

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS $\gamma\delta$ T

Campo Técnico de la Invención

La presente invención se refiere a un método para la producción de las células $\gamma\delta$ T a partir de las células madre pluripotentes inducidas, de las células $\gamma\delta$ T diferenciadas a partir de las células madre pluripotentes inducidas, de una población de células que contiene las células, y similares.

Antecedentes de la Invención

En los años recientes, la terapia con células inmunitarias ha estado atrayendo la atención con respecto al método de tratamiento para el cáncer. La terapia con células inmunitarias es un método terapéutico que incluye la proliferación y activación de las células inmunitarias afuera del cuerpo del paciente y la administración de las células inmunitarias al paciente para permitir que las células inmunitarias ataquen a las células de cáncer. La terapia con células inmunitarias es conveniente debido a que casi no provoca efectos secundarios en comparación con las tres terapias convencionales principales de tratamiento quirúrgico, terapia de radiación, y quimioterapia. Hay diversas clases de métodos de tratamiento para la terapia con células inmunitarias. Entre ellos, está atrayendo la atención un tratamiento a través del uso de la célula $\gamma\delta$ T, la cual es responsable de la inmunidad natural y tiene una actividad citotóxica contra las células de cáncer.

En la terapia con células $\gamma\delta$ T, se desea el desarrollo de un método de producción para la producción eficiente y el suministro estable de la célula con el fin de lograr la terapia celular. Mientras que se conoce un método para seleccionar solamente las células $\gamma\delta$ T en la sangre del paciente (un método para el cultivo de las células de la sangre en un medio que contiene ácido zoledrónico e IL-2 (Documento de Patente 1)), no se ha reportado un método para la producción de las células $\gamma\delta$ T a partir de las células madre hasta donde están conscientes los presentes inventores.

Lista de Documentos

Documento de Patente

Documento de Patente 1: Publicación Internacional de Patente No. WO 2006/006720

Breve Descripción de la Invención

Problema técnico

Un problema de la presente invención es proporcionar un método para la producción de las células $\gamma\delta$ T a partir de las células madre. También es un problema de la presente invención proporcionar células $\gamma\delta$ T diferenciadas a partir de las células madre, y una población de células que contenga las células.

Solución al problema

Los presentes inventores han llevado a cabo intensos estudios en un intento por resolver los problemas que se mencionan en el párrafo anterior, y encontraron que las células $\gamma\delta$ T se pueden obtener con eficiencia por medio de la inducción de las células madre pluripotentes a partir de las células diferentes de las células $\alpha\beta$ T y además la inducción de las células hasta las células T. Por otra parte, las células $\gamma\delta$ T que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) se prepararon por medio de la introducción del gen de CAR en las células $\gamma\delta$ T obtenidas de esta forma. Se reveló que las células

$\gamma\delta$ T muestran una alta citotoxicidad incluso para las células de cáncer que son difíciles de reconocer y de dañar con las células $\gamma\delta$ T antes de la introducción. Los presentes inventores condujeron además estudios con base en estos hallazgos y llevaron a cabo la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un método para la producción de una célula $\gamma\delta$ T a partir de una célula madre pluripotente inducida, en donde la célula madre pluripotente inducida se deriva a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T.

[2] El método de [1], el cual comprende los siguientes pasos:

(1) un paso para establecer una célula madre pluripotente inducida a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T, y

(2) un paso para diferenciar la célula madre pluripotente inducida establecida en el paso (1) en una célula T.

[3] El método de [1] o [2], en donde la célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T es una célula mononuclear diferente de una célula $\alpha\beta$ T.

[4] El método de cualquiera de [1] a [3], en donde la célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T es un monocito.

[5] El método de cualquiera de [2] a [4], el cual comprende un paso para la introducción de:

(i) un ácido nucleico que codifica el α TCR y un ácido nucleico que codifica el β TCR,

(ii) un ácido nucleico que codifica el γ TCR y un ácido nucleico que codifica el δ TCR, y/o

(iii) un ácido nucleico que codifica el CAR,

cada uno de los cuales reconoce y se enlaza a un antígeno específico de tumor o a un antígeno asociado con un tumor, en el interior de la célula que se obtiene en cualquiera de los pasos (1), y (2).

[6] El método de [5], en donde el γ TCR es $V\gamma 9$ TCR y el δ TCR es $V\delta 2$ TCR.

[7] El método de cualquiera de [1] a [6], el cual comprende un paso de introducir un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende IL-15 e IL-15R α en el interior de la célula que se obtiene en cualquiera de los pasos (1) y (2).

[8] Una célula $\gamma\delta$ T derivada a partir de una célula madre pluripotente inducida, en donde la célula madre pluripotente inducida se deriva a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T.

[9] Una célula $\gamma\delta$ T producida por medio del método de cualquiera de [1] a [7].

[10] La célula de [8] o [9], en donde la célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T es una célula mononuclear diferente de una célula $\alpha\beta$ T.

[11] La célula de cualquiera de [8] a [10], en donde la célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T es un monocito.

[12] La célula de cualquiera de [8] a [11], en donde la célula $\gamma\delta$ T expresa $V\gamma 9$ TCR y $V\delta 2$ TCR.

[13] La célula de cualquiera de [8] a [12], en donde la célula $\gamma\delta$ T expresa el CAR.

[14] La célula de cualquiera de [8] a [13], en donde la célula $\gamma\delta$ T expresa una proteína de fusión que comprende IL-15 e IL-15R α .

[15] Una población de células en donde no menos del 90 por ciento de todas las células son células

$\gamma\delta T$, en donde la célula $\gamma\delta T$ es una célula diferenciada a partir de una célula madre pluripotente inducida derivada a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta T$.

[16] Un medicamento que comprende la célula de cualquiera de [8] a [14] o la población de las células de [15].

5 [17] El medicamento de [16] para usarse en la prevención o el tratamiento de tumores.

[18] Un agente de aniquilación para una célula, el cual comprende la célula de cualquiera de [8] a [14] o la población de las células de [15].

[19] La célula de cualquiera de [8] a [14] o la población de las células de [15], para usarse en la prevención o el tratamiento de tumores.

10 [20] El uso de la célula de cualquiera de [8] a [14] o la población de las células de [15] en la elaboración de un agente preventivo o de un agente terapéutico para tumores.

[21] Un método para la prevención o el tratamiento de tumores, el cual comprende la administración de la célula de cualquiera de [8] a [14] o de la población de las células de [15].

Efectos convenientes de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un método para la producción de las células $\gamma\delta T$ a partir de las células madre pluripotentes inducidas, de las células $\gamma\delta T$ diferenciadas a partir de las células madre pluripotentes inducidas, de una población de células que contiene las células, y similares. De una forma adicional, de entre las células $\gamma\delta T$ que se producen por medio del método mencionado anteriormente, las células que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus
20 siglas en inglés) pueden mostrar una alta actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* específica del antígeno reconocido por el CAR.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra los resultados que se obtienen a través de la tinción de las células adquiridas a través del uso de un conjunto de anticuerpos (V δ 1 Myltenyi FITC, V δ 2 Myltenyi APC, $\gamma\delta$ TCR BD BV510, CD3 BioLegend APC/Cy7 y $\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC). Los picos rellenos muestran los resultados del
25 grupo no teñido, y los picos en blanco muestran los resultados de la tinción a través del uso de cada anticuerpo específico del antígeno.

