(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 797 549**

(51) Int. CI.:

***G01N 33/574*** (2006.01)
***G01N 33/68*** (2006.01)
***C07K 14/715*** (2006.01)
***C07K 19/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2012 PCT/IB2012/000259**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110878**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12747246 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2676139**

(54) Título: **Procedimiento para diagnosticar cáncer y kit de diagnóstico a través de la medición de actividad de células NK**

(30) Prioridad:

**14.02.2011 KR 20110012983**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**02.12.2020**

(73) Titular/es:

**NKMAX CO., LTD. (100.0%)**
**Jeongja-dong, Seoul National University, Bundang Hospital, Healthcare Innovation Park, 1st and 6th floor, 172, Dolma-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggo-do, 13605**
**South Korea, KR**

(72) Inventor/es:

**LEE, JAE MYUN;**
**YOON, JOO CHUN;**
**PARK, SANG WOO y**
**KIM, JONG SUN**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

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

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para diagnosticar cáncer y kit de diagnóstico a través de la medición de actividad de células NK

Antecedentes

**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar el cáncer y un kit de diagnóstico a través de la medición de la actividad de las células NK.

**2. Discusión de la técnica relacionada**

Se sabe que los linfocitos citolíticos naturales (NK) participan en la inmunidad innata para eliminar los patógenos y las células cancerosas, y secretan interferón-gamma (IFN-y), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-$\alpha$), proteína inflamatoria de macrófagos-1$\beta$ (MIP-1$\beta$) y otras moléculas para mediar la inmunidad adaptativa. Cuando las células NK se encuentran con otras células, las células NK tienen un mecanismo en el cual, cuando MHC Clase 1 no está presente como en las células cancerosas, o una forma de Clase MHC es anormal como en las células infectadas con virus, sus complejos mayor de histocompatibilidad (MHC) envían señales a las células NK para atacar estas células anormales a través de sus acciones moleculares. Sin embargo, dado que se ha informado que las células NK tienen defectos en las funciones y capacidades de diferenciación en varios tipos de cánceres, la actividad de las células NK está estrechamente asociada con la supervivencia de las células cancerosas. Por lo tanto, se está realizando una amplia investigación para aumentar el número o la actividad de las células NK para la inmunoterapia del cáncer.

Mientras tanto, los procedimientos de diagnóstico del cáncer han incluido principalmente la búsqueda de la presencia de cáncer a partir de imágenes gráficas obtenidas mediante tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (MRI) o rayos X. Sin embargo, dado que estas pruebas generalmente se realizan solo cuando un paciente tiene una fuerte necesidad de someterse a las pruebas debido a dolor o inconveniencia, y se realizan solo en ciertos tejidos, se puede pasar por alto la presencia de cáncer. Se ha desarrollado un procedimiento para determinar el riesgo de cáncer mediante un análisis de sangre, pero su uso como procedimiento para diagnosticar el cáncer es limitado. Esto se debe a que un paciente puede parecer positivo para el cáncer cuando hay un factor etiológico presente en el órgano correspondiente en lugar de cáncer, ya que el procedimiento se lleva a cabo utilizando marcadores tumorales sanguíneos, por ejemplo, para cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer pancreático o cáncer de hígado. También ha habido intentos de diagnosticar cáncer utilizando anticuerpos, pero dichos intentos se limitan a ciertos tipos de cáncer.

Lindgren et al., 2011, Experimental Cell Research, volumen 317, No. 6, págs. 849-858 describe que las células NK purificadas/aisladas de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico tienen una capacidad suprimida para producir IFN-$\gamma$ después de estimulación con lisado de *H. pylori*.

Parihar et al., 2002, Journal of Clinical Investigation, volumen 110, No. 7, págs. 983-992, describe que IL-12 mejora la respuesta de las citoquinas de linfocitos citolíticos naturales a las células tumorales recubiertas de anticuerpos. Las células NK se aíslan de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en el que las PBMC se aislaron de leucopacks frescos.

Mian et al., 2008, Journal of Leucocyte Biology, volumen 83, núm. 3, págs. 774-784 revela que el medio acondicionado con humo de cigarrillo inhibe de forma dependiente de la dosis la producción *in vitro* de IFN-$\gamma$ por poliinosínico: ácido policitidílico (polil : C) células PBMC y NK aisladas activadas de individuos no fumadores.

LEE et al., 2001, Journal of Immunology, volumen 167, No. 1, págs. 497-504 describe que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 inhiben la producción de IFN-$\gamma$ inducida por IL-18 en PBMC aisladas y células NK.

De acuerdo con lo anterior, sigue existiendo la necesidad de nuevos procedimientos para diagnosticar cánceres de varios tipos.

**Resumen de la invención**

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento que pueda usarse en el diagnóstico y evaluación del cáncer, así como kits y reactivos útiles en dicho procedimiento.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para medir la actividad de células NK de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, el procedimiento que comprende la estimulación de las células NK en una muestra de sangre entera de este modo activa artificialmente las células NK para generar citoquinas que secretan células NK y miden una cantidad de las citoquinas secretoras de células NK en la muestra de sangre entera.

La muestra de sangre es una muestra de sangre entera.

La estimulación de las células NK se realiza incubando la muestra de sangre entera con al menos un estimulante de citoquinas incluyendo interleuquina 2, interleuquina 15 y la interleuquina 18, o combinaciones de las mismas.

Las citoquinas que secretan células NK comprenden interferón-gamma (IFN-y), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-$\alpha$) o ambos.

En otras realizaciones no limitantes del procedimiento, proteína inflamatoria de macrófagos-1$\beta$ (MIP-1$\beta$) se puede utilizar como grupo de control para comparar la activación de las células NK con la de una persona normal.

Además, el procedimiento en ciertas realizaciones se puede llevar a cabo utilizando por lo menos una citoquina estimulante fusionado a un péptido de estabilización. Por ejemplo, aún sin querer ser limitante, el péptido estabilizador puede ser un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia de sinucleína. En tales realizaciones, el péptido estabilizador puede comprender los residuos de aminoácidos 103-115 (SEQ ID NO: 22), los residuos de aminoácidos 114-126 (SEQ ID NO: 23), los residuos de aminoácidos 119-140 (SEQ ID NO: 24) o residuos de aminoácidos 130-140 (SEQ ID NO: 25) del dominio de cola ácida de terminal C de a-sinucleína, residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de $\beta$-sinucleína (SEQ ID NO: 27), los residuos de aminoácidos 1-127 de $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 28), o los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 29).

En realizaciones adicionales, la etapa de estimulación de las células NK en una muestra de sangre activa de ese modo artificialmente las células NK para generar citoquinas que secretan las células NK se realiza en un medio que contiene una proteína portadora, por ejemplo, una proteína de albúmina de suero.

El procedimiento como se describe es particularmente útil para la detección de la incidencia o la recaída del cáncer. En tales realizaciones, una disminución en la cantidad de las citoquinas secretoras de células NK en un sujeto, en comparación con los niveles en individuos normales, es un indicador de incidencia o recaída de cáncer.

Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit para medir la actividad de células NK de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El kit comprenderá un agente para estimular las células NK en una muestra de sangre, activando artificialmente las células NK para generar citoquinas secretoras de células NK. Además, el kit puede ser útil para llevar a cabo el procedimiento descrito anteriormente, incluso para detectar la incidencia o recaída del cáncer.

En otras realizaciones no limitantes del kit descrito, la citoquina que secretan las células NK puede ser interferón (IFN-y) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-$\alpha$).

En una realización adicional, el agente para la estimulación de las células NK en la muestra de sangre y activar artificialmente de las células NK para generar las citoquinas que secretan las células NK pueden comprender al menos una citoquina estimulante, LPS o poli I:C, el al menos un estimulante de citoquinas que incluyen uno o más de interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 y la interleuquina 18.

El kit descrito también puede comprender, en ciertas realizaciones, uno o más de los siguientes: anticuerpo anti-INF-y, un anticuerpo anti-TNF-$\alpha$ y un anticuerpo anti-MIP-1$\beta$. Sin desear limitarlo de ninguna manera, el kit también puede comprender además instrucciones para comparar la cantidad de las citoquinas secretoras de células NK en un sujeto con los niveles en individuos normales, en el que una disminución en el nivel de las citoquinas secretoras de células NK en el sujeto es un indicador de incidencia de cáncer o recaída.

Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona una proteína de fusión para uso en la activación de las células NK de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, dicha proteína de fusión comprende una citoquina unida a un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia sinucleína, la citoquina es interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18.

En ciertas realizaciones no limitantes de la proteína de fusión descrita, el péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína puede comprender residuos de aminoácidos 103 -115 (SEQ ID NO: 22), residuos de aminoácidos 114-126 (SEQ ID NO: 23), residuos de aminoácidos 119-140 (SEQ ID NO: 24) o residuos de aminoácidos 130-140 (SEQ ID NO: 25 ) del dominio de cola ácida de terminal de la $\alpha$-sinucleína, los residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\beta$-sinucleína (SEQ ID NO: 27), residuos de aminoácidos 1-127 de la $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 28), o residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal de $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 29).

Se proporcionan también composiciones que comprenden la proteína de fusión descrita anteriormente.

También se proporcionan en este documento kits diagnóstico del cáncer que comprenden las proteínas de fusión descritas anteriormente o las composiciones descritas anteriormente.

El kit de diagnóstico de cáncer, como se describió anteriormente, puede en ciertas realizaciones no limitantes también incluir al menos un anticuerpo entre los siguientes: un anticuerpo anti-INF-y, un anticuerpo anti-TNF-$\alpha$ y un anticuerpo anti-MIP 1$\beta$.

También se proporciona en el presente documento un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:

6, SEQ ID NO: 8 , o SEQ ID NO: 10. Sin desear ser limitante, el polipéptido puede tener un porcentaje de identidad más alto, que incluye 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las secuencias de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10.

También se describen oligonucleótidos que codifican los polipéptidos y proteínas de fusión descritos anteriormente. Por ejemplo, se proporciona un oligonucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80% de identidad con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9, o el complemento de los mismos. Dichos oligonucleótidos pueden, sin limitación, tener un porcentaje de identidad más alto, que incluyen 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con las secuencias de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9, o las secuencias complementarias de las mismas.

Los vectores que comprenden los oligonucleótidos descritos anteriormente también se divulgan, al igual que las células huésped que comprenden dichos vectores u oligonucleótidos.

**Breve descripción de los dibujos**

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes para los de experiencia ordinaria en la técnica mediante la descripción en detalle a modo de ejemplo de las realizaciones de la misma con referencia a los dibujos, en los que:

La figura 1 es una vista esquemática que muestra los productos de fusión de un péptido SP fusionado con el terminal N o el terminal C de una citoquina, que incluye hIL2, hIL12, hIL15 y hIL18.

La figura 2 es una fotografía que muestra los resultados de electroforesis de las proteínas de fusión SP purificadas.

La figura 3 muestra la actividad de las células NK activada artificialmente en una persona normal a través del análisis de una cantidad de interferón-y generado, cuando las células NK son estimuladas por una citoquina simple (FIG. 3A) o citoquinas combinadas (FIG. 3B -3D).

La figura 4 es un gráfico que muestra las citoquinas secretadas a partir de células NK activadas artificialmente a través de ELISA tipo sándwich.

La figura 5 muestra una comparación de la actividad proteica (A) y la estabilidad (B) entre SP IL-2 e IL-2.

La figura 6 muestra la actividad de las células NK en personas normales y pacientes con cáncer que se tratan con SP IL-2 (10 ng/ml) (Condición A) y SP IL-2 (5 ng/ml)+IL-12 (5 ng/ml) (Condición B), por separado.

La figura 7 es un gráfico que muestra la capacidad de las células NK para secretar interferón-y en células T, células NK, sangre entera y PBMC de acuerdo con el estímulo de IL2.

La figura 8 es un gráfico que muestra una variación en la cantidad de interferón-y secretada por las células NK de una persona normal, según lo estimulado por LPS.

La figura 9 es un gráfico que muestra una variación en la capacidad de las células NK para secretar interferón-y de acuerdo con las concentraciones de IL12 e IL15 tratadas y la diferencia en las composiciones de los medios.

La figura 10 es un gráfico que muestra una variación en la cantidad de interferón-y secretado de acuerdo con la etapa de progreso del cáncer.

La figura 11 muestra los resultados del análisis de interferón-y generado a partir de células NK de una persona normal estimulada por citoquinas utilizando una placa ELISA.

La figura 12 muestra los resultados de citometría de flujo de sangre entera de personas normales estimuladas por citoquinas.

**Descripción detallada**

La presente invención está dirigida a un procedimiento, kit, y reactivos para el diagnóstico de la incidencia de cáncer utilizando la interrelación de cáncer y las células NK.

