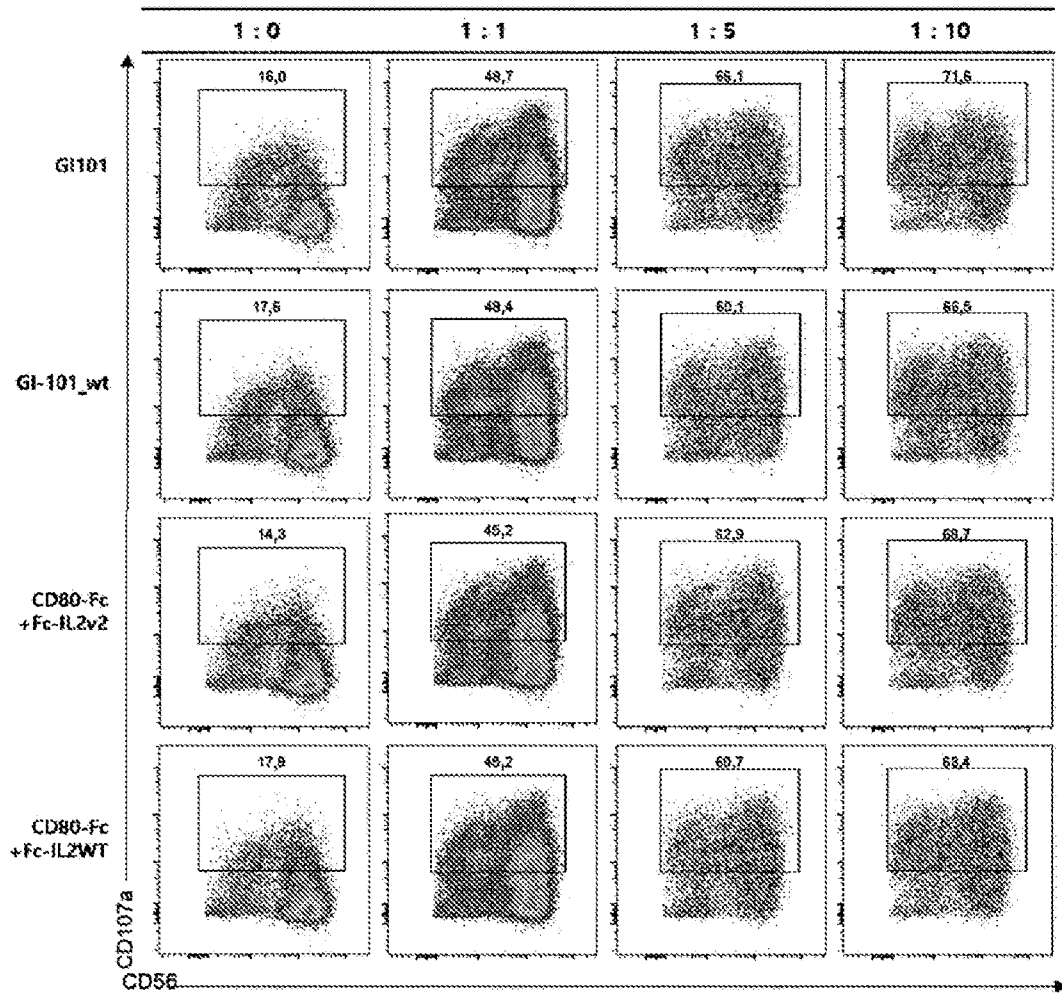


FIG. 30