La figura 2 muestra los resultados de citometría de flujo que se obtienen a través de la tinción de las células adquiridas a través del uso de un conjunto de anticuerpos (V δ 1 Myltenyi FITC, V δ 2 Myltenyi APC, $\gamma\delta$ TCR BD BV510, CD3 BioLegend APC/Cy7 y $\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC).
30

La figura 3 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de las células $\gamma\delta T$ adquiridas. El eje vertical muestra la actividad citotóxica (%), y el eje horizontal muestra la proporción del número de células $\gamma\delta T$ mixtas al número de células blanco.

La figura 4 muestra los resultados de la medición de la proliferación celular de las células $\gamma\delta T$ derivadas de las células iPS (células i $\gamma\delta T$). El eje vertical muestra el índice de la proliferación celular, y el
35 eje horizontal muestra el número de los días transcurridos a partir del día en el que se inició del estímulo con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y el anticuerpo anti-CD30.

La figura 5 muestra la expresión de las moléculas de CD3 y $\gamma\delta$ TCR sobre la superficie de la

membrana celular de las células $\gamma\delta$ T (células i γ 9 δ 2T) diferenciadas por medio de la introducción del gen V γ 9V δ 2TCR en las células iPS.

La figura 6 muestra la expresión de las moléculas de CD3 y $\gamma\delta$ TCR sobre la superficie de la membrana celular de las células $\gamma\delta$ T (células iH γ 9 δ 2T) diferenciadas por medio de la introducción del gen V γ 9V δ 2TCR en las células progenitoras hematopoyéticas (HPC, por sus siglas en inglés).

La figura 7 muestra los resultados de la medición de la proliferación celular de las células i $\gamma\delta$ T (células iCD19CAR /IL-15 $\gamma\delta$ T) que expresan el gen de CAR anti-CD19. El eje vertical muestra el número de células, y el eje horizontal muestra el número de los días transcurridos a partir del día en el que se inició el estímulo con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y el anticuerpo anti-CD30.

La figura 8 muestra los resultados de la medición de la proliferación celular de las células iH γ 9 δ 2T (iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T) que expresan el gen de CAR anti-CD19. El eje vertical muestra el número de células, y el eje horizontal muestra el número de los días transcurridos a partir del día en el que se inició el estímulo con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1).

La figura 9 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de las células i $\gamma\delta$ T (células iCD19CAR /IL-15 $\gamma\delta$ T) que expresan el gen de CAR anti-CD19. El eje vertical muestra el índice de lesión de la célula blanco (%), y el eje horizontal muestra la proporción del número de las células iCD19CAR /IL-15 $\gamma\delta$ T mixtas al número de las células blanco.

La figura 10 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de las células iH γ 9 δ 2T (células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T) que expresan el gen de CAR anti-CD19. El eje vertical muestra el índice de lesión de la célula blanco (%), y el eje horizontal muestra la proporción del número de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T mixtas al número de las células blanco.

La figura 11 muestra el efecto de la administración *in vivo* de las células i $\gamma\delta$ T (células iCD19CAR /IL-15 $\gamma\delta$ T) que expresan el gen de CAR anti-CD19 sobre el número de días de supervivencia de un ratón portador de tumor positivo para la CD19 humana. El eje vertical muestra el índice de supervivencia del ratón, y el eje horizontal muestra el número de los días transcurridos a partir del día en el que se trasplantaron las células de cáncer.

La figura 12 muestra el efecto antitumoral de la administración *in vivo* de las células iH γ 9 δ 2T que expresan el gen de CAR anti-CD19 (iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T) sobre el ratón trasplantado con un tumor humano que expresa la luciferasa.

Descripción Detallada de la Invención

En la presente memoria descriptiva, la "expresión génica" abarca tanto la síntesis de ARNm a partir de una secuencia de nucleótidos específica del gen (también referida como la transcripción o la expresión del ARNm), así como la síntesis de proteína basada en la información del ARNm (también referida como la traducción o la expresión de proteína). A menos que se especifique de alguna otra manera, la "expresión génica" o simplemente la "expresión" significa la expresión de la proteína.

En la presente memoria descriptiva, "positiva" significa que una proteína o un ARNm se expresa en una cantidad detectable por medio de un método conocido en la materia. La proteína se puede detectar por medio de un ensayo inmunológico a través del uso de un anticuerpo, tal como un ELISA, inmunotinción,

y citometría de flujo. En el caso de una proteína que se expresa intracelularmente y no aparece sobre la superficie celular (por ejemplo, el factor de la transcripción o una subunidad del mismo, y similares), una proteína reportera se expresa junto con la proteína, y la proteína blanco se puede detectar por medio de la detección de la proteína reportera. El ARNm se puede detectar, por ejemplo, por medio del método de amplificación de ácido nucleico y/o del método de detección de ácido nucleico, tal como RT-PCR, micromatriz, biochip, ARNseq y similares.

En la presente memoria descriptiva, "negativa" significa que el nivel de expresión de la proteína o del ARNm es menor que el límite inferior de detección por medio de todos o de cualquiera de los métodos conocidos mencionados en lo anterior. El límite inferior de detección de la expresión de la proteína o del ARNm puede variar dependiendo de cada método.

En la presente memoria descriptiva, positiva también se indica como "que expresa la proteína o el ARNm", y negativa también se indica como "que no expresa la proteína o el ARNm". Por lo tanto, el ajuste de la "presencia o ausencia de expresión" significa colocar la célula en un estado en el que el nivel de expresión de la detección de la proteína blanco o del ARNm no es menor que el límite de detección inferior (positiva) o es menor que el límite de detección inferior (negativa).

En la presente memoria descriptiva, el "cultivo" se refiere a mantener, proliferar (hacer crecer) y/o diferenciar las células en un medio ambiente *in vitro*. "Cultivo" significa mantener, proliferar (hacer crecer) y/o diferenciar las células extra-tejido o *ex vivo*, por ejemplo, en una placa, plato o matraz de cultivo celular.

En la presente memoria descriptiva, "concentrar" se refiere a aumentar la proporción de un componente constituyente particular en una composición tal como una composición celular y similares, y "concentrada" cuando se utiliza para describir una composición celular tal como una población de células significa que la cantidad de un componente constituyente particular en la población de las células se ha incrementado partir de aquella del componente en la población de las células antes de concentrarse. Por ejemplo, una composición tal como una población de células y similares se puede concentrar para el tipo de la célula blanco. Por lo tanto, la proporción del tipo de la célula blanco aumenta en comparación con la proporción de la célula blanco presente en la población de las células antes de concentrarse. Una población de las células también se puede concentrar para el tipo de la célula blanco por medio de un método de selección o de un método de clasificación de células conocido en la materia. La población de las células también se puede concentrar por medio de un método de cultivo particular, de una clasificación, o de un proceso de selección, tal y como se describe en la presente memoria descriptiva. En una modalidad particular de la presente invención, la población de las células se concentra por cuando menos el 10 por ciento, 20 por ciento, 30 por ciento, 40 por ciento, 50 por ciento, 60 por ciento, 70 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento de la población de las células blanco por medio de un método para concentrar la población de las células blanco.