Para este propósito, se proporciona un procedimiento para medir la actividad de células NK de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, dicho procedimiento comprende la estimulación de células NK en una muestra de sangre entera activando artificialmente de este modo las células NK para generar citoquinas que secretan las células NK, y medir una cantidad de las citoquinas secretoras de células NK en la muestra de sangre entera.

Los presentes inventores han encontrado que, en base a la observación de que una actividad de las células NK se reduce en pacientes con cáncer, la incidencia de cáncer se puede tamizar principalmente mediante la medición de la actividad de células NK. El procedimiento descrito en el presente documento es capaz de determinar si las células NK

funcionan normalmente dando un estímulo artificial a las células NK y midiendo un nivel de activación de las células NK mediante la detección de cambios en la cantidad de citoquinas secretoras de células NK presentes en una muestra de sangre, que difiere de otros procedimientos que simplemente miden el número de células NK o una cantidad de citoquinas originalmente presentes en la muestra de sangre. Por ejemplo, en un procedimiento convencional para medir un nivel de activación de las células NK, se ha utilizado un ensayo de liberación de $^{51}Cr$ como procedimiento para medir la citotoxicidad específica del objetivo. Sin embargo, cuando la actividad de las células NK se mide de esta manera, se debe utilizar un isótopo radiactivo, y la medición y el análisis son difíciles, complicados y costosos. Por lo tanto, el ensayo no es adecuado para su uso en procedimientos de detección/prueba de cáncer primario que simplemente pueden diagnosticar la incidencia de cáncer. Por otro lado, de acuerdo con la presente invención, dado que la actividad de las células NK puede medirse estimulando las células NK para que generen citoquinas secretoras de células NK y cuantificando las citoquinas secretoras de células NK generadas, un sujeto en el que se reduce la actividad de las células NK puede ser cribado ventajosamente como un sujeto que padece cáncer o en riesgo de padecer cáncer.

De acuerdo con la presente invención, la muestra de sangre es sangre total que se toma del sujeto. El uso de la sangre entera es ventajoso debido a una metodología más simple y costes reducidos.

Mientras tanto, en la presente invención, el término “sujeto” se refiere a un mamífero que se sospecha que padece cáncer o que tiene una recaída de cáncer, o que desea determinar la incidencia o la recaída del cáncer.

Las células NK presentes en la muestra de sangre generalmente están presentes en un estado inactivado. De acuerdo con la presente invención, al menos una citoquina, lipopolisacárido (LPS) o ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) puede usarse como un agente, también denominado aquí como agonista o activador, que sirve para estimular tales células NK en la muestra de sangre y activa artificialmente las células NK para generar citoquinas secretoras de células NK. Aquí, la citoquina utilizada para activar las células NK puede ser interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 e interleuquina 18, o combinaciones de las mismas. La interleuquina 2, la interleuquina 12, la interleuquina 15, la interleuquina 18, la LPS o la poli I:C son ampliamente conocidas en la técnica por ser estimuladas para generar las citoquinas secretoras de células NK. Por lo tanto, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención, la estimulación de las células NK puede realizarse incubando la muestra de sangre con al menos una citoquina, que incluye interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 y/o interleuquina 18, o al incubar la muestra de sangre con LPS o poli I:C.

En una realización no limitante, la estimulación de las células NK puede llevar a cabo mediante la incubación de la muestra de sangre con interleuquina 2. La interleuquina 2 es una de las citoquinas secretadas por las células T, y es conocida por estar asociada con la activación de las células NK por células T en una respuesta inmunitaria adaptativa *in vivo*. Además, la interleuquina 2 es una citoquina que generalmente se usa ampliamente para activar las células NK *in vitro*. Por lo tanto, la estimulación de las células NK se puede llevar a cabo mediante la incubación de la muestra de sangre con la interleuquina 2.

En otra realización no limitante, la estimulación de las células NK se puede llevar a cabo mediante la incubación de la muestra de sangre con interleuquina 2 y la interleuquina 12. En el caso de pacientes con cáncer en etapa temprana, la actividad de las células T puede ser alta, aunque la actividad de las células NK sea baja. Por el contrario, en el caso de pacientes con cáncer en etapa tardía, la actividad de las células T y de las células NK puede ser baja. La interleuquina 12 participa en la activación de las células T y de las células NK. Por lo tanto, si se trata la interleuquina 12 con interleuquina 2, las citoquinas secretadas debido a la estimulación de las células T se agregan a la citoquina secretada por las células NK. Por lo tanto, es posible evaluar el nivel total de inmunidad, así como la inmunidad anticancerígena de las células NK, y usar este nivel como un marcador que representa el grado de proceso del cáncer o el pronóstico del tratamiento del cáncer. La interleuquina 15 y la interleuquina 18 son citoquinas secretadas por células dendríticas activadas y macrófagos, e inducen la activación y el crecimiento de las células NK durante una respuesta inmunitaria *in vitro* innata. En particular, cuando la interleuquina 12 se combina con la interleuquina 15 o la interleuquina 18, se puede usar una cantidad relativamente pequeña de la interleuquina 12 para estimular la secreción de las citoquinas secretoras de células NK en las células NK. Por lo tanto, la estimulación de las células NK se puede llevar a cabo eficazmente mediante la incubación de la muestra de sangre con la interleuquina 12 y la interleuquina 15, o con la interleuquina 12 y la interleuquina 18.

De acuerdo con la presente invención, un valor numérico de las citoquinas secretoras de células NK se utilizan como medida para evaluar la actividad de las células NK. En la presente invención, “citoquinas secretoras de células NK” se refiere a las citoquinas secretadas por las células NK, en particular las citoquinas de las células NK activadas por estimulación artificial. En una realización, las citoquinas secretoras de células NK son al menos una citoquina seleccionada del grupo de interferón gamma (IFN-$\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-$\alpha$) y proteína inflamatoria de macrófagos-1$\beta$ (MIP-1$\beta$). El interferón-$\gamma$ es secretado por las células NK, las células dendríticas, las células Tc, las células Th1 y similares, y se sabe que es una citoquina que cumple una función importante en la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa para el control del cáncer. Además, el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-$\alpha$) mata las células cancerosas y además participa en la eliminación de intrusos externos como las bacterias, induce la activación de las células T y cumple una función como factor complementario para la producción de anticuerpos a partir de las células B. Por lo tanto, por ejemplo, cuando el valor numérico del interferón-$\gamma$ o factor de necrosis tumoral alfa es menor que el del interferón-$\gamma$ o factor de necrosis tumoral alfa de una persona normal, esto indica que la actividad de las células

NK para el control de cáncer es problemático. Por lo tanto, es posible determinar la actividad de las células NK comparando una cantidad de interferón-γ o factor de necrosis tumoral alfa secretada por las células NK activadas artificialmente con una cantidad de interferón-γ o factor de necrosis tumoral alfa de la persona normal.

Mientras tanto, la proteína inflamatoria de macrófagos-1β(MIP-1β) se puede utilizar como grupo de control para comparar la activación de las células NK. Como se muestra en los siguientes ejemplos, el valor numérico de la proteína inflamatoria de macrófagos-1β(MIP-1β) es similarmente alto tanto en personas normales como en pacientes con cáncer. Por lo tanto, la proteína inflamatoria de macrófagos 1β(MIP-1β) puede usarse para analizar la actividad de las células NK en personas normales y pacientes con cáncer, o puede usarse como un grupo de control para el análisis utilizando un kit de diagnóstico de cáncer.

La cuantificación de las citoquinas secretoras de células NK puede realizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, pero la presente invención no está limitada a los mismos. Por ejemplo, la cuantificación del interferón-γ puede realizarse utilizando un ensayo inmunosorbente ligado a la enzima interferón-γ (ELISA de interferón-γ).

Mientras tanto, al menos una citoquina que incluye interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18, que se utiliza como un agente que sirve para estimular las células NK en la muestra de sangre y artificialmente activar las células NK para generar citoquinas que secretan células NK, pueden estar en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador.

La interleuquina 2, la interleuquina 12, la interleuquina 15 o la interleuquina 18 en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador puede proporcionar una actividad biológica similar y la estabilidad de almacenamiento alta, en comparación con interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18 tipo silvestre. Por ejemplo, cuando la citoquina se une a un péptido estabilizador de este tipo, la citoquina tiene una actividad innata mientras mantiene la estabilidad a pesar de los cambios en el entorno, como secado por congelación.

El péptido de estabilización puede estar unido al terminal N o terminal C de la interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18, y la preparación de tal proteína de fusión puede llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos de preparación de proteínas de fusión.

De acuerdo con una realización ejemplar, un péptido de dominio de cola ácida de terminal C (secuencia de aminoácidos de cola ácida de alfa-sinucleína, ATS) de una familia sinucleína se puede usar como el péptido de estabilización que se puede unir a la interleuquina 2, la interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18, pero la presente invención no se limita a las mismas. La patente registrada coreana número 10-0506766 divulga que un péptido ATS dota a una proteína asociada de fusión con una resistencia contra el estrés ambiental.

De acuerdo con un ejemplo de realización, el péptido de estabilización que puede usarse en el presente documento incluye un péptido estabilizante seleccionado entre residuos de aminoácidos 103-115, residuos de aminoácidos 114-126, residuos de aminoácidos 119-140 y residuos de aminoácidos 130-140 del dominio de cola ácida de terminal C de la α-sinucleína, los residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la β-sinucleína, los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la γ-sinucleína y residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la sinoretina. En la presente invención, se puede realizar una secuencia de aminoácidos de un péptido ATS, un péptido ATS y un procedimiento para preparar una proteína de fusión que incluye la misma utilizando un procedimiento divulgado en la Patente Registrada Coreana No. 10-0506766. Con referencia a los siguientes ejemplos, se muestra que la interleuquina 2, la interleuquina 12, la interleuquina 15 o la interleuquina 18 fusionadas con el péptido ATS son altamente estables y expresan una actividad similar a una versión de tipo silvestre cuando la citoquina es activada por los linfocitos T.

En una realización, la etapa de estimulación de las células NK en una muestra de sangre activa artificialmente de ese modo las células NK para generar citoquinas que secretan las células NK se puede realizar en un medio que contiene una proteína portadora. La proteína de transporte cumple una función para estabilizar las citoquinas como la interleuquina 2, la interleuquina 12, la interleuquina 15 o la interleuquina 18, que se utilizan como agente para estimular las células NK en la muestra de sangre y activar artificialmente las células NK para generar citoquinas secretoras de células NK, y por lo tanto inducir a las células NK a producir más citoquinas secretoras de células NK. La proteína de transporte puede, en ciertas realizaciones, ser albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, pero no está limitada a la misma.

Mientras tanto, el procedimiento de medición de la actividad de células NK se pueden usar para detectar la incidencia o la recaída del cáncer.

La actividad de las células NK se puede medir mediante la comparación de una cantidad de citoquinas que secretan las células NK secretada por las células NK activadas artificialmente con una cantidad de citoquinas que secretan las células NK de la persona normal. En este caso, cuando la cantidad de citoquinas secretoras de células NK es menor que la de las citoquinas secretoras de células NK de la persona normal, se considera que la actividad de las células NK se reduce. Por lo tanto, es posible evaluar el riesgo de cáncer o una recaída del cáncer. Cuando la actividad de las células NK se reduce en comparación con la persona normal, un sujeto puede clasificarse principalmente como un paciente sospechoso de sufrir cáncer o un paciente que tiene una recaída del cáncer. Además, la incidencia o recaída

del cáncer puede diagnosticarse mediante un procedimiento de diagnóstico adicional, como CT, MRI o tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico de cáncer que generalmente se realiza, y mediante una prueba de tejido final. Aunque el procedimiento de acuerdo con la presente invención no es un procedimiento para diagnosticar definitivamente el cáncer, el procedimiento tiene un buen mérito en que la incidencia o recaída del cáncer se puede examinar principalmente utilizando sangre.

Además, la presente invención proporciona un kit para la medición de la actividad de células NK, que incluye un agente, tal como un agonista o activador que sirve para estimular las células NK en una muestra de sangre y activar artificialmente a las células NK para generar citoquinas secretoras de células NK. Tal kit para medir la actividad de las células NK puede usarse para realizar fácilmente el procedimiento mencionado anteriormente para medir la actividad de las células NK.

En el kit para la medición de la actividad de células NK, el agente que sirve para estimular las células NK y activar artificialmente las células NK para generar citoquinas que secretan células NK puede ser al menos una citoquina, LPS o poli I:C, y el citoquina puede seleccionarse de entre el grupo constituido por interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 y la interleuquina 18.

Además del agente que sirve para estimular las células NK y artificialmente activar las células NK para generar las citoquinas que secretan las células NK como el interferón-y, tal kit de diagnóstico de cáncer puede incluir componentes adicionales para la medición de la actividad de las células NK, por ejemplo, un anticuerpo para cuantificar las citoquinas secretoras de células NK y un sustrato. En una realización, el kit de la presente invención comprende además al menos un anticuerpo seleccionado del grupo de un anticuerpo anti-INF-$\gamma$, anticuerpo anti-TNF-$\alpha$ y anticuerpo anti-MIP-1$\beta$.