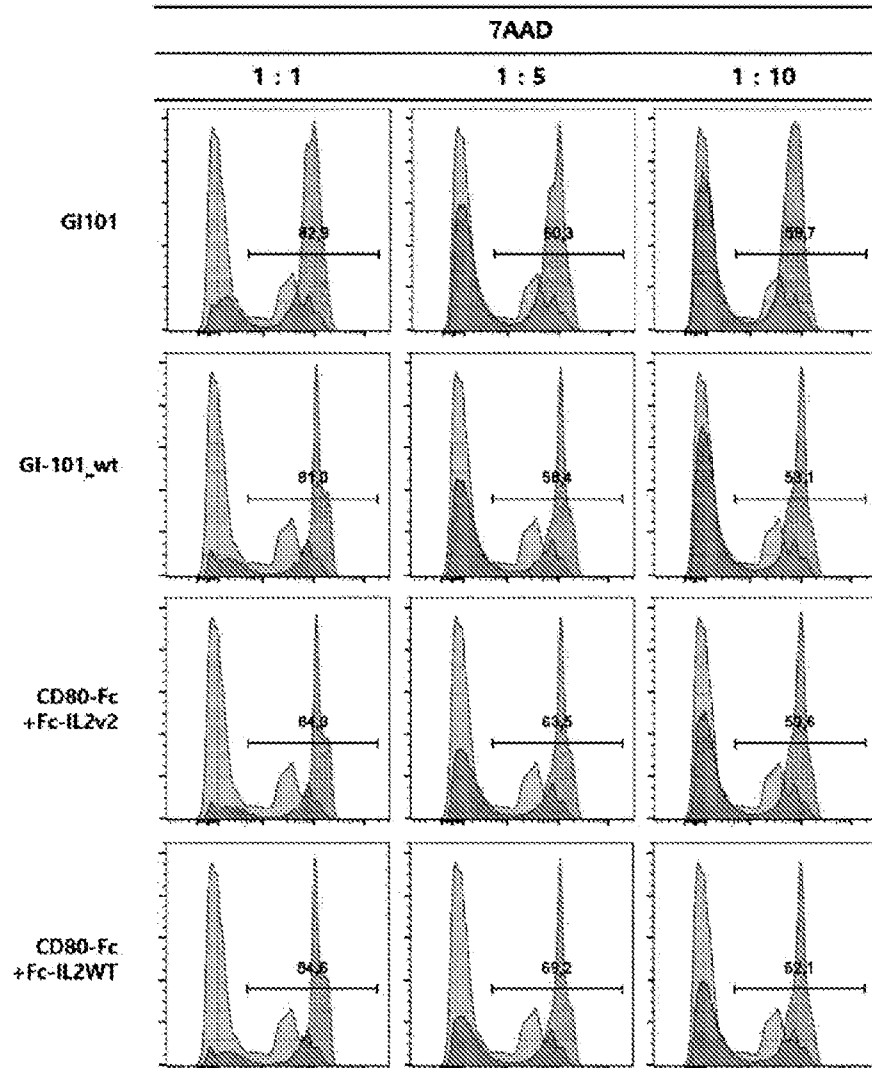


FIG. 31

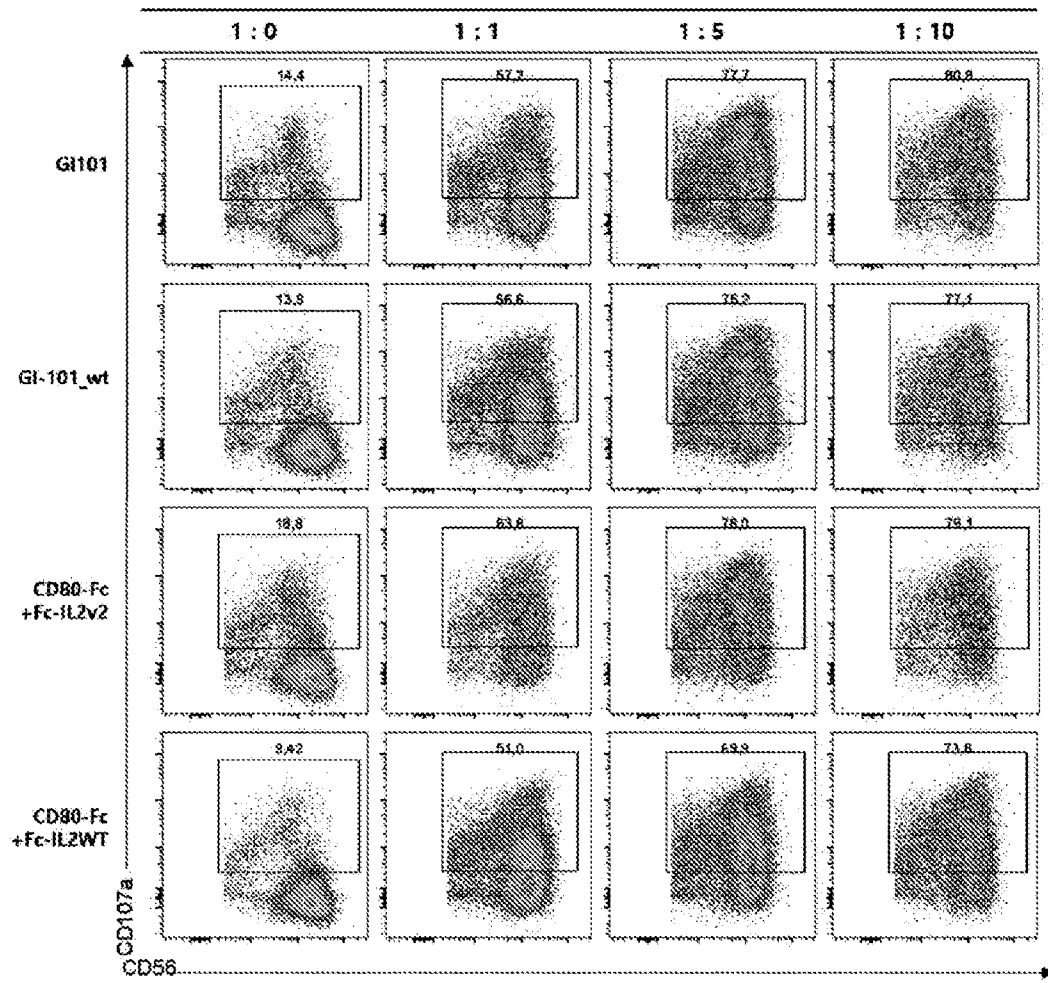