En la presente memoria descriptiva, el "cultivo en expansión" significa cultivar para el propósito de proliferar una población de células deseada y aumentar el número de células. El aumento en el número de las células se puede lograr por medio del aumento del número de las células por medio de la proliferación hasta exceder la disminución en el número por su muerte, y no requiere de la proliferación de todas las

células en la población de células. El aumento en el número de células puede ser de 1.1 veces, 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 300 veces, 500 veces, 1000 veces, 3000 veces, 5000 veces, 10,000 veces, 100,000 veces, o no menos de 1,000,000 veces, en comparación con aquel antes del inicio del cultivo en expansión.

En la presente memoria descriptiva, "estímulo" significa que una sustancia determinada se enlaza a diversos receptores y similares para activar una vía de señales corriente abajo de la misma.

En la presente memoria descriptiva, la "población de células" significa dos o más células del mismo tipo o de diferentes tipos. La "población de células" también significa una masa de las células del mismo tipo o de diferentes tipos.

1. Método para la producción de las células $\gamma\delta$ T a partir de las células madre pluripotentes inducidas

La presente invención proporciona un método para la producción de las células $\gamma\delta$ T a partir de las células madre pluripotentes inducidas, y de una población de células que contiene las células $\gamma\delta$ T (más adelante en la presente algunas veces será abreviado como "el método de producción de la presente invención"). El método de producción de la presente invención incluye un paso para diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células T. Las células madre pluripotentes inducidas que se usan para el método de producción de la presente invención pueden ser las células ya establecidas y abastecidas, y las células madre pluripotentes inducidas se puede establecer a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T. En una modalidad de la presente invención, por lo tanto, el método de producción de la presente invención incluye: (1) un paso para establecer la célula madre pluripotente inducida a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T, y (2) un paso para diferenciar la célula madre pluripotente inducida establecida en el paso (1) en una célula T.

En la presente invención, el "receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés)" está constituido de un dímero de cadenas de TCR (cadena α , cadena β , cadena γ , cadena δ). La "célula $\gamma\delta$ T" significa una célula que expresa CD3, y expresa el TCR constituido de la cadena de TCR γ (γ TCR), y la cadena de TCR δ (δ TCR) (más adelante en la presente es algunas veces referida como " $\gamma\delta$ TCR"). La "célula $\alpha\beta$ T" significa una célula que expresa CD3, y expresa el TCR constituido de la cadena de TCR α (α TCR) y la cadena de TCR β (β TCR) (más adelante en la presente es algunas veces referida como " $\alpha\beta$ TCR"). Casi todas las células $\alpha\beta$ T reconocen el complejo del antígeno de péptido-MHC (complejo de histocompatibilidad mayor, en el caso del HLA humano: antígeno de leucocitos humano) por medio del $\alpha\beta$ TCR (esto será referido como restricción del MHC). En contraste, la célula $\gamma\delta$ T reconoce diversas moléculas expresadas por las células, por el $\gamma\delta$ TCR, independientemente de la molécula del MHC. Cada cadena de TCR está constituida de una región variable y una región constante, y la región variable contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3). El gen de TCR está constituido de muchos segmentos genéticos V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante) en el genoma. La reconstitución genética se lleva a cabo durante el proceso de diferenciación y maduración de las células T, cada uno de D y J se seleccionan de una manera aleatoria y se enlazan en el gen de la cadena β , entonces la reconstitución genética se presenta entre V y DJ. Durante el proceso, inserción y supresión de bases se presenta de una

manera aleatoria entre V-D y D-J, y aumenta la variedad de genes. En el precursor del ARNm de TCR, el empalme de ARN se presenta en la región VDJ y la región C (una región común), y el gen se expresa como un gen de TCR funcional.

Los ejemplos del γ TCR incluyen V γ 1TCR, V γ 2TCR, V γ 3TCR, V γ 4TCR, V γ 5TCR, V γ 6TCR, V γ 7TCR, V γ 8TCR, y V γ 9TCR, y los ejemplos del δ TCR incluyen V δ 1TCR, V δ 2TCR, V δ 3TCR, V δ 4TCR, V δ 5TCR, V δ 6TCR, V δ 7TCR, V δ 8TCR, y V δ 9TCR. Aunque la combinación de los γ TCR y δ TCR específicos no está limitada, por ejemplo, se pueden mencionar V γ 3V δ 1TCR, V γ 4V δ 1TCR, V γ 9V δ 1TCR, y V γ 9V δ 2TCR.

(1) Paso para establecer la célula madre pluripotente inducida

En la presente invención, la "célula madre pluripotente inducida" (más adelante en la presente será algunas veces referida como "célula iPS") significa una célula madre que se establece por medio de la introducción de un factor de reprogramación en una célula somática, que tiene pluripotencia que permite su diferenciación en muchas células presentes en los organismos vivos, y que también tiene capacidad de proliferación. Abarca cualquier célula inducida en una célula progenitora hematopoyética para usarse en la presente invención. La célula madre pluripotente inducida de preferencia se deriva a partir de un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, hámster, cobayo, perro, mono, orangután, chimpancé, humano), de una manera más preferible de un ser humano.

Un método para establecer una célula madre pluripotente inducida se conoce en el campo pertinente, y la célula se puede establecer por medio de la introducción de un factor de reprogramación en cualquier célula somática. Como se utiliza en el presente documento, el factor de reprogramación incluye, por ejemplo, los genes y los productos génicos, tales como Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1, beta-catenina, Lin28b, Sall1, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3, Glis1 y similares. Estos factores de reprogramación se pueden utilizar solos o en combinación. El factor de reprogramación en combinación se ejemplifica por medio de las combinaciones que se describen en las Publicaciones Internacionales de Patente Nos. WO 2007/069666, WO 2008/118820, WO 2009/007852, WO 2009/032194, WO 2009/058413, WO 2009/057831, WO 2009/075119, WO 2009/079007, WO 2009/091659, WO 2009/101084, WO 2009/101407, WO 2009/102983, WO 2009/114949, WO 2009/117439, WO 2009/126250, WO 2009/126251, WO 2009/126655, WO 2009/157593, WO 2010/009015, WO 2010/033906, WO 2010/033920, WO 2010/042800, WO 2010/050626, WO 2010/056831, WO 2010/068955, WO 2010/098419, WO 2010/102267, WO 2010/111409, WO 2010/111422, WO 2010/115050, WO 2010/124290, WO 2010/147395, WO 2010/147612, en Huangfu D y colaboradores (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797, Shi Y y colaboradores (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528, Eminli S y colaboradores (2008), Stem Cells. 26: 2467-2474, Huangfu D y colaboradores (2008), Nat. Biotechnol. 26: 1269-1275, Shi Y y colaboradores (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574, Zhao Y y colaboradores (2008), Cell Stem Cell, 3: 475-479, Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135, Feng B y colaboradores (2009), Nat. Cell Biol. 11: 197-203, R. L. Judson y colaboradores (2009), Nat. Biotechnol., 27: 459-461, Lyssiotis C A y colaboradores (2009), Proc Natl Acad Sci EUA, 106: 8912-8917, Kim J B y colaboradores (2009), Nature. 461: 649-643, Ichida J K y colaboradores (2009), Cell Stem Cell. 5: 491-503, Heng J C y colaboradores (2010), Cell Stem Cell. 6: 167-74, Han J y

colaboradores (2010), *Nature*. 463: 1096-100, Mali P y colaboradores (2010), *Stem Cells*. 28: 713-720 y Maekawa M y colaboradores (2011), *Nature*. 474: 225-9.