El anticuerpo en el kit de acuerdo con la presente invención puede fijarse sobre un sustrato sólido. El anticuerpo puede repararse utilizando varios procedimientos como se describe en la literatura (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). El sustrato sólido adecuado puede incluir una placa de cultivo celular, una placa ELISA, un tubo y una película polimérica. Además, el sustrato sólido incluye una barra, un vidrio sintético, una perla de agarosa, una copa, un paquete plano u otras películas o recubrimientos que están soportados o unidos a los soportes sólidos.

Además, el kit de acuerdo con la presente invención puede incluir un reactivo utilizado para el análisis inmunológico con un anticuerpo que reconoce selectivamente las citoquinas secretoras de células NK tal como interferón-$\gamma$. El análisis inmunológico puede incluir todos los procedimientos que pueden medir la unión de un antígeno al anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Tales procedimientos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, un radioinmunoensayo, ELISA, inmunotransferencia, un ensayo de Farr, reacción de precipitina, un procedimiento turbidimétrico, inmunodifusión, electrólisis a contracorriente, inmunodifusión de un solo radical e inmunofluorescencia.

El reactivo utilizado para el análisis inmunológico incluye un portador adecuado, un marcador capaz de generar una señal detectable, un agente de disolución, y un detergente. Además, cuando un material de marcado es una enzima, el reactivo puede incluir un sustrato, que puede medir la actividad enzimática, y un agente de detención de la reacción. El portador adecuado puede incluir, pero no se limita a, un portador soluble, por ejemplo, uno de los tampones fisiológicamente disponibles conocidos en la técnica (por ejemplo, PBS) o un portador insoluble, por ejemplo un polímero tal como partículas magnéticas obtenidas al recubrir un metal sobre poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, poliacrilonitrilo, una resina de flúor, dextrano reticulable, polisacárido y látex, y otros papeles, vidrios, metales, agarosa y combinaciones de los mismos.

Como se puede usar la etiqueta que puede generar una señal detectable, una enzima, un material fluorescente, un material luminiscente y un material radioactivo. Como la enzima, se pueden usar peroxidasa, fosfatasa alcalina, $\beta$-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, malato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, invertasa y similares, y se puede usar fluorescencia de isoticianato fluoresceína o ficobiliproteína como material fluorescente, se puede usar isolucinol o lucigenina como material luminiscente, y se puede usar $I_{131}$, $C_{14}$ o $H_3$ como material radioactivo. Además de los materiales ejemplares, sin embargo, cualquier material que pueda usarse para análisis inmunológico se puede utilizar en el presente documento.

Además, la presente invención proporciona una proteína de fusión que incluye una citoquina unida a un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia sinucleína. Aquí, la citoquina puede ser interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18. Como se describió anteriormente, dicha proteína de fusión puede usarse como el agente que sirve para estimular las células NK y activar artificialmente las células NK para generar células NK. secretoras de citoquinas, y proporciona una mayor estabilidad a pesar de los cambios en entornos tales como secado por congelamiento o almacenamiento a largo plazo, en comparación con una interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 o interleuquina 18 tipo silvestre.

De acuerdo con una realización ejemplar, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión en la que la interleuquina 2 se une al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína.

De acuerdo con otra realización ejemplar, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión en la que la interleuquina 12 está unida al péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína.

De acuerdo con todavía otra realización ejemplar, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión en la que la interleuquina 15 está unido al péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína.

De acuerdo con otra realización ejemplar, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión en la que la interleuquina 18 está unido al péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína.

En la proteína de fusión, el péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína puede también ser seleccionado de residuos de aminoácidos 103-115, residuos de aminoácidos 114-126, residuos de aminoácidos 119-140 y residuos de aminoácidos 130-140 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\alpha$-sinucleína, residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\beta$-sinucleína, residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de $\gamma$-sinucleína y los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la sinoretina.

Además, la presente invención proporciona el uso de la proteína de fusión para la activación de las células NK. Como se describió anteriormente, dicha proteína de fusión se puede usar para activar las células NK en la sangre para promover la secreción de citoquinas secretoras de células NK.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición para activar células NK. En el presente documento, la composición incluye al menos una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en interleuquina 2 unida a un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia de sinucleína, interleuquina 12 unida al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de sinucleína, la interleuquina 15 unida al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína, y la interleuquina 18 unida al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína.

De acuerdo con una realización ejemplar, el péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína puede seleccionarse de residuos de aminoácidos 103-115, residuos de aminoácidos 114-126, residuos de aminoácidos 119-140 y residuos de aminoácidos 130-40 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\alpha$-sinucleína, residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\beta$-sinucleína, residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de $\gamma$-sinucleína y los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la sinoretina.

Mientras tanto, la composición para la activación de las células NK puede incluir un tampón capaz de mantener y almacenar la proteína de fusión, además de las citoquinas fusionadas con el péptido estabilizador.

Además, la presente invención proporciona un kit diagnóstico de cáncer que incluye al menos una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en interleuquina 2 unida a un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia sinucleína, interleuquina 12 unido al terminal C péptido de dominio de cola ácido de la familia de sinucleína, la interleuquina 15 unida al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína e interleuquina 18 unida al péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína. Como se describió anteriormente, cuando una muestra de sangre tomada de un sujeto se incuba con la proteína de fusión, se activan las células NK en la muestra de sangre. Por lo tanto, la actividad de las células NK en el sujeto puede medirse cuantificando el interferón-$\gamma$ generado por la activación de las células NK, diagnosticando así principalmente el cáncer al clasificar a los sujetos que tienen una actividad de células NK más baja que la de una persona normal como pacientes en riesgo de padecer cáncer o tener una recaída de cáncer.

De acuerdo con una forma de realización ejemplar, el péptido dominio de cola ácida de terminal C de la familia sinucleína puede seleccionarse de residuos de aminoácidos 103-115, residuos de aminoácidos 114-126, residuos de aminoácidos 119-140 y residuos de aminoácidos 130-40 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\alpha$-sinucleína, residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\beta$-sinucleína, residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de $\gamma$-sinucleína y los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la sinoretina.

Además de la proteína de fusión, un kit de diagnóstico tal cáncer puede incluir componentes adicionales que se utilizan para realizar el procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo para la cuantificación de las citoquinas que secretan las células NK, y un sustrato. Estos componentes se han descrito anteriormente en relación con el kit para medir la actividad de las células NK. Las instrucciones para usar estos componentes en el procedimiento descrito anteriormente también se pueden incluir en el kit.

Será evidente que estas y otras características, aspectos y ventajas de las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán más completamente en los siguientes ejemplos. También debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Un experto en la materia entenderá que se pueden hacer otros equivalentes y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se reivindica. El alcance de la invención está determinado por las reivindicaciones adjuntas.

**Ejemplos**

**Ejemplo preparativo 1: Construcción del vector de expresión con péptido estabilizador - proteína de fusión de IL**

Para preparar IL-2, IL-12 IL-15 o IL-18 fusionadas con un péptido estabilizador, se construyó un vector de expresión. Sel utilizó un péptido que contenía los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína (SEQ ID NO: 24; en lo sucesivo, denominado "SP") como péptido estabilizador. Los ADNc de IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 e IL-18 se obtuvieron aislando ARN total de linfocitos humanos utilizando un kit de extracción de ARN total (Invitron Biotechnology) y transcribiendo inversamente el ARN total utilizando transcriptasa inversa (Invitrogen). El ADNc resultante se utilizó como plantilla, y se amplificó con PCR utilizando los siguientes cebadores específicos para cada gen de ADNc:

IL2-22-BamH1-F : ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (SEQ ID NO:11)

IL2-153-Xho-R : CACTCTCGAGTCAAGTCAGTGTTGAGAT (SEQ ID NO:12)

IL12-p40-23-BamH : GTGGATCCATATGGGAACTGAAGAAAGATG (SEQIDNO:13)

IL12-p40-328-CT-His : ATGGTGATGATGACTGCAGGGCACAGATGCCC (SEQ ID NO:14)

IL12-p35-23-BamH : GTGGATCCAGAAACCTCCCCGTGGC (SEQ ID NO:15)

IL12-p35-219-CT-His : ATGGTGATGATGGGAAGCATTCAGATAGC (SEQ ID NO:16)

IL15-49-Nde : GAGTCAAGCATATGAACTGGGTGAATGTAA (SEQ ID NO:17)

IL15-162-BamH-R : GTGGATCCAGAAGTGTTGATGAAC (SEQ ID NO:18)

IL18-37-BamH : GTGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG (SEQ ID NO:19) subclonando secuencialmente genes que codifican hIL2 amplificado por PCR y los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína en un vector de expresión pRSETA. Se construyó un producto de fusión SPhIL12p40 subclonando secuencialmente genes que codifican hIL12p40 amplificado por PCR y los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína en un vector de expresión pVL1393. Se construyó un producto de fusión SP-hIL12p35 subclonando secuencialmente genes que codifican hIL12p35 amplificado por PCR y los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína en un vector de expresión pVL1393. Se construyó un producto de fusión hIL15-SP mediante subclonación secuencial de genes que codifican hIL15 amplificado por PCR y los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína en un vector de expresión pRSETA. Se construyó un producto de fusión SP-hIL18 subclonando secuencialmente genes que codifican hIL18 amplificado por PCR y los residuos de aminoácidos 119-140 de la α-sinucleína en un vector de expresión pRSETA. Las secuencias de todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

El ácido nucleico y secuencias de aminoácidos del producto de fusión SP-hIL2 se exponen en SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del producto de fusión SP-hIL12p40 se exponen en SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del producto de fusión SP-hIL12p35 se exponen en SEQ ID NOS: 5 y 6, respectivamente. Como se muestra en la FIG. 1, una secuencia 6X His-tag está contenida en cada vector con el propósito de aislar y purificar el producto de fusión SP-hIL12p40 y el producto de fusión SP-hIL12p35, que fueron expresados por virus. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del producto de fusión hIL15-SP se exponen en SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente. Además, las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del producto de fusión SP-hIL18 se exponen en SEQ ID NOS: 9 y 10, respectivamente.

**Ejemplo de preparación 2: Expresión y purificación de proteína de fusión SP recombinante**

El vector de expresión construido para expresar la proteína SP-hIL2 recombinante se transformó en *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIPL (Invitrogen), y se incubaron. Se centrifugó una solución de cultivo a 10.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sedimento celular. El sedimento celular se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), y luego se homogeneizó por sonicación. La proteína de fusión SP expresada en forma insoluble en *E. coli* se sometió a un procedimiento de replegamiento y luego se purificó utilizando una resina de intercambio iónico.

Los dos vectores de expresión construidos para expresar la proteína SP-hIL12 recombinante se transfectaron en estirpes celulares de insecto, células Sf21, para producir soluciones de cultivo virales, respectivamente. Las dos soluciones de cultivo viral resultantes se transfectaron en una línea celular sf21 de insecto al mismo tiempo para producir una proteína IL12p70 heterodimérica en la que la IL12p40 se unió a la IL12p35, que luego se purificó.

El vector de expresión construido para expresar la proteína hIL15-SP recombinante se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) RIPL (Invitrogen), y después se incubó. Se centrifugó una solución de cultivo a 10.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sedimento celular. El sedimento celular se resuspendió en PBS (pH 7,4) y luego se homogeneizó por

sonicación. La proteína de fusión SP expresada en forma soluble en *E. coli* se purificó utilizando una resina de intercambio iónico.

El vector de expresión construido para expresar la proteína SP-hIL18 recombinante se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) RIPL (Invitrogen), y después se incubó. Se centrifugó una solución de cultivo a 10.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sedimento celular. El sedimento celular se resuspendió en PBS (pH 7,4) y luego se homogeneizó por sonicación. La proteína de fusión SP expresada en forma soluble en *E. coli* se purificó utilizando una resina de intercambio iónico.

La proteína de fusión purificada SP (3UG) se sometió a electroforesis utilizando 15% SDS-PAGE para confirmar una proteína purificada final (figura 2; (a) proteína SP-hIL2 (ATGen, Cat # ATGK04), (b) Proteína IL15- SP (ATGen, Cat # ATGK06), y (c) proteína SPIL18 (ATGen, Cat # ATGK07)).

**Ejemplo experimental 1: Tipos de citoquinas confirmadoras capaces de activar células NK en sangre entera**

Se colocaron 1 ml de sangre entera de una persona normal y 1 ml de un medio RPMI1640 en una placa de cultivo celular de 24 pozos, mezclada con 10 ng/ml de cada una de las interleuquinas humanas recombinantes IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, y luego se cultivaron durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante y se midió una cantidad de interferón-y en el sobrenadante utilizando un procedimiento ELISA tipo emparedado (Figura 3A). Como resultado, las citoquinas secretadas por las células NK en la muestra de sangre de la persona normal no se detectaron debido a su cantidad de trazas, pero cuando la muestra de sangre se trató con al menos uno de IL-2, IL-12, IL-15 y IL-18, se aumentó el nivel de citoquinas secretadas por las células NK en la muestra de sangre. Cuando la muestra de sangre se trató con un estimulador de células NK solo, se observó que un nivel de interferón-$\gamma$ en la muestra de sangre aumentó especialmente en los grupos tratados con IL-2 e IL-12 (Figura 3A).