FIG. 32

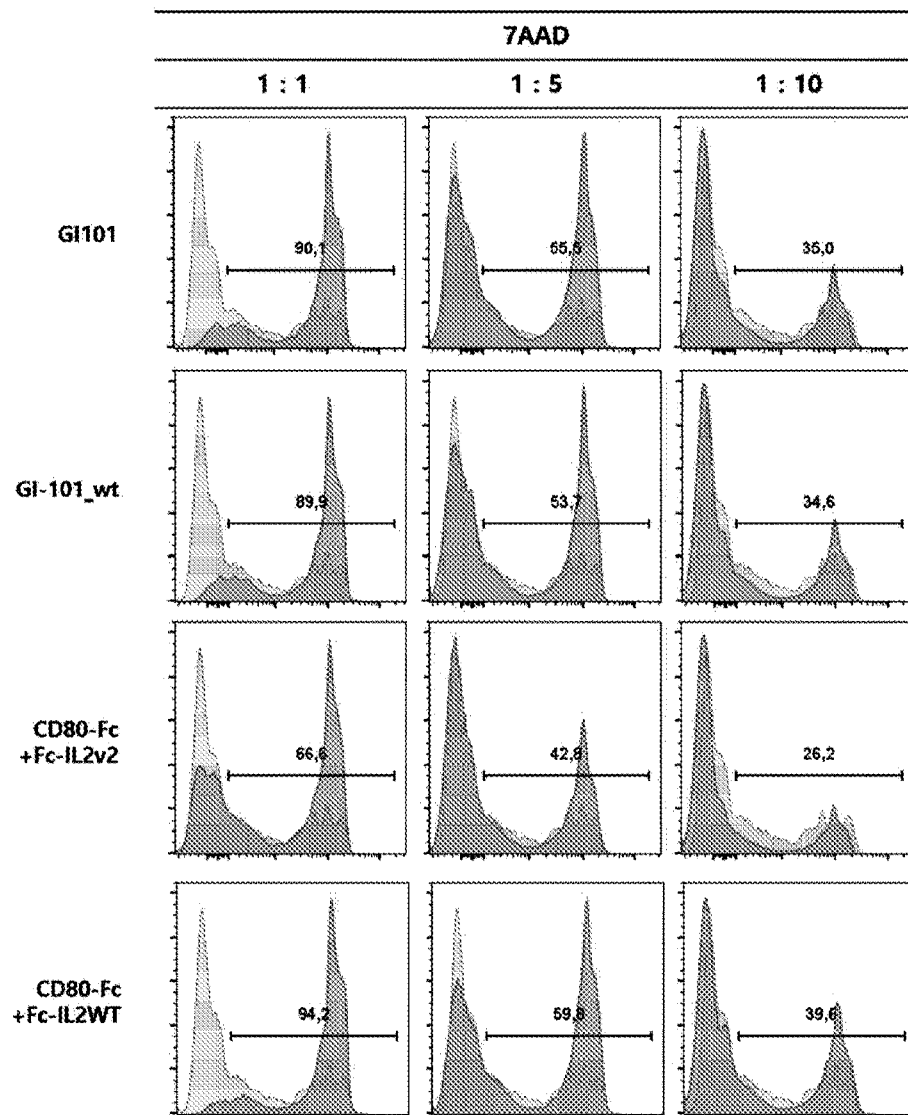