Los ejemplos de las células somáticas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las células somáticas fetales, las células somáticas neonatales, y las células somáticas maduras, así como cualquiera de las células cultivadas primarias, las células subcultivadas, y las líneas celulares establecidas. De una forma adicional, las células que se describen en los párrafos anteriores pueden ser las células sanas o las células enfermas. Los ejemplos específicos de las células somáticas incluyen: (1) las células madre de tejido (células madre somáticas), tales como las células madre neurales, las células progenitoras hematopoyéticas, las células madre mesenquimales, y las células madre de pulpa dental; (2) las células progenitoras de tejido; y (3) las células diferenciadas, tales como las células de la sangre (por ejemplo, las células de la sangre periférica, las células de la sangre de cordón umbilical, y similares), las células mononucleares (por ejemplo, los linfocitos (células NK, células B, células T diferentes de las células $\alpha\beta$ T (por ejemplo, las células $\gamma\delta$ T y similares), monocitos, células dendríticas, y similares)), los granulocitos (por ejemplo, eosinófilos, neutrófilos, basófilos), los megacariocitos, las células epiteliales, las células endoteliales, las células musculares, los fibroblastos (por ejemplo, las células de la piel y similares), las células de pelo, las células hepáticas, las células mucosas gástricas, los enterocitos, las células del bazo, las células pancreáticas (por ejemplo, células exocrinas pancreáticas y similares), las células del cerebro, las células del pulmón, las células renales, y los adipocitos. Entre estos, es preferible una célula mononuclear diferente de una célula $\alpha\beta$ T, de una manera más específica es preferible un monocito o la célula $\gamma\delta$ T.

Como un método para introducir un factor de reprogramación en una célula somática cuando el factor de reprogramación está en la forma de un ADN, por ejemplo, se pueden utilizar el método de coprecipitación con fosfato de calcio, el método de PEG, el método de electroporación, el método de microinyección, el método de lipofección, y similares. Por ejemplo, se pueden utilizar los métodos que se describen en *Cell Engineering*, volumen adicional 8, *New Cell Engineering experiment protocol*, 263-267 (1995) (publicado por Shujunsha), *Virology*, volumen 52, 456 (1973), *Folia Pharmacol. Jpn.*, volumen 119 (No. 6), 345-351 (2002), y similares. Cuando se utiliza un vector del virus, el ácido nucleico se introduce en una célula de empaque adecuada (por ejemplo, una célula Plat-E) y la línea celular de complementación (por ejemplo, la célula 293); se recupera un vector del virus producido en el sobrenadante del cultivo, y las células se infectan con el vector por medio de un método apropiado que sea adecuado para cada vector de virus, en donde el vector se introduce en las células. Por ejemplo, cuando se utiliza un vector de retrovirus como el vector, un medio específico se da a conocer en la *Publicación Internacional de Patente* No. WO 2007/69666, *Cell*, 126, 663-676 (2006), y *Cell*, 131, 861-872 (2007), y similares. En particular, cuando se utiliza un vector de retrovirus, es posible que se haga una transfección altamente eficiente en diversas células a través del uso de un fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (elaborado por Takara Bio Inc.).

Un factor de reprogramación en la forma de ARN se puede introducir de una forma directa en las células y se expresa en las células. Como un método para introducir el ARN, se puede utilizar un método conocido y, por ejemplo, se puede utilizar de preferencia un método de lipofección, un método de

electroporación, o similares. Cuando el factor de reprogramación está en la forma de una proteína, se puede introducir en una célula por medio de un método tal como lipofección, fusión con péptido que penetra en la membrana celular (por ejemplo, TAT derivado de VIH y poliarginina), microinyección, y similares.

Los ejemplos del medio basal incluyen, pero no se limitan a, medio de Dulbecco (por ejemplo, IMDM), medio de Eagle (por ejemplo, DMEM, EMEM, BME, MEM, α MEM), medio de Ham (por ejemplo, medio F10, medio F12), medio RPMI (por ejemplo, medio RPMI-1640, medio RPMI-1630), medio MCDB (por ejemplo, medio MCDB 104, 107, 131, 151, 153), medio de Fischer, medio 199, medio de cultivo para células ES de primate (medio de cultivo para células ES/iPS de primate, Reprocell), medio para células ES de ratón (medio de cultivo TX-WES, Thromb-X), medio sin suero (mTeSR, Stemcell Technologies), ReproFF, StemSpan (marca comercial registrada) SFEM, StemSpan (marca comercial registrada) H3000, Stemlinell, medio ESF-b, medio ESF-C, medio CSTI-7, medio neurobasal (Life Technologies), medio StemPro-34, StemFit (marca comercial registrada) (por ejemplo, StemFit AK03N, StemFit AK02N), y similares. De una forma adicional, estos medios se pueden mezclar y usar como sea necesario y, por ejemplo, se puede mencionar el medio de DMEM/F12, y similares.

El medio basal puede ser apropiadamente complementado con del 10 por ciento al 20 por ciento de suero (suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés), suero humano, suero de caballo) o un reemplazo de suero (KSR y similares), insulina, diversas vitaminas, L-glutamina, diversos aminoácidos, tales como los aminoácido no esenciales y similares, 2-mercaptoetanol, diversas citocinas (interleucinas (IL-2, IL-7, IL-15 etc.), SCF (Factor de células madre), activina y similares), diversas hormonas, diversos factores de crecimiento (el factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por sus siglas en inglés), TGF- β etc.), diversas matrices extracelulares, diversas moléculas de adhesión celular, antibióticos, tales como penicilina/estreptomicina, puromicina y similares, indicadores del pH, tales como rojo de fenol, y similares.

El cultivo de preferencia se lleva a cabo, por ejemplo, bajo una atmósfera de CO₂ del 1 por ciento al 10 por ciento, de preferencia del 2 por ciento al 5 por ciento, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a 42 °C, de preferencia de aproximadamente 37 °C a 39 °C, durante aproximadamente 25 a 50 días.