Además, se pusieron 1 ml de sangre entera de una persona normal y 1 ml de un medio RPMI1640 en una placa de cultivo celular de 24 pozos, se trató con varias combinaciones de interleuquinas humanas recombinantes como se muestra en la figura. 3B (cada 10 ng/ml), y cultivadas durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante y se midió un nivel de interferón-y de la misma manera que se describió anteriormente. Cuando se trató la sangre entera con varias combinaciones de estimuladores de células NK, se observó que un nivel de interferón-$\gamma$ aumentaba especialmente en presencia de IL-2+IL-12 (Figura 3B).

Además, con el fin de medir un nivel de interferón-y después del tratamiento con una combinación de IL-12 e IL-15, la sangre entera se trató con una concentración del estimulador de células NK tal como se muestra en la figura. 3C, y cultivado durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante y se midió un nivel de interferón-$\gamma$ de la misma manera que se describió anteriormente.

Con el fin de medir un nivel de interferón-y después de que el tratamiento de una combinación de IL-12 e IL-18, la sangre entera fue también tratada con una concentración del estimulador de células NK tal como se muestra en la figura 3D, y luego cultivado durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante y se midió un nivel de interferón-y de la misma manera que se describió anteriormente.

**Ejemplo Experimental 2: Confirmación de tipos de citoquinas secretadas de células NK activadas artificialmente con IL-2**

Se tomaron muestras de sangre entera de 61 personas normales y 50 pacientes con cáncer. Se colocaron 1 ml de sangre entera y 1 ml de un medio RPMI1640 en una placa de cultivo celular de 24 pozos, se trataron con 10 ng/ml de una interleuquina humana recombinante SP IL-2 y luego se cultivaron durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante, y luego se midieron los niveles de interferón-$\gamma$, TNF-$\alpha$ y MIP-1$\beta$ utilizando un procedimiento ELISA tipo emparedado. Como resultado, se confirmó que el interferón-$\gamma$ y TNF-$\alpha$ fueron secretados de la sangre entera de la persona normal en una cantidad menor que la del paciente con cáncer, pero el MIP-1$\beta$ fue secretado de las muestras de sangre entera de la persona normal y el paciente con cáncer, como se muestra en la FIG. 4.

En el caso de reactivos de diagnóstico *in vitro* utilizados en un ensayo de enfermedad, se utilizaron una variedad de técnicas de validación. En general, se usaron en este documento un intervalo normal y un ensayo de corte. El rango normal es un rango de referencia que se utiliza para medir un valor promedio y una desviación estándar de cada grupo de muestras, y el ensayo de corte es un procedimiento para medir la sensibilidad y especificidad clínica mediante el cálculo de un valor estimado de un reactivo de diagnóstico *in vitro*. La sensibilidad clínica significa una probabilidad de que se demuestre que muestra resultados positivos de una prueba de diagnóstico cuando un paciente sufre de una enfermedad, y la especificidad clínica significa una probabilidad de que se demuestre que muestra resultados negativos de la prueba de diagnóstico cuando un paciente no padece una enfermedad.

Se supone que, cuando un valor de corte es más de 10% y menos del 10%, el valor de corte se ajusta a valores positivos y negativos, respectivamente. Luego, la sensibilidad clínica y la especificidad clínica se midieron utilizando un ensayo de corte. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

**Tabla 1**

| | IFN-γ | TNF-α | MIP-1β |
|---|---|---|---|
| **Sensibilidad clínica (%)** | **98,4** | **90,9** | **100** |
| **Especificidad clínica (%)** | **98.0** | **69.0** | **50** |

En los grupos de pacientes de cáncer y las personas normales, IFN-γ se midió para tener una sensibilidad del 98,4% y una especificidad del 98%. Aunque se midió que el TNF-α tenía una sensibilidad del 90,9% y una especificidad del 69%, que eran más bajas que las de IFN-γ, los kits de diagnóstico de cáncer desarrollados hasta la fecha tienen una especificidad de como máximo del 20 al 30%. Por lo tanto, se espera que el TNF-α que tiene una especificidad de aproximadamente el 70% o más también pueda usarse como marcador para kits de diagnóstico de cáncer para medir la actividad de las células NK.

**Ejemplo Experimental 3: Comparación de estabilidades de SP IL-2 e IL-2**

Con el fin de comparar las estabilidades de SP IL-2 e IL-2, se tomaron muestras de sangre entera de dos personas. Se colocaron 1 ml de cada muestra de sangre entera obtenida y 1 ml de un medio RPMI1640 en una placa de cultivo celular de 24 pozos, y luego se agregaron SP IL-2 e IL-2, se mezclaron completamente y luego se cultivaron durante 24 horas. Después del cultivo de 24 horas, se tomó un sobrenadante y se midió un nivel de interferón-y utilizando un procedimiento ELISA tipo emparedado. A partir de los resultados de los ensayos de actividad de IL-2 y SP IL-2, se observó que no había diferencia en las actividades de las dos proteínas (Figura 5A). Sin embargo, cuando la sangre entera se trató con SP IL-2 en lugar de IL-2 en condiciones de cultivo de sangre entera, respectivamente, se pudo confirmar que las células NK fueron activadas por SP IL-2, aumentando así el nivel del interferón-γ (figura 5B). Esto indica que no hay diferencia en las actividades de las dos proteínas, pero la estabilidad de IL-2 aumenta debido a la aplicación de SP.

**Ejemplo Experimental 4: Comparación de la actividad de células NK de personas normales y pacientes con cáncer de acuerdo con las condiciones para la simulación de las células NK**

1 ml de cada una de las muestras de sangre entera tomadas de 20 personas normales y 48 pacientes de cáncer terminal (etapa 3 a 4) y 1 ml de un medio RPMI1640 se colocaron en una placa de cultivo de 24 pozos, cada muestra se dividió en dos subgrupos y los subgrupos se trataron con SP IL-2 (10 ng/ml) (Condición A) y SP IL-2 (5 ng/ml) + IL-12 (5 ng/ml) (condición B), respectivamente, y luego se cultivaron durante 24 horas. Después del cultivo, se tomó un sobrenadante y se midió un nivel de interferón-y utilizando un procedimiento ELISA tipo emparedado.

Como resultado, se observó que aproximadamente el 90% de las personas normales tenían un alto nivel de interferón-γ pero la mayoría de los pacientes con cáncer tiene un bajo nivel de interferón-y en el caso de la condición A, como se muestra en la figura. 6. En el caso de la Condición B, también se observó que las personas normales tenían un nivel alto de interferón y, pero la mayoría de los pacientes con cáncer tenían un nivel bajo de interferón y. Sin embargo, el alto nivel de interferón-y fue mayor en los pacientes con cáncer en el caso de la condición B, en comparación con el caso de la condición A. Cuando la muestra de sangre entera se trata solo con SP IL-2, solo las células NK se activan específicamente (ver el siguiente ejemplo experimental 5 y la figura 7), pero es probable que las células NK se activen junto con las células T cuando la muestra de sangre entera se trata con una combinación de SP IL-2 e IL-12, y por lo tanto un nivel de interferón-y es probable que se incremente por la activación de las células T. Por lo tanto, se considera que es posible observar un alto nivel de interferón-y en algunos de los pacientes con cáncer en los que permanece la actividad de las células T. Cuando los pacientes con cáncer tenían un nivel bajo de interferón y, incluso cuando se trataban con la Condición B, se podía deducir que la inmunidad anticancerígena de las células NK y las inmunidades sistémicas generales disminuían en los pacientes con cáncer. Se considera que se usa como un marcador importante para determinar la progresión o el pronóstico del cáncer.

**Ejemplo experimental 5: Comparación de la actividad de las células NK de personas normales y pacientes con cáncer por IL2 según el tipo de muestras de sangre**

Con el fin de determinar la diferencia en la capacidad de secreción de interferón-y por IL2 de acuerdo con el tipo de muestras de sangre de personas normales, se realizó el siguiente experimento. (a) La capacidad de secreción de interferón-y de las células NK en 1 ng/ml de IL2 de las células T, (b) la capacidad de secreción de interferón-y de las células NK en 1 ng/ml de IL2 de las células NK, (c) se midió la capacidad de secreción de interferón-y de las células NK en 1 ng/ml de IL2 de la sangre entera, y (d) se midió la capacidad de secreción de interferón-y de las células NK de acuerdo con la concentración de IL2 de las PBMC. Los resultados se muestran en la figura 7. El interferón-y se midió de la misma manera que se describió anteriormente. Como resultado, dado que la cantidad de interferón-secretada por la activación de la IL2 en las células T fue cambiada, pero no muy diferente de la del interferón-y de un grupo no tratado, las células T no fueron adecuadas para su uso como una muestra de sangre En la sangre entera, las PBMC y las células NK, existe una diferencia significativa en la cantidad de interferón-y, en comparación con la de

la interferón-y del grupo no tratado. Por lo tanto, la sangre entera, las PBMC y las células NK se evaluaron como muestras de sangre adecuadas para aplicar al procedimiento y kit de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo Experimental 6: Comparación de Actividad de Células NK de personas normales por LPS**

Como otro ejemplo del agente que sirve para estimular las células NK en una muestra de sangre y artificialmente activar las células NK para generar interferón-γ, LPS se utilizó para medir una cantidad de interferón-γ de sangre humana entera. Como se muestra en la FIG. 8, se reveló que la secreción de interferón-γ fue inducida por 50 ng/ml de LPS, lo que indica que las células NK pueden activarse artificialmente para generar el interferón-γ incluso cuando las células NK se estimulan con un agonista inespecífico como LPS

**Ejemplo Experimental 7: Estimulación de células NK por hIL12 y hIL15 fusionado con péptidos estabilizantes**

Como un tubo para la incubación de las células NK, un tubo (BD) que contiene un anticoagulante, heparina de sodio, se adquirió y se utiliza para prevenir la coagulación de la sangre. Se tomaron 5 ml de sangre entera y se colocaron en el tubo que contiene el anticoagulante (heparina de sodio). Se mezcló 1 ml de la sangre entera obtenida con medio RPIM1640 y se añadieron activadores de células NK, SPhIL2/hIL12. La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 16 a 24 horas. La estimulación de las células NK en la sangre entera por el SP hIL2 fusionado con el péptido estabilizador y hIL12 se determinó midiendo una cantidad de interferón-γ en sangre incubada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo Experimental anterior.

Mientras tanto, se midió la cantidad del interferón-γ secretada de acuerdo con las condiciones de cultivo de sangre entera. Tal como se muestra en la figura 9, se reveló que la capacidad de secreción de interferón-γ de las células NK se incrementó cuando las células NK se incubaron en PBS suplementado con una proteína de transporte como la albúmina de suero bovino, en comparación con cuando las células NK se incubaron en PBS.

**Ejemplo experimental 8: Diferencia de la secreción de interferón-y de acuerdo con la etapa de progreso del cáncer**

Para determinar una cantidad de interferón-γ secretada de acuerdo con la etapa de progreso del cáncer, sangre entera del paciente 1 con cáncer (un paciente completamente recuperado del cáncer de mama), paciente 2 con cáncer (un paciente sospechoso de sufrir cáncer cerebral) y una persona normal fue incubada durante 24 horas en medio RPMI1640 suplementado con 100 ng/ml de IL12 y 1000 ng/ml de IL15, y cantidades del interferón-γ secretado se midieron como se describió anteriormente. Además, la sangre entera se sometió a citometría de flujo.

Como resultado, las capacidades de secreción de interferón-y se confirmaron con el fin de que la persona normal, el paciente 1 con cáncer y el paciente 2 con cáncer, como se muestra en la figura. 10. Por lo tanto, se confirmó que las cantidades de interferón-γ secretadas de acuerdo con la etapa de progresión del cáncer eran diferentes. A partir de estos hechos, se vio que el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede usar para medir una cantidad de interferón-γ secretada por las células NK en la muestra de sangre, prediciendo así la incidencia y la etapa de progreso del cáncer, o prediciendo la recaída del cáncer.

**Ejemplo Experimental 9: Cuantificación de interferón-y generada por la estimulación de células NK**

Como un tubo para la incubación de las células NK, un tubo (BD) que contiene un anticoagulante, heparina de sodio, se adquirió y se utiliza para prevenir la coagulación de la sangre. Se tomaron 5 ml de sangre entera de ocho personas normales y se colocaron en el tubo que contenía el anticoagulante (heparina de sodio). Se mezcló 1 ml de la sangre entera obtenida con medio RPIM1640, y se añadieron al mismo SP-hIL12/hIL15-SP unido al péptido estabilizador. La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 16 a 24 horas.