FIG. 33

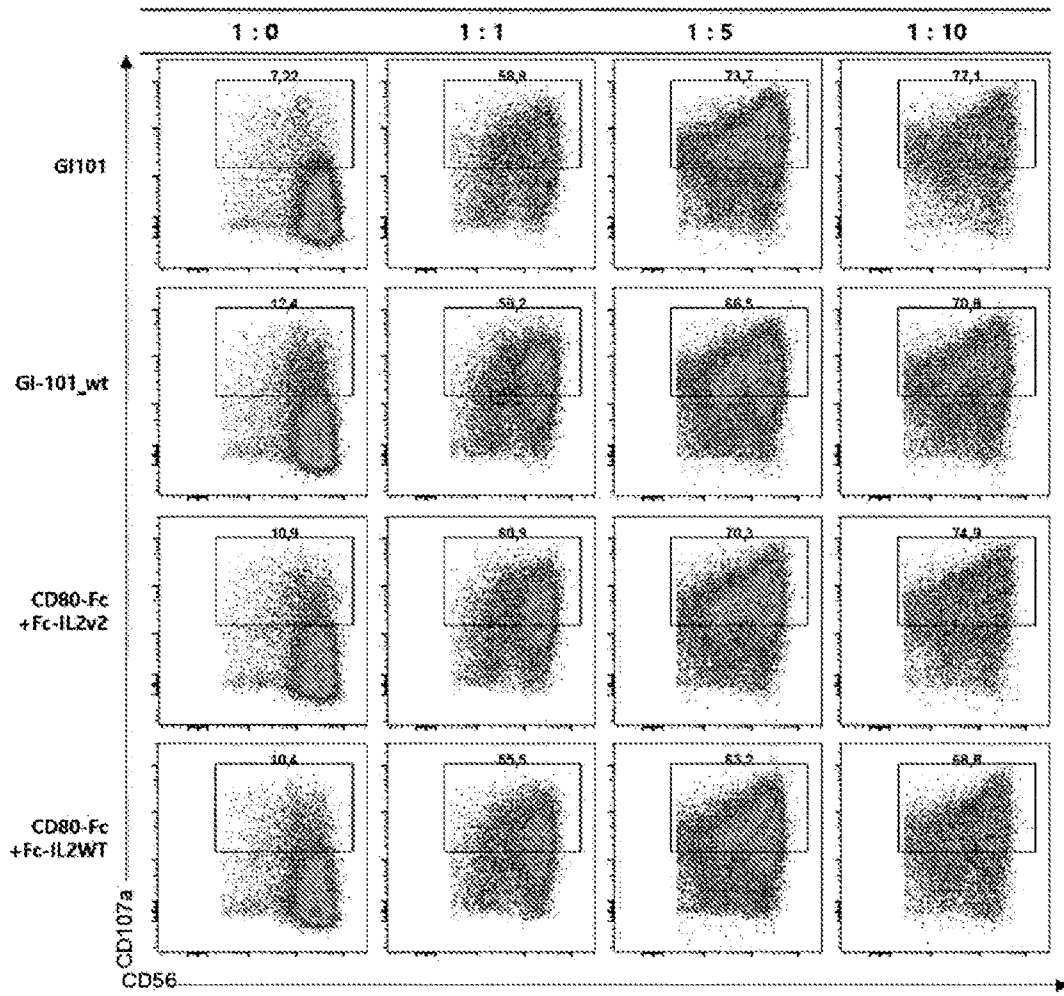


FIG. 34