En la presente invención, un mamífero a partir del cual se toma una célula somática no se limita de una manera particular, y es de preferencia un ser humano. Son preferibles las células autólogas, las células alogénicas que tengan el mismo o sustancialmente el mismo tipo de HLA, las células alogénicas en las que se ajuste la presencia o ausencia de expresión y/o el nivel de expresión de los HLA, y similares, debido a que no se presentan rechazos. Como el HLA, de preferencia se ajusta la presencia o ausencia de expresión y/o el nivel de expresión de por lo menos una parte de las subunidades contenidas en la clase I y/o en la clase II.

(2) Paso para diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células T

Un método para diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células T no se limita de una manera particular siempre y cuando las células madre pluripotentes inducidas se puedan diferenciar en las células $\gamma\delta$ T. En una modalidad de la presente invención, el paso para diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células T puede contener: (2-1) un paso para diferenciar las células madre

pluripotentes inducidas en las células progenitoras hematopoyéticas, y (2-2) un paso para diferenciar las células progenitoras hematopoyéticas en las células T positivas para CD3.

(2-1) Paso para diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células progenitoras hematopoyéticas

En la presente invención, las "células progenitoras hematopoyéticas (HPC, por sus siglas en inglés)" significan las células positivas para CD34, de preferencia las células doblemente positivas (DP, por sus siglas en inglés) para CD34/CD43. En la presente invención, la célula progenitora hematopoyética y la célula madre hematopoyética no se distinguen y muestran la misma célula a menos que se indique de alguna otra manera en particular.

El método de diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células progenitoras hematopoyéticas no se limita de una manera particular siempre y cuando pueda provocar la diferenciación en las células progenitoras hematopoyéticas. Los ejemplos del mismo incluyen un método que incluye cultivar las células madre pluripotentes en un medio para la inducción de las células progenitoras hematopoyéticas, tal y como se describe, por ejemplo, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2013/075222, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2016/076415, y en Liu S. y colaboradores, *Cytotherapy*, 17 (2015); 344-358, y similares.

En la presente invención, un medio que se utiliza para la inducción en una célula progenitora hematopoyética no se limita de una manera particular. Un medio que se utilice para el cultivo de las células de animales se puede preparar en un medio basal. El medio basal puede ser similar a aquellos utilizados en el paso (1) anteriormente mencionado. El medio puede contener suero o puede estar libre de suero. Si es necesario, el medio basal también puede contener vitamina C (por ejemplo, ácido ascórbico), albúmina, insulina, transferrina, un compuesto de selenio (por ejemplo, selenita de sodio), ácido graso, elementos de traza, 2-mercaptoetanol, tioglicerol (por ejemplo, α -monotioglicerol (MTG)), lípidos, aminoácidos, L-glutamina, L-alanil-L-glutamina (por ejemplo, Glutamax (marca comercial registrada), aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomina), antioxidantes, ácido pirúvico, reguladores del pH, sales inorgánicas, citocinas, y similares.

En la presente invención, "vitamina C" significa L-ácido ascórbico y derivados del mismo, y "derivados de L-ácido ascórbico" significa los derivados que llegan a ser vitamina C por medio de la reacción enzimática en el cuerpo vivo. Los ejemplos de los derivados de L-ácido ascórbico incluyen fosfato de vitamina C (por ejemplo, el 2-fosfato de ácido ascórbico), glucósido de ácido ascórbico, ascorbil etilo, éster de vitamina C, tetrahexildecanoato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, y 6-palmitato de 2-fosfato de ascorbilo. Se prefiere el fosfato de vitamina C (por ejemplo, el 2-fosfato de ácido ascórbico), y los ejemplos del fosfato de vitamina C incluyen las sales de fosfato de L-ácido ascórbico tales como el fosfato de Na de L-ácido ascórbico y el fosfato de Mg de L-ácido ascórbico.

Cuando se utiliza la vitamina C, la vitamina C de preferencia se añade (se suministra) cada cuatro días, cada tres días, cada dos días, o cada día. La vitamina C se añade de una manera más preferible cada día. En una modalidad, la vitamina C se agrega al medio en una cantidad que corresponde a 5 ng por mL

a 500 ng por mL (por ejemplo, en una cantidad que corresponde a 5 ng por mL, 10 ng por mL, 25 ng por mL, 50 ng por mL, 100 ng por mL, 200 ng por mL, 300 ng por mL, 400 ng por mL, o 500 ng por mL). En otra modalidad, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad que corresponde a 5 µg por mL a 500 µg por mL (por ejemplo, en una cantidad que corresponde a 5 µg por mL, 10 µg por mL, 25 µg por mL, 50 µg por mL, 100 µg por mL, 200 µg por mL, 300 µg por mL, 400 µg por mL, o 500 µg por mL).

El medio para usarse en el paso (2-1) se puede complementar además con por lo menos una clase de citocina que se selecciona a partir del grupo que consiste en BMP4 (proteína morfogenética ósea 4), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), SCF (factor de células madre), TPO (trombopoyetina), FLT-3L (ligando de Flt3), y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Es más preferible un cultivo complementado con BMP4, VEGF y bFGF, y además de preferencia un cultivo complementado con BMP4, VEGF, SCF y bFGF.

Cuando se utiliza la citocina, su concentración en el medio puede ser, por ejemplo, de 5 ng por mL a 500 ng por mL para BMP4, de 5 ng por mL a 500 ng por mL para VEGF, de 5 ng por mL a 100 ng por mL para SCF, de 1 ng por mL a 100 ng por mL para TPO, de 1 ng por mL a 100 ng por mL para FLT-3L, y de 5 ng por mL a 500 ng por mL para bFGF.

El medio mencionado en lo anterior puede ser complementado con un inhibidor de TGFβ. El inhibidor de TGFβ es un inhibidor de molécula pequeña que interfiere con la transducción de señales de la familia de TGFβ e incluye, por ejemplo, SB431542, SB202190 (ambos de R. K. Lindemann y colaboradores, Mol. Cancer 2: 20 (2003)), SB505124 (GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208 (Scios), LY2109761, LY364947, LY580276 (Lilly Research Laboratories), y similares. Por ejemplo, cuando el inhibidor de TGFβ es SB431542, su concentración en el medio es de preferencia de 0.5 µM a 100 µM.

Las células madre pluripotentes inducidas se pueden cultivar por medio de un cultivo adherente o de un cultivo en suspensión. En los casos del cultivo adherente, el cultivo se puede llevar a cabo en un recipiente de cultivo recubierto con un componente de matriz extracelular, y se puede co-cultivar con las células alimentadoras. Mientras que las células alimentadoras no se limitan de una manera particular, por ejemplo, se pueden mencionar los fibroblastos (fibroblasto de embrión de ratón (MEF, por sus siglas en inglés), fibroblasto de ratón (STO), y similares). Las células alimentadoras de preferencia se inactivan por medio de un método que es conocido por sí mismo, por ejemplo, irradiación con radiación (rayos gamma y similares), un tratamiento con un agente contra el cáncer (mitomicina C y similares), y similares. Como el componente de matriz extracelular, se pueden mencionar las proteínas fibrosas tales como Matrigel (Niwa A y colaboradores, PLoS One. 6 (7): e22261, 2011), gelatina, colágeno, elastina y similares, glucosaminoglicano y proteoglicano, tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina y similares, las proteínas de adhesión celular tales como fibronectina, vitronectina, laminina y similares, y similares.