La sangre entera a partir de ocho personas normales se incubaron a 37 °C se centrifugó a 1500 a 2000 g para obtener el suero como sobrenadante. Luego, se tomaron de 150 a 200 ul del suero y se sometieron a ELISA con interferón-γ. El 0,05% de anticuerpo primario Tween (anticuerpo monoclonal anti-interferón-γ humano, ATGen Cat # ATGK02) se diluyó con un tampón de recubrimiento (carbonato de sodio 0,1, pH 9,5) en una proporción de 1: 1000. El anticuerpo primario diluido se dividió en una placa ELISA de microtitulación de 96 pozos (Nunc Maxisorp; NUNC, Naperville, IL) a una dosis de 100 ul/pozo, y se mantuvo a 4 °C durante 16 a 18 horas. Posteriormente, se eliminó una solución en la placa, y la placa se lavó con una solución de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05%) a una dosis de 400 ul/pozo. En este caso, el lavado se realizó tres veces. Luego, el PBS que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) se dividió a una dosis de 300 ul/pozo y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se eliminó una solución en la placa, y la placa se lavó con PBST (una solución de PBS que contenía Tween 20 al 0,05%) a una dosis de 400 ul/pozo. En este caso, el lavado se realizó tres veces. La placa ELISA de microtitulación de 96 pozos recubierta con el anticuerpo primario se selló y se almacenó a 4 °C para su uso.

Una solución estándar de interferón-γ (PBS que contiene 200 ng de humano recombinante de interferón-γ (ATGen, Cat # IFG4001) y 0,05% Proclin 300) se diluyó y se divide en una dosis de 100 ul/pozo en la placa de microtitulación de ELISA de 96 pozos recubierta con el anticuerpo primario, y el suero del paciente preparado en la etapa experimental se dividió a una dosis de 100 ul/pozo, y luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas.

**Tabla 2**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Blanco | Blanco | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| B | Blanco | Blanco | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| C | S1 | S1 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| D | S2 | S2 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| E | S3 | S3 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| F | S4 | S4 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| G | S5 | S5 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| H | S6 | S6 | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK | UK |
| Blanco: Solo tampón, S1-S6: estándar diluido serialmente, y UK (desconocido): suero de paciente | | | | | | | | | | | | |

Después de 2 horas, se eliminó una solución en la placa de ELISA de 96 pozos de microtitulación, y la placa se lavó con una solución de lavado a una dosis de 400 ul/pozo. En este caso, el lavado se realizó tres veces. Luego, un anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal anti interferón biotinilado humano (ATGen Cat # ATGK03)) se diluyó con una solución diluida en una proporción de 1: 500, se dividió a una dosis de 100 ul/pozo y luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se eliminó la solución en la placa, y la placa se lavó tres veces con una solución de lavado a una dosis de 400 ul/pozo. Una solución de estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific, Cat # 21130) se diluyó con una solución diluida en una proporción de 1: 3000, se dividió a una dosis de 100 ul/pozo y luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la solución diluida de estreptavidina HRP conjugada diluida se dividió en la placa ELISA, y se incubó durante 1 hora. Después de la incubación de una hora, se retiró una solución en la placa ELISA de microtitulación de 96 pozos, y la placa se lavó tres veces con una solución de lavado a una dosis de 400 ul/pozo.

Se disolvió 1 mg de tetrametilbenzidina (TMB) en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y la mezcla resultante se diluyó con 9 ml de 0,05 M tampón de citrato fosfato para preparar una solución sustrato. Luego, la solución de sustrato se dividió en la placa a una dosis de 100 ul/pozo, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Una solución de reacción de parada (una solución de ácido sulfúrico 2 N diluida) se dividió en una dosis de 100 ul/pozo para detener la reacción, y la solución de reacción resultante se midió a 450 nm utilizando un lector de ELISA.

Las capacidades de secreción de interferón-y de las células NK medidas utilizando la sangre entera de ocho personas normales se muestran en la FIG. 11. Estos resultados indican que, cuando la citoquina estimula la sangre entera, las células inmunes presentes en la sangre se activan efectivamente para inducir la secreción de interferón-$\gamma$.

Además, después de toda la sangre de las ocho personas normales fue estimulada por la citoquina, la sangre entera se sometió a citometría de flujo. Los resultados se muestran en la figura 12. A partir de estos resultados, se reveló que las células NK expresaban citotoxicidad a medida que las células NK se activaban por la estimulación de la sangre entera. CD56 es un marcador de las células NK, y CD107a es un marcador que indica que las células NK secretan gránulos citotóxicos. Como los resultados de la secreción del interferón-$\gamma$ de la FIG. 11 se correlacionan significativamente con los resultados de citotoxicidad de las células NK de la figura 12, se vio que la capacidad de secreción de interferón-$\gamma$ de las células NK por la estimulación de la sangre entera expresa indirectamente la citotoxicidad de las células NK.

De acuerdo con la presente invención, la incidencia o recaída del cáncer puede diagnosticarse monitorizando los cambios en un sistema inmunitario in vivo y midiendo la actividad de las células NK en la sangre, por ejemplo, en un sujeto con o sospechoso de tener cáncer. Por lo tanto, la presente invención puede ser útil para predecir la incidencia o recaída del cáncer utilizando una muestra de sangre de un sujeto.

Si bien se han descrito realizaciones ejemplares en este documento, debe entenderse que el alcance de la protección está definido por las reivindicaciones dentro de las cuales pueden ser posibles otras variaciones.

**Lista de secuencias**

<110> ATGen Co. Ltd.

<120> Procedimiento para diagnosticar cáncer y kit de diagnóstico que utiliza medición de actividad de células NK

<130> 08921046WO

<150> KR 2011-0012983

<151> 2011-02-14

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 474

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de fusión SP-hIL2

<400> 1

```
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa       60
cctgaagccg gatcccctac ttcaagttct acaaagaaaa cacagctaca actggagcat      120
ttactgctgg atttacagat gattttgaat ggaattaata attacaagaa tcccaaactc      180
accaggatgc tcacatttaa gttttacatg cccaagaagg ccacagaact gaaacatctt      240
cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaaagcaaa      300
aactttcact taagacccag ggacttaatc agcaatatca acgtaatagt tctggaacta      360
aagggatctg aaacaacatt catgtgtgaa tatgctgatg agacagcaac cattgtagaa      420
tttctgaaca gatggattac cttttgtcaa agcatcatct caacactgac ttga            474
```

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión SP-hIL2

<400> 2

```
Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
            20                  25                  30

Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
        35                  40                  45
```

```
Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
    50                  55                  60

Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
65                  70                  75                  80

Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu
                85                  90                  95

Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn
            100                 105                 110

Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
        115                 120                 125

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
    130                 135                 140

Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145                 150                 155
```

<210> 3

<211> 1014

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de fusión SP-hIL12p40

<400> 3

```
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa       60
cctgaagccg gatccatatg ggaactgaag aaagatgttt atgtcgtaga attggattgg      120
tatccggatg cccctggaga aatggtggtc ctcacctgtg acacccctga agaagatggt      180
atcacctgga ccttggacca gagcagtgag gtcttaggct ctggcaaaac cctgaccatc      240
caagtcaaag agtttggaga tgctggccag tacacctgtc acaaaggagg cgaggttcta      300
agccattcgc tcctgctgct tcacaaaaag gaagatggaa tttggtccac tgatatttta      360
aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc tttctaagat gcgaggccaa gaattattct      420
ggacgtttca cctgctggtg gctgacgaca atcagtactg atttgacatt cagtgtcaaa      480
agcagcagag gctcttctga cccccaaggg gtgacgtgcg gagctgctac actctctgca      540
gagagagtca gaggggacaa caaggagtat gagtactcag tggagtgcca ggaggacagt      600
gcctgcccag ctgctgagga gagtctgccc attgaggtca tggtggatgc cgttcacaag      660
ctcaagtatg aaaactacac cagcagcttc ttcatcaggg acatcatcaa acctgaccca      720
cccaagaact tgcagctgaa gccattaaag aattctcggc aggtggaggt cagctgggag      780
taccctgaca cctggagtac tccacattcc tacttctccc tgacattctg cgttcaggtc      840
cagggcaaga gcaagagaga aaagaaagat agagtcttca cggacaagac ctcagccacg      900
gtcatctgcc gcaaaaatgc cagcattagc gtgcgggccc aggaccgcta ctatagctca      960
tcttggagcg aatgggcatc tgtgccctgc agtcatcatc accatcacca ctga           1014
```

<210> 4

<211> 337

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión SP-hIL12p40

<400> 4

```
Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp
            20                  25                  30

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met
        35                  40                  45

Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr
    50                  55                  60

Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly
                85                  90                  95

Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp
            100                 105                 110

Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn
        115                 120                 125

Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr
    130                 135                 140

Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys
145                 150                 155                 160

Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala
                165                 170                 175
```

```
Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr
            180                 185                 190

Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser
        195                 200                 205

Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu
    210                 215                 220

Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro
225                 230                 235                 240

Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu
                245                 250                 255

Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe
            260                 265                 270

Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys
        275                 280                 285

Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg
    290                 295                 300

Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser
305                 310                 315                 320

Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser His His His His His
                325                 330                 335

His
```

<210> 5

<211> 687

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de fusión de SP-hIL12p35

<400> 5

```
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa       60
cctgaagccg gatccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttcccatgc      120
cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa      180
actctagaat tttacccttg cacttctgaa gagattgatc atgaagatat cacaaaagat      240
aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggaattaa ccaagaatga aagctgtctt      300
aactcaagag aaacttcatt tatcacaaac ggtagttgcc tggcctccag aaagacctct      360
tttatgatgg ccctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatgta ccaggtggag      420
ttcaagacca tgaatgcaaa gcttctgatg gaccctaaga ggcaaatctt tctagatcaa      480
aacatgctgg cagttattga tgagctgatg caggccctga atttcaacag tgagactgtg      540
ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat ttttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata      600
cttcttcatg ctttcagaat tcgggcagtg actattgata gagtgatgag ctatctgaat      660
gcttcccatc atcaccatca ccactga                                          687
```

<210> 6

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de SP-hIL12p35

<400> 6

```
Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr
            20                  25                  30

Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu
        35                  40                  45

Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe
    50                  55                  60

Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp
65                  70                  75                  80

Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn
                85                  90                  95

Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser
            100                 105                 110

Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser
        115                 120                 125

Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met
    130                 135                 140

Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln

145                 150                 155                 160

Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr
            180                 185                 190

Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg
        195                 200                 205

Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser His His
    210                 215                 220

His His His His
225
```

<210> 7

<211> 420

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de fusión de hIL15-SP

<400> 7

atgaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 60

catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 120

atgaagtgct ttctcttgga gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtatt 180

catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaaacaaca gtttgtcttc taatgggaat 240

gtaacagaat ctggatgcaa agaatgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt 300

ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttctggatc cgatcctgac 360

aatgaggctt atgaaatgcc ttctgaggaa gggtatcaag actacgaacc tgaagcctaa 420

<210> 8

<211> 139

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de hIL15-SP

<400> 8

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser Gly Ser Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser
115 120 125

Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135

<210> 9

<211> 549

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de fusión de SP-hIL18

<400> 9

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatcctactt tggcaagctt gaatctaaat tatcagtcat aagaaatttg 120

aatgaccaag ttctcttcat tgaccaagga aatcggcctc tatttgaaga tatgactgat 180

tctgactgta gagataatgc accccggacc atatttatta taagtatgta taaagatagc 240

cagcctagag gtatggctgt aactatctct gtgaagtgtg agaaaatttc aactctctcc 300

tgtgagaaca aaattatttc ctttaaggaa atgaatcctc ctgataacat caaggataca 360

aaaagtgaca tcatattctt tcagagaagt gtcccaggac atgataataa gatgcaattt 420

gaatcttcat catacgaagg atactttcta gcttgtgaaa aagagagaga ccttttaaa 480

ctcattttga aaaaagagga tgaattgggg gatagatcta taatgttcac tgttcaaaac 540

gaagactag 549

<210> 10

<211> 182

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de SP-hIL18

<400> 10

```
Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser
            20                  25                  30

Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp
        35                  40                  45

Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg
    50                  55                  60

Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser
65                  70                  75                  80

Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn
            100                 105                 110

Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln
        115                 120                 125

Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
    130                 135                 140

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe
                165                 170                 175

Thr Val Gln Asn Glu Asp
            180
```