Cultivo en suspensión significa cultivar las células en un estado de no adhesión a un recipiente de cultivo y no se limita de una manera particular. Con el fin de mejorar la adhesividad a las células, se puede utilizar un recipiente de cultivo libre de un tratamiento artificial (por ejemplo, un tratamiento de recubrimiento con matriz extracelular y similares), o un recipiente de cultivo que se haya sometido a un tratamiento para suprimir la adhesión de una forma artificial (por ejemplo, un tratamiento de recubrimiento con ácido poli

hidroxietil metacrílico (poli-HEMA) o con un poliol de actividad superficial no iónico (Pluronic F-127, etc.)). En el cultivo en suspensión, de preferencia se forman y se cultivan embrioides (EB).

En la presente invención, la célula progenitora hematopoyética también se puede preparar a partir de una estructura parecida a un saco (la que también será referida como saco-ES o saco-iPS) que se obtiene por medio del cultivo de las células madre pluripotentes. Como se utiliza en el presente documento, la "estructura parecida a un saco" es una estructura en la forma de un saco tridimensional (con espacios en su interior) derivada a partir de las células madre pluripotentes, que se forma por medio de una población de células endoteliales y similares, y contiene las células progenitoras hematopoyéticas en el interior de la misma.

Las condiciones de temperatura no están particularmente limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, de preferencia de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. El período de cultivo puede ser apropiadamente determinado por las personas expertas en la materia por medio del monitoreo del número de las células progenitoras hematopoyéticas y/o similares. El número de los días del cultivo no está limitado siempre y cuando se puedan obtener las células progenitoras hematopoyéticas. Los ejemplos del período de cultivo incluyen por lo menos 6 días, no menos de 7 días, no menos de 8 días, no menos de 9 días, no menos de 10 días, no menos de 11 días, no menos de 12 días, no menos de 13 días, y no menos de 14 días. El período de cultivo es de preferencia de 14 días. Si bien un período de cultivo más largo en términos generales no presenta un problema en la producción de las células progenitoras hematopoyéticas, de preferencia no es de más de 35 días, y de una manera más preferible no es de más de 21 días. El cultivo se puede llevar a cabo bajo condiciones de bajo contenido de oxígeno, y las condiciones de bajo contenido de oxígeno en la presente invención significan, por ejemplo, una concentración de oxígeno del 15 por ciento, del 10 por ciento, del 9 por ciento, del 8 por ciento, del 7 por ciento, del 6 por ciento, del 5 por ciento o menor que estos.

(2-2) Paso de diferenciar las células progenitoras hematopoyéticas en las células T positivas para CD3

Un método para diferenciar las células progenitoras hematopoyéticas en las células T positivas para CD3 no se limita de una manera particular siempre y cuando pueda diferenciar las células progenitoras hematopoyéticas en las células T positivas para CD3. Los ejemplos del mismo incluyen un método para cultivar las células progenitoras hematopoyéticas bajo las mismas condiciones de cultivo que aquellas de un método para inducir a las células T a partir de las células progenitoras hematopoyéticas, tal y como se describe en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2016/076415, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/221975, y similares.

En la presente invención, un medio para inducir la diferenciación en las células T positivas para CD3 no se limita de una manera particular, y un medio que se utilice para el cultivo las células de animales se puede preparar en un medio basal. Los ejemplos del medio basal incluyen aquellos similares al medio basal que se usó en el paso (1) anteriormente mencionado. El medio puede contener suero, o puede estar libre de suero. Si es necesario, el medio basal también pueden contener vitamina C (por ejemplo, ácido ascórbico), albúmina, insulina, transferrina, un compuesto de selenio (por ejemplo, selenita de sodio), ácido

graso, elementos de traza, 2-mercaptoetanol, tioglicerol (por ejemplo, α -monotioglicerol (MTG)), lípidos, aminoácidos, L-glutamina, L-alanil-L-glutamina (por ejemplo, Glutamax (marca comercial registrada)), aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomicina), antioxidantes, ácido pirúvico, reguladores del pH, sales inorgánicas, citocinas, y similares.

Cuando se utiliza la vitamina C en el paso (2-2), la vitamina C puede ser la misma que aquella tal y como se describe en el paso (2-1), y se puede agregar de una manera similar. En una modalidad, la concentración de la vitamina C en el medio o en un medio de cultivo es de preferencia de 5 μ g por mL a 200 μ g por mL. En otra modalidad, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad que corresponde a 5 μ g por mL a 500 μ g por mL (por ejemplo, en una cantidad que corresponde a 5 μ g por mL, 10 μ g por mL, 25 μ g por mL, 50 μ g por mL, 100 μ g por mL, 200 μ g por mL, 300 μ g por mL, 400 μ g por mL, o 500 μ g por mL).

En el paso (2-2), es preferible el inhibidor de p38 y/o SDF-1 (factor derivado de células estromales 1). En la presente invención, el "inhibidor de p38" significa una sustancia que inhibe las funciones de la proteína p38 (cinasa MAP p38). Los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor químico de p38, un mutante negativo dominante de p38, o un ácido nucleico que codifica el mismo, y similares.

Los ejemplos del inhibidor químico de p38, para usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol) y un derivado del mismo, SB202190 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol) y un derivado del mismo, SB239063 (trans-4-[4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxi-4-pirimidinil)-1H-imidazol-1-il]-ciclohexanol) y un derivado del mismo, SB220025 y un derivado del mismo, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SCIO-469, SCIO-323, VX-702 y FR167653. Estos compuestos están disponibles en el comercio y, por ejemplo, los SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 y PD169316 están disponibles en Calbiochem, y los SCIO-469 y SCIO-323 están disponibles en Scios, y similares. El inhibidor químico de p38 es de preferencia SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol) o un derivado del mismo.

Los ejemplos del mutante negativo dominante de p38 para usarse en la presente invención incluyen p38T180A que se obtiene por medio de la mutación puntual de la treonina en la posición 180 que se localiza en la región de enlace del ADN de p38 a la alanina, p38Y182F que se obtiene por medio de la mutación puntual de la tirosina en la posición 182 de p38 en la fenilalanina de humano y de ratón, y similares. El inhibidor de p38 está contenido en un medio en aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 50 μ M. Cuando se utiliza el SB203580 como el inhibidor de p38, este puede estar contenido en un medio en 1 μ M a 50 μ M, de 5 μ M a 30 μ M, o de 10 μ M a 20 μ M.

El SDF-1 para usarse en la presente invención puede ser no solamente SDF-1 α o una forma madura del mismo, sino que también una isoforma, tal como SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , SDF-1 ϕ y similares, o una forma madura de las mismas, o una mezcla de estas en cualquier proporción, o similares. De preferencia se utiliza SDF-1 α . El SDF-1 es algunas veces referido como CXCL-12 o PBSF.

En la presente invención, uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SDF-1 pueden ser sustituidos, suprimidos, añadidos y/o insertados, siempre y cuando tengan la actividad como la

quimiocina (SDF-1 con dicha sustitución, supresión, adición y/o inserción de aminoácido también será referido como "mutante de SDF-1"). De una manera similar, una cadena de azúcar puede ser sustituida, suprimida y/o añadida en el SDF-1 o en el mutante de SDF-1. Los ejemplos del mutante del SDF-1 anteriormente mencionado incluyen aquellos que mantienen por lo menos 4 residuos de cisteína (Cys30, Cys32, Cys55 y Cys71 en el SDF-1 α humano), y que tienen no menos del 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de una sustancia natural, aunque la mutación de aminoácido no está limitada a las mismas. El SDF-1 se puede obtener a partir de un mamífero, por ejemplo, un mamífero humano o no humano, tal como mono, oveja, bovino, caballo, cerdo, perro, gato, conejo, rata, ratón, y similares. Por ejemplo, la proteína registrada como GenBank número de acceso:NP-954637 se puede utilizar como human SDF-1 α , y la proteína registrada como GenBank número de acceso: NP-000600 se puede utilizar como el SDF-1 β .

El SDF-1 puede estar disponible en el comercio, se puede purificar a partir de la naturaleza, o se puede producir por medio de la síntesis de péptidos o de las técnicas de la ingeniería genética. El SDF-1 está contenido en un medio dentro del intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng por mL a aproximadamente 100 ng por mL. Por otra parte, la alternativa al SDF-1 que tiene una actividad parecida a la del SDF-1 también se puede utilizar en lugar del SDF-1. Los ejemplos de dicha alternativa al SDF-1 incluyen un agonista de CXCR4, y se puede agregar al medio un compuesto de bajo peso molecular que tenga una actividad agonista de CXCR4 y similares en lugar del SDF-1.

El medio de cultivo que se utilizó en el paso (2-2) puede ser además complementado con por lo menos una clase, y de preferencia todas las clases, de citocina, que se seleccionan a partir del grupo que consiste en SCF, TPO (trombopoyetina), FLT-3L e IL-7. La concentración de estos es, por ejemplo, de 10 ng por mL a 100 ng por mL para el SCF, de 10 ng por mL a 200 ng por mL para la TPO, de 1 ng por mL a 100 ng por mL para la IL-7, y de 1 ng por mL a 100 ng por mL para el FLT-3L.

En el paso (2-2), las células progenitoras hematopoyéticas se pueden cultivar por medio de un cultivo adherente o de un cultivo en suspensión. En los casos del cultivo adherente, se puede utilizar un recipiente de cultivo recubierto. Las células progenitoras hematopoyéticas se pueden co-cultivar con las células alimentadoras y/o similares. Los ejemplos de las células alimentadoras para el co-cultivo incluyen una línea de células estromales de médula ósea, las células OP9 (disponibles en Riken BioResource Center). La célula OP9 es de preferencia una célula OP9-DL4 o una célula OP9-DL1, las cuales constantemente expresan DLL4 o DLL1 (por ejemplo, Holmes R I y Zuniga-Pflucker J C. Cold Spring Harb Protoc. 2009 (2)). En la presente invención, en los casos en donde se utilizan las células OP9 como las células alimentadoras, se puede agregar al medio DLL1 o DLL4 preparadas por separado, o una proteína de fusión de DLL4 o DLL1, y Fc o similares, para llevar a cabo el co-cultivo. Cuando se utilizan las células alimentadoras, las células alimentadoras de preferencia son apropiadamente reemplazadas durante el cultivo. El reemplazo de las células alimentadoras se puede llevar a cabo por medio de la transferencia de las células objeto que se estén cultivando sobre las células alimentadoras que se emplazan preliminarmente. El reemplazo se puede llevar a cabo cada cinco días, cada cuatro días, cada tres días, o cada dos días. Cuando las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen por medio del cultivo en suspensión de embrioides, es preferible

llevar a cabo un cultivo de adhesión después de la disociación en las células individuales. Si bien las células se pueden co-cultivar con las células alimentadoras, el cultivo de preferencia se lleva a cabo sin el uso de las células alimentadoras.

En el caso del cultivo de adhesión y cuando se recubre un recipiente de cultivo, los ejemplos del agente de recubrimiento incluyen Matrigel (Niwa A y colaboradores, PLoS One, 6 (7): e22261, 2011)), colágeno, gelatina, laminina, heparano ácido sulfúrico proteoglicano, RetroNectin (marca comercial registrada), la proteína de fusión de DLL4 o DLL1, o DLL4 o DLL1 y la región Fc del anticuerpo (más adelante en la presente es algunas veces referida como Fc), y similares (por ejemplo, quimera de DLL4/Fc), entactina, y/o una combinación de las mismas, y es preferible una combinación de RetroNectin y la proteína de fusión de DLL4 y Fc etc..

En el paso (2-2), las condiciones de temperatura del cultivo no están limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, de preferencia de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. El período de cultivo puede ser apropiadamente determinado por las personas expertas en la materia por medio del monitoreo del número de células γδT y similares. El número de los días del cultivo no está limitado siempre y cuando se puedan obtener las células γδT. Los ejemplos del período de cultivo incluyen por lo regular por lo menos no menos de 10 días, no menos de 12 días, no menos de 14 días, no menos de 16 días, no menos de 18 días, o no menos de 20 días. El período de cultivo es de preferencia de 21 días. Por otra parte, es preferible no más de 90 días, y es más preferible no más de 42 días.

La población de las células T positivas para CD3 que se obtiene por medio del paso anterior incluye las células γδT. El paso (2) puede contener además el siguiente paso (2-3).

(2-3) Paso para la concentración de las células T positivas para CD3

Un método para concentrar las células T positivas para CD3 no se limita de una manera particular siempre y cuando se puedan concentrar las células γδT. Por ejemplo, se puede mencionar un método para cultivar las células T positivas para CD3 bajo las mismas condiciones de cultivo que aquellas en un paso de inducción de las células T positivas para CD8 a partir de las células T doblemente positivas para CD4 y CD8, tal y como se describe en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2016/076415, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/221975, y similares.

En la presente invención, un medio que se utiliza para la concentración de las células T positivas para CD3 no se limita de una manera particular, y un medio que se utiliza para el cultivo de las células de animales se puede preparar en un medio basal. Los ejemplos del medio basal incluyen aquellos similares al medio basal que se usó en el paso (1) anteriormente mencionado. El medio puede contener suero, o puede estar libre de suero. Si es necesario, el medio basal también pueden contener vitamina C (por ejemplo, ácido ascórbico), albúmina, insulina, transferrina, un compuesto de selenio (por ejemplo, selenita de sodio), ácido graso, elementos de traza, 2-mercaptoetanol, tioglicerol (por ejemplo, α-monotioglicerol (MTG)), lípidos, aminoácidos, L-glutamina, L-alanil-L-glutamina (por ejemplo, Glutamax (marca comercial registrada)), los aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomicina), antioxidantes, ácido pirúvico, reguladores

del pH, sales inorgánicas, citocinas, hormonas, y similares. En una modalidad de la presente invención, puede estar contenida la vitamina C, tal como ácido ascórbico y similares, insulina, transferrina, un compuesto de selenio (por ejemplo, selenita de sodio), citocina tal como IL-7, y similares.