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo de IL2-22-BsmH1

<400> 11

acaggatccc ctacttcaag ttct 24

<210> 12

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso de IL2-153-Xho

<400> 12

cactctcgag tcaagtcagt gttgagat 28

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo IL12-p40-23-BamH1

<400> 13

gtggatccat atgggaactg aagaaagatg 30

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso IL12-p40-328-CT-His

<400> 14

atggtgatga tgactgcagg gcacagatgc cc 32

<210> 15

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo IL12-p35-23-BamH1

<400> 15

gtggatccag aaacctcccc gtggc 25

<210> 16

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso IL12-p35-219-CT-His

<400> 16

atggtgatga tgggaagcat tcagatagc 29

<210> 17

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo IL15-49-Nde

<400> 17

gagtcaagca tatgaactgg gtgaatgtaa 30

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso IL15-162-BamH1

<400> 18

gtggatccag aagtgttgat gaac 24

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo IL18-37-BamH1

<400> 19

gtggatccta ctttggcaag cttg 24

<210> 20

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso IL18-193-EcoR1

<400> 20

agactggaat tcctagtctt cgttttg 27

<210> 21

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> humano

```
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1               5                   10                  15
```

```
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
            20                  25                  30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
        35                  40                  45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
    50                  55                  60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65                  70                  75                  80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
                85                  90                  95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
            100                 105                 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
        115                 120                 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
    130                 135                 140
```

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 103-115/alfa sinucleína humana

<400> 22

```
Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp
1               5                   10
```

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 114-126/alfa sinucleína humana

<400> 23

```
Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met Pro Val Asp
1               5                   10                  15

Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
            20
```

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 119-140/alfa sinucleína humana

<400> 24

```
Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln
1               5                   10                  15


Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
            20
```

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 130-140/alfa sinucleína humana

<400> 25

```
Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
1               5                   10
```

<210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> beta sinucleína humana

<400> 26

```
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
1               5                   10                  15


Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
            20                  25                  30


Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45
```

```
Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
    50                  55                  60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
65                  70                  75                  80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
                85                  90                  95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
            100                 105                 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
        115                 120                 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
    130
```

<210> 27

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 85-134/alfa sinucleína humana

<400> 27

```
Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln
1               5                   10                  15

Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met Glu Pro Glu Gly
            20                  25                  30

Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln Glu Tyr Glu Pro
        35                  40                  45

Glu Ala
    50
```

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> gamma sinucleína human (sinoretina)

<400> 28

```
Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val
1               5                   10                  15

Gly Ala Val Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
            20                  25                  30

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
        35                  40                  45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn
    50                  55                  60

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys
65                  70                  75                  80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg
                85                  90                  95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser
            100                 105                 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
        115                 120                 125
```

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Residuos de dominio de cola ácida de terminal C 96-127/alfa sinucleína humana

<400> 29

```
Arg Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala
1               5                   10                  15

Ser Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
            20                  25                  30
```

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para medir la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK), que comprende:

estimular las células NK en una muestra de sangre entera incubando la muestra de sangre entera con un agente que comprende al menos una citoquina estimulante seleccionada del grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 15 e interleuquina 18, activando así artificialmente las células NK para generar y secretar citoquinas secretoras de células NK; y

medir una cantidad de las citoquinas secretoras de células NK secretadas en la muestra de sangre entera y usar la cantidad como medida para evaluar la actividad de las células NK;

en el que las citoquinas secretoras de células NK comprenden interferón gamma (IFN-$\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-$\alpha$), o ambos.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estimulación de las células NK se realiza incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 2, o incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 2 e interleuquina 12, o incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 12 e interleuquina 15, o incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 15.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las citoquinas secretoras de células NK comprenden además la proteína inflamatoria de macrófagos-1$\beta$ (MIP-1$\beta$).

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína inflamatoria de macrófagos-1$\beta$ (MIP-1$\beta$) se usa como grupo de control para comparar la activación de células NK con la de una persona normal.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la medición de la cantidad de las citoquinas secretoras de células NK se realiza mediante inmunoensayo tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una citoquina estimulante está en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el péptido estabilizador es un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia de sinucleína.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el péptido estabilizador comprende los residuos de aminoácidos 103-115 (SEQ ID NO: 22), los residuos de aminoácidos 114-126 (SEQ ID NO: 23), los residuos de aminoácidos 119-140 (SEQ ID NO: 24) o residuos de aminoácidos 130-140 (SEQ ID NO: 25) del dominio de cola ácida de terminal C de la $\alpha$-sinucleína, residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de $\beta$-sinucleína (SEQ ID NO: 27), residuos de aminoácidos 1-127 de $\gamma$- sinucleína (SEQ ID NO: 28), o residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 29).

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de estimular las células NK en una muestra de sangre entera activando artificialmente las células NK para generar y secretar citoquinas secretoras de células NK se realiza en un medio que contiene una proteína de transporte.

10. Una proteína de fusión para su uso en la activación de células NK en sangre entera para promover la secreción de citoquinas secretoras de células NK, dicha proteína de fusión comprende una citoquina unida a un péptido de dominio de cola ácida de terminal C de una familia de sinucleína, seleccionándose la citoquina del grupo que consiste en interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 15 e interleuquina 18.

11. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el péptido de dominio de cola ácida de terminal C de la familia de la sinucleína se selecciona del grupo que consiste en residuos de aminoácidos 103-115 (SEQ ID NO: 22), residuos de aminoácidos 114-126 (SEQ ID NO: 23), residuos de aminoácidos 119-140 (SEQ ID NO: 24) y residuos de aminoácidos 130-140 (SEQ ID NO: 25 ) del dominio de cola ácida de terminal C de la $\alpha$-sinucleína, los residuos de aminoácidos 85-134 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\beta$-sinucleína (SEQ ID NO: 27), los residuos de aminoácidos 1-127 de la $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 28) y los residuos de aminoácidos 96-127 del dominio de cola ácida de terminal C de la $\gamma$-sinucleína (SEQ ID NO: 29)

12. Una composición para activar células NK, que comprende al menos una proteína de fusión como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-11.

13. Un kit para medir la actividad de las células NK que comprende al menos una proteína de fusión como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-11, que comprende además al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-IFN-gamma y un anticuerpo anti-TNF-alfa.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, comprendiendo dicho kit además un anticuerpo anti-MIP-1$\beta$.

15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una citoquina estimulante está en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador, en el que la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad o al menos 90 % de identidad con, o al menos 95% de identidad con, o que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 8 o 10.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento es para detectar la incidencia o recaída de cáncer, en el que una disminución en la cantidad de las citoquinas secretoras de células NK en un sujeto, en comparación con los niveles en individuos normales, es un indicador de incidencia o recaída de cáncer.

17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la medición de la actividad de las células NK comprende comparar la cantidad medida de las citoquinas secretoras de células NK secretadas en la muestra de sangre entera con la de una persona normal.

18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad de las células NK se monitoriza para detectar cambios.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estimulación de las células NK se realiza incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 2 o con interleuquina 2 en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la estimulación de las células NK se realiza incubando la muestra de sangre entera con interleuquina 15, o con interleuquina 15 en forma de una proteína de fusión con un péptido estabilizador.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la citoquina secretora de células NK es interferón gamma (IFN-$\gamma$).

Fig. 1

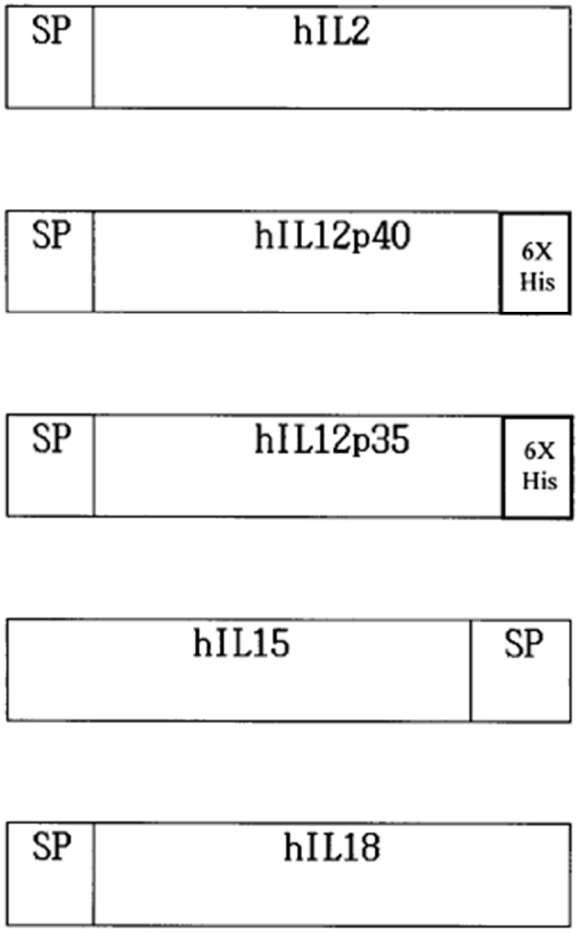

SP
hIL2
SP
hIL12p40
6X His
SP
hIL12p35
6X His
hIL15
SP
SP
hIL18

Fig. 2

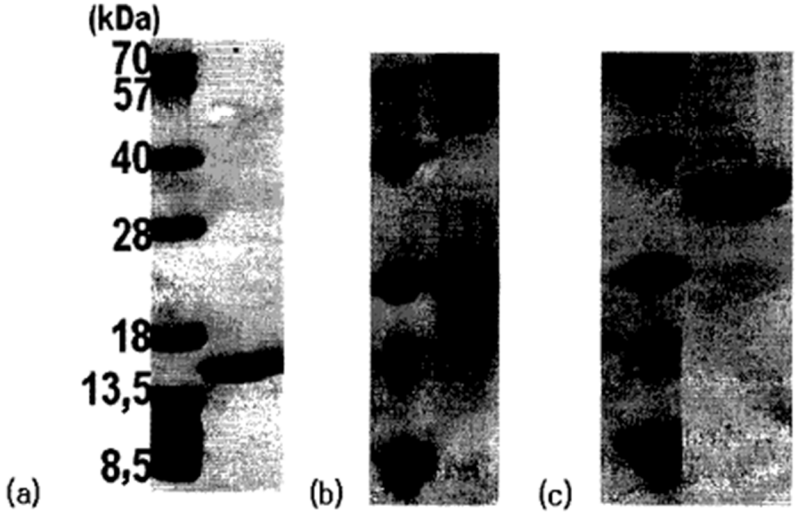
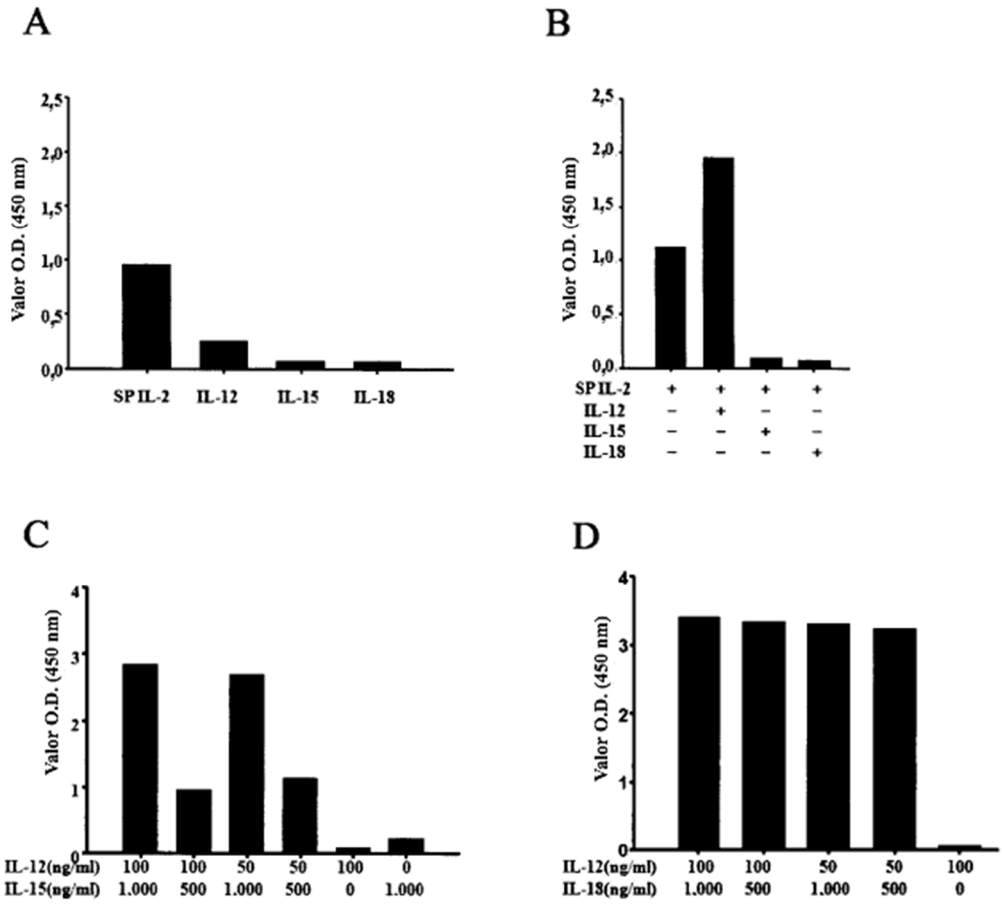

(kDa)
70
57
40
28
18
13,5
8,5
(a)
(b)
(c)

Fig. 3


A
Valor O.D. (450 nm)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
SP IL-2
IL-12
IL-15
IL-18
B
Valor O.D. (450 nm)
SP IL-2 + + + +
IL-12 − + − −
IL-15 − − + −
IL-18 − − − +
C
Valor O.D. (450 nm)
IL-12(ng/ml) 100 100 50 50 100 0
IL-15(ng/ml) 1.000 500 1.000 500 0 1.000
D
Valor O.D. (450 nm)
IL-12(ng/ml) 100 100 50 50 100
IL-18(ng/ml) 1.000 500 1.000 500 0

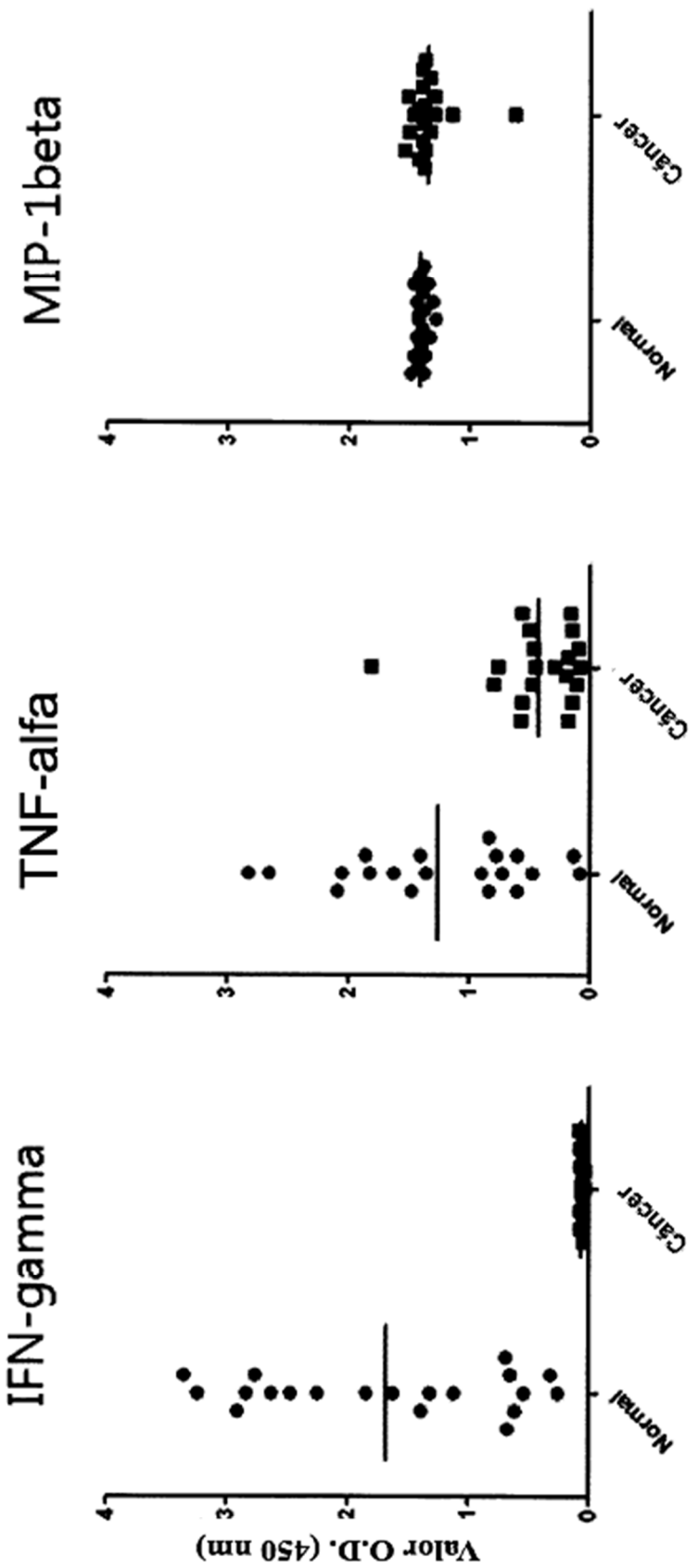

IFN-gamma
TNF-alfa
MIP-1beta
Valor O.D. (450 nm)
0
1
2
3
4
Normal
Cancer

Fig. 4

Fig. 5

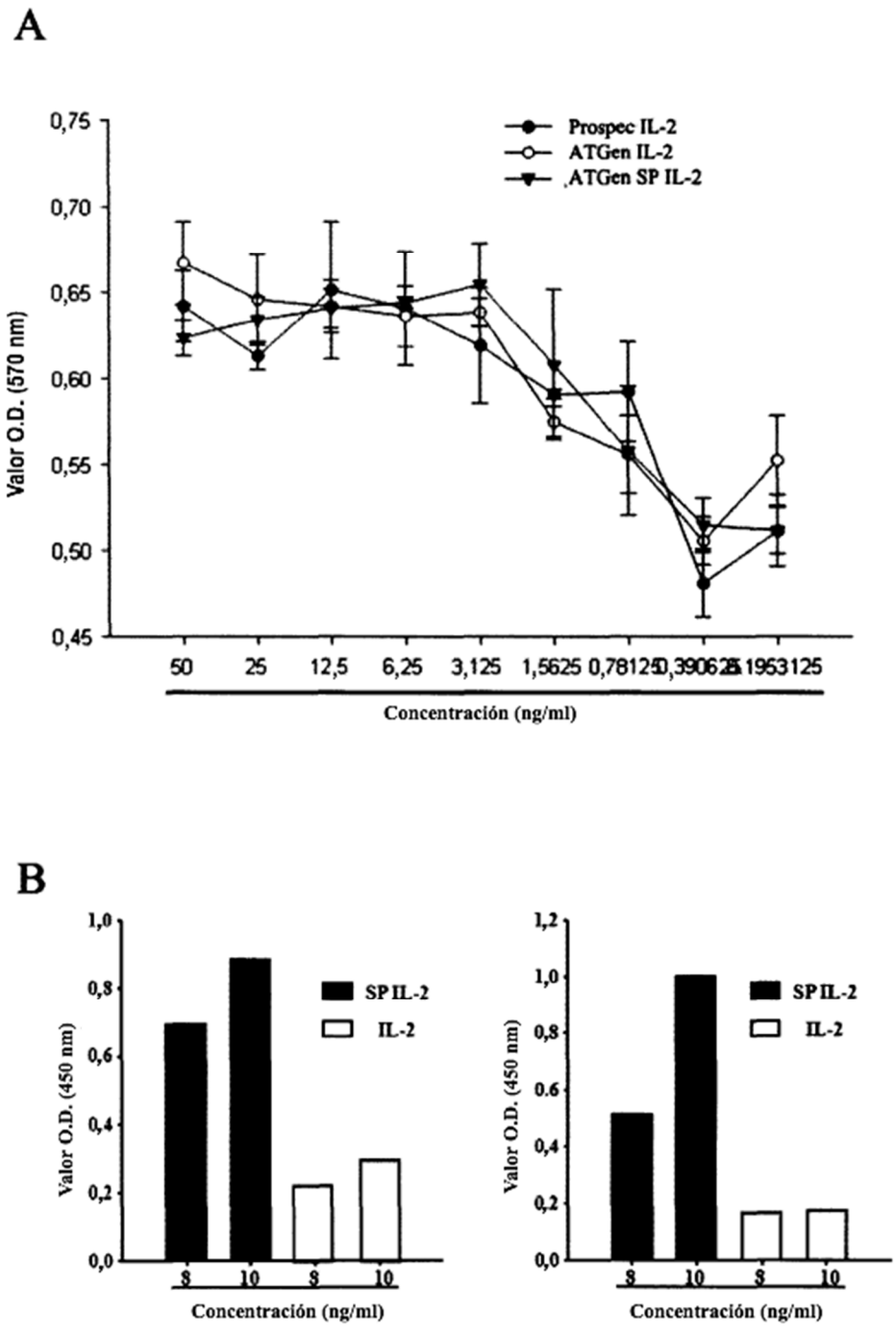

A
Prospec IL-2
ATGen IL-2
ATGen SP IL-2
Valor O.D. (570 nm)
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
50
25
12,5
6,25
3,125
1,5625
0,78125
0,390625
0,1953125
Concentración (ng/ml)
B
Valor O.D. (450 nm)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
SP IL-2
IL-2
S
10
S
10
Concentración (ng/ml)
Valor O.D. (450 nm)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
SP IL-2
IL-2
S
10
S
10
Concentración (ng/ml)

Fig. 6

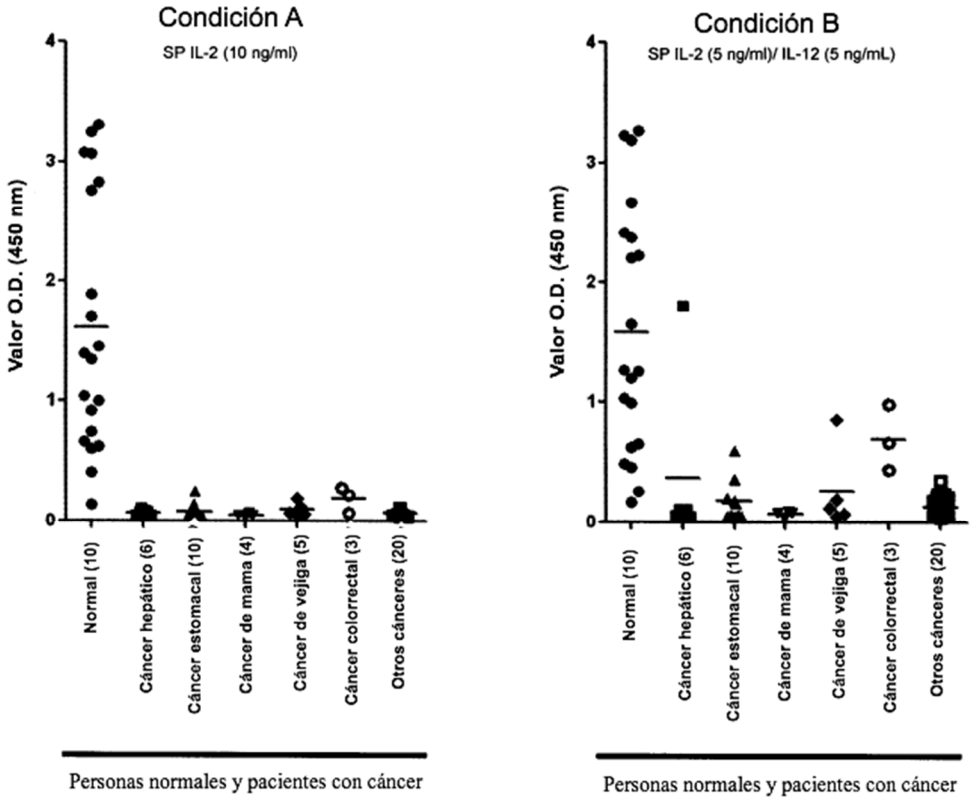

Condición A
SP IL-2 (10 ng/ml)
Valor O.D. (450 nm)
0
1
2
3
4
Normal (10)
Cáncer hepático (6)
Cáncer estomacal (10)
Cáncer de mama (4)
Cáncer de vejiga (5)
Cáncer colorrectal (3)
Otros cánceres (20)
Personas normales y pacientes con cáncer
Condición B
SP IL-2 (5 ng/ml)/ IL-12 (5 ng/mL)
Valor O.D. (450 nm)
0
1
2
3
4
Normal (10)
Cáncer hepático (6)
Cáncer estomacal (10)
Cáncer de mama (4)
Cáncer de vejiga (5)
Cáncer colorrectal (3)
Otros cánceres (20)
Personas normales y pacientes con cáncer

Fig. 7

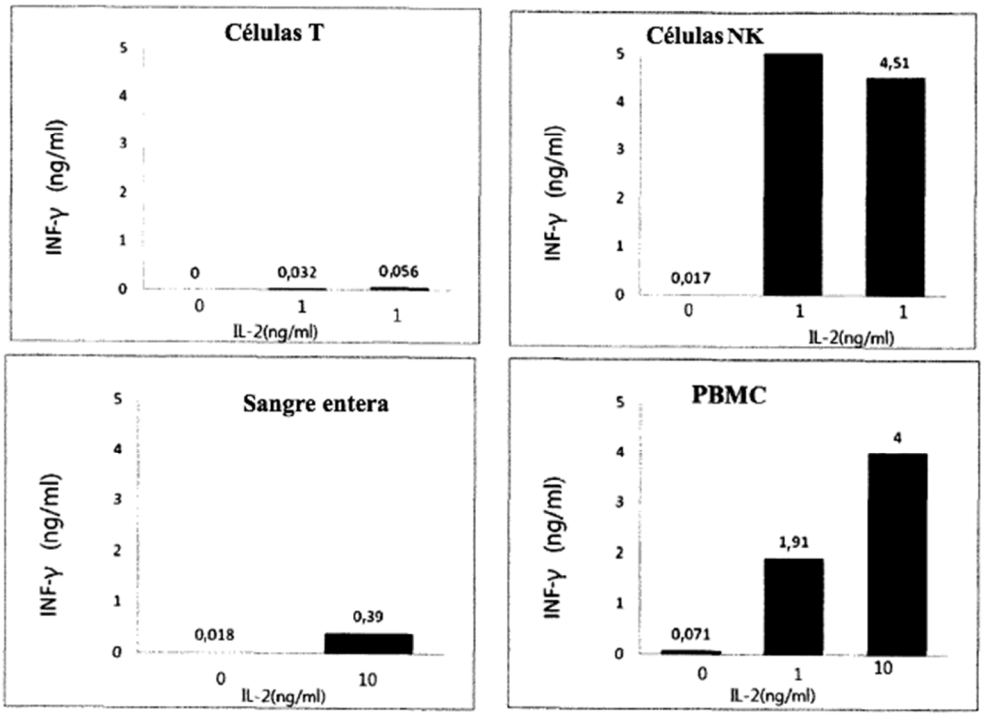

Células T
INF-γ (ng/ml)
0
0,032
0,056
0
1
1
IL-2(ng/ml)
Células NK
INF-γ (ng/ml)
0,017
4,51
0
1
1
IL-2(ng/ml)
Sangre entera
INF-γ (ng/ml)
0,018
0,39
0
10
IL-2(ng/ml)
PBMC
INF-γ (ng/ml)
0,071
1,91
4
0
1
10
IL-2(ng/ml)

Fig. 8

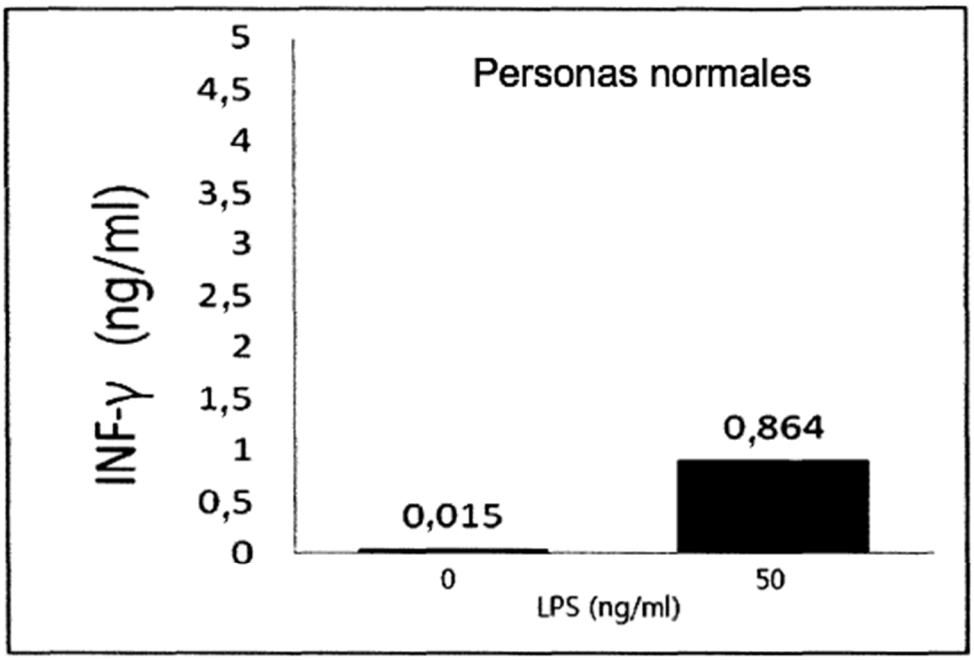

Personas normales
INF-γ (ng/ml)
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,015
0,864
0
50
LPS (ng/ml)

Fig. 9

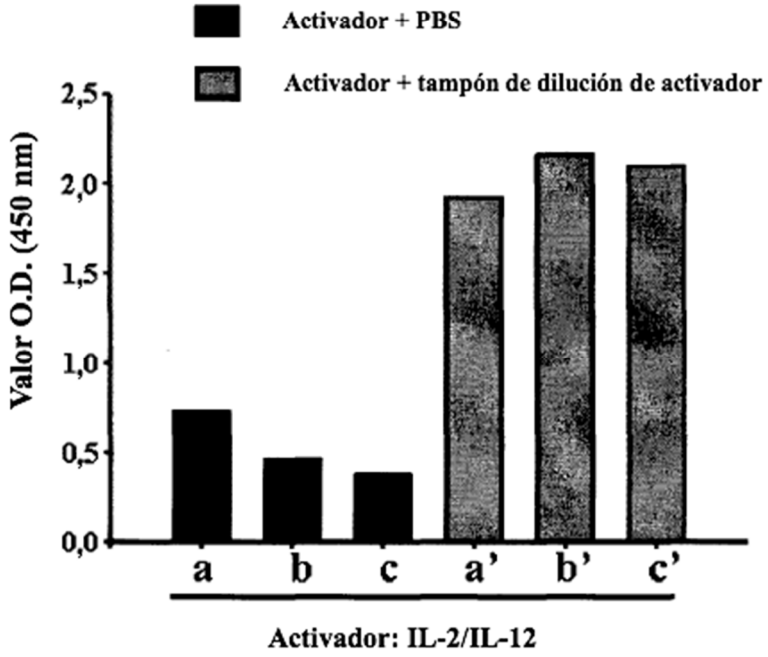

Activador + PBS
Activador + tampón de dilución de activador
Valor O.D. (450 nm)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
a
b
c
a'
b'
c'
Activador: IL-2/IL-12

Fig. 10

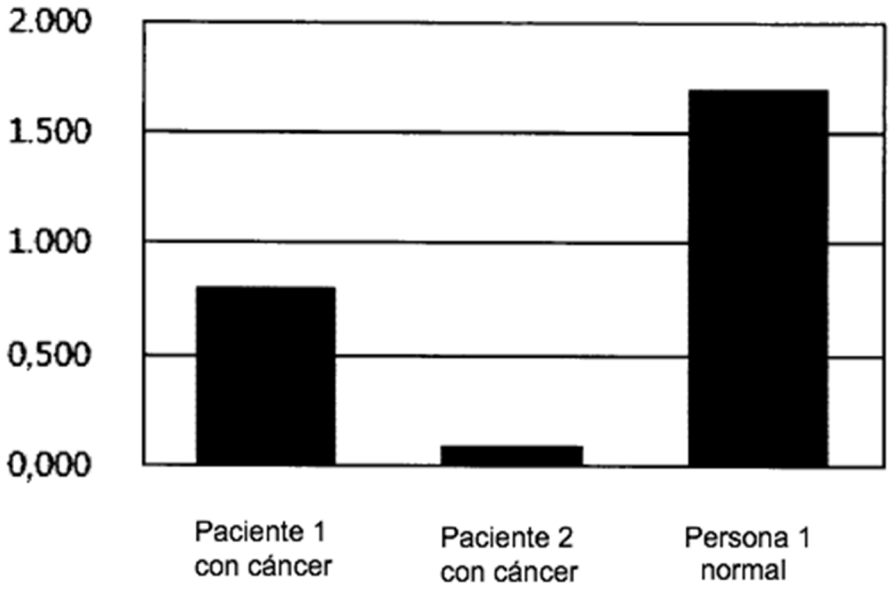
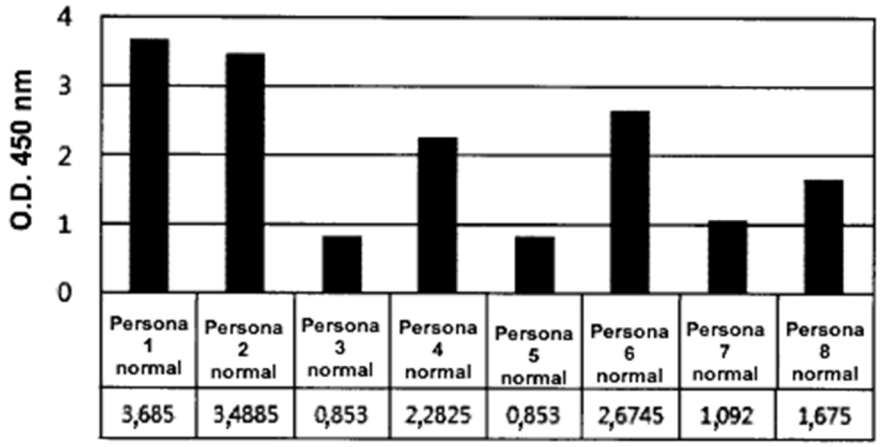

2.000
1.500
1.000
0,500
0,000
Paciente 1 con cáncer
Paciente 2 con cáncer
Persona 1 normal

Fig. 11


O.D. 450 nm
4
3
2
1
0
Persona 1 normal
Persona 2 normal
Persona 3 normal
Persona 4 normal
Persona 5 normal
Persona 6 normal
Persona 7 normal
Persona 8 normal
3,685
3,4885
0,853
2,2825
0,853
2,6745
1,092
1,675

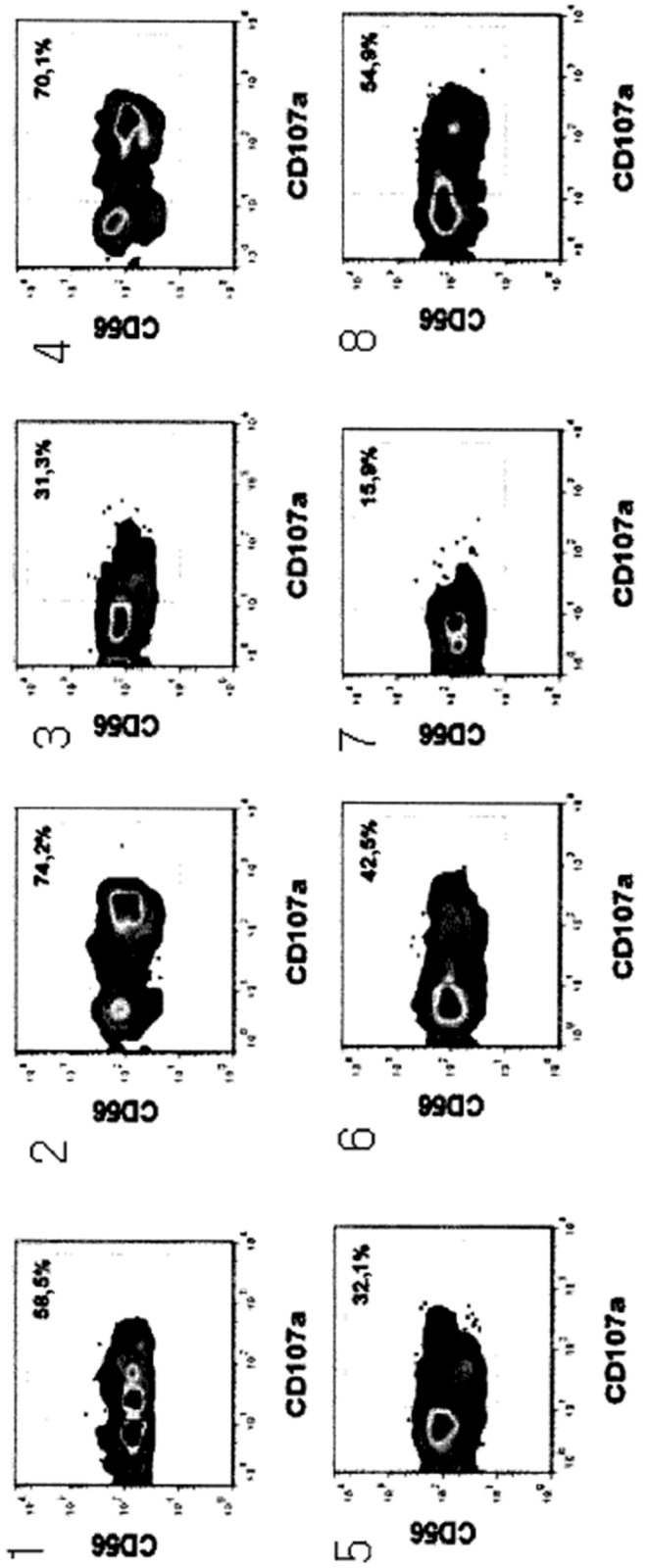

1
58,5%
CD56
CD107a
2
74,2%
CD56
CD107a
3
31,3%
CD56
CD107a
4
70,1%
CD56
CD107a
5
32,1%
CD56
CD107a
6
42,5%
CD56
CD107a
7
15,9%
CD56
CD107a
8
54,9%
CD56
CD107a

Fig. 12