Cuando se utiliza vitamina C en el paso (2-3), la vitamina C puede ser la misma que aquella tal y como se describe en el paso (2-1), y se puede agregar de una manera similar. En una modalidad, la concentración de la vitamina C en el medio o en un medio de cultivo es de preferencia de 5 µg por mL a 200 µg por mL. En otra modalidad, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad que corresponde a 5 µg por mL a 500 µg por mL (por ejemplo, en una cantidad que corresponde a 5 µg por mL, 10 µg por mL, 25 µg por mL, 50 µg por mL, 100 µg por mL, 200 µg por mL, 300 µg por mL, 400 µg por mL, o 500 µg por mL).

Cuando se utiliza una hormona en el paso (2-3), los ejemplos de la hormona incluyen la hormona cortical. La hormona cortical es un glucocorticoide o un derivado del mismo, y acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de fludrocortisona, prednisolona, triamcinolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, y dipropionato de beclometasona, tal como se menciona en los ejemplos. Se prefiere dexametasona. Cuando la hormona cortical es dexametasona, su concentración en el medio es de 1 nM a 100 nM.

En el paso (2-3), el medio contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. El agonista de complejo de CD3/TCR no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una molécula capaz de transducir una señal a partir de un complejo de CD3/TCR a una célula positiva para CD3 por medio del enlace específico al complejo de CD3/TCR. Los ejemplos del agonista de complejo de CD3/TCR incluyen un agonista de CD3 y/o un agonista de TCR. Como el agonista de CD3, se puede mencionar un anticuerpo anti-agonista de CD3 (que será también simplemente referido como "anticuerpo anti-CD3"), o un fragmento de enlace del mismo, y como el agonista del TCR, se pueden mencionar por lo menos uno que se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo anti-agonista de TCR (que será también simplemente referido como un "anticuerpo anti-TCR"), o un fragmento de enlace del mismo, un complejo peptídico de MHC/antígeno o un multímero del mismo, y un complejo de MHC/superantígeno o un multímero del mismo. Cuando se utiliza un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo anti-CD3 incluye tanto un anticuerpo policlonal como un anticuerpo monoclonal, de preferencia un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, de preferencia IgG. Como el anticuerpo anti-CD3, se puede mencionar un anticuerpo (OKT3) producido a partir del clon de OKT3, un anticuerpo (UCHT1) producido a partir del clon de UCHT1, y similares, de preferencia UCHT1. La concentración del anticuerpo anti-CD3 en el medio es, por ejemplo, de 10 ng por mL a 1000 ng por mL, de preferencia de 50 ng por mL a 800 ng por mL, de una manera más preferible de 250 ng por mL a 600 ng por mL. El agonista de complejo de CD3/TCR anteriormente mencionado puede estar disponible en el comercio, se puede purificar a partir de la naturaleza, o se puede producir por medio de la síntesis de péptidos o de las técnicas de la ingeniería genética o los métodos de síntesis química. Por ejemplo, OKT3 y UCHT1 se pueden adquirir en ThermoFisher, GeneTex, y similares.

Cuando se utiliza la citocina en el paso (2-3), se pueden mencionar IL-2 e IL-7 y similares como la

citocina. Cuando la citocina es la IL-2, la concentración de la misma en el medio es de 10 U por mL a 1000 U por mL, y cuando es la IL-7, la concentración de la misma en el medio es de 1 ng por mL a 1000 ng por mL.

En el paso (2-3), las condiciones de temperatura del cultivo no están particularmente limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, de preferencia de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. El período de cultivo puede ser apropiadamente determinado por las personas expertas en la materia por medio del monitoreo del número de células $\gamma\delta T$ y similares. El número de los días no está limitado siempre y cuando se puedan obtener las células $\gamma\delta T$. El período de cultivo es, por ejemplo, de no menos de 1 día, de no menos de 2 días, de no menos de 3 días, de no menos de 4 días, de no menos de 5 días, y de preferencia de no menos de 6 días. De preferencia no es mayor que 28 días, y de una manera más preferible no es mayor que 14 días.

La población de las células T positivas para CD3 que se obtiene por medio del paso anterior incluye las células $\gamma\delta T$, y se pueden concentrar adicionalmente. El paso (2) puede contener además el siguiente paso (2-4).

(2-4) Paso para el cultivo en expansión de las células T positivas para CD3 que contiene células $\gamma\delta T$

Un método para el cultivo en expansión de las células T positivas para CD3 no se limita de una manera particular siempre y cuando se puedan proliferar las células $\gamma\delta T$. Por ejemplo, se puede mencionar un método para cultivar las células T positivas para CD3 que contienen células $\gamma\delta T$ bajo las mismas condiciones de cultivo que aquellas de un paso de cultivo en expansión de las células T citotóxicas CD8 $\alpha^+ \beta^+$, tal y como se describe en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2016/076415, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2018/135646, y similares.

En la presente invención, un medio que se utiliza para el cultivo en expansión de las células T positivas para CD3 que contienen células $\gamma\delta T$ no se limita de una manera particular. Un medio que se utiliza para el cultivo de las células de animales se puede preparar en un medio basal. El medio basal puede ser similar a aquellos utilizados en el paso (2-3) anteriormente mencionado. El medio puede contener un suero, o puede estar libre de suero. Si es necesario, el medio basal también puede contener vitamina C (por ejemplo, ácido ascórbico), albúmina, insulina, transferrina, selenio (por ejemplo, selenita de sodio), ácido graso, elementos de traza, 2-mercaptoetanol, tiol glicerol (por ejemplo, alfa-monotioglicerol (MTG)), lípidos, aminoácidos, L-glutamina, L-alanil-L-glutamina (por ejemplo, Glutamax (marca comercial registrada)), los aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomicina), antioxidantes, ácido pirúvico, reguladores del pH, sales inorgánicas, citocinas, hormonas, y similares. En una modalidad de la presente invención, pueden estar contenidos la vitamina C tal como ácido ascórbico y similares, insulina, transferrina, un compuesto de selenio (por ejemplo, selenita de sodio), citocina tal como IL-7, y similares.

Cuando se utiliza vitamina C en el paso (2-4), la vitamina C puede ser la misma que aquella tal y como se describe en el paso (2-1), y se puede agregar de una manera similar. En una modalidad, la concentración de vitamina C en el medio o en un medio de cultivo es de preferencia de 5 μg por mL a 200 μg por mL. En otra modalidad, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad que corresponde

a 5 µg por mL a 500 µg por mL (por ejemplo, en una cantidad que corresponde a 5 µg por mL, 10 µg por mL, 25 µg por mL, 50 µg por mL, 100 µg por mL, 200 µg por mL, 300 µg por mL, 400 µg por mL, o 500 µg por mL).

En el paso (2-4), el medio contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. El agonista de complejo de CD3/TCR no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una molécula capaz de transducir una señal a partir de un complejo de CD3/TCR a una célula positiva para CD3 por medio del enlace específico al complejo de CD3/TCR. Los ejemplos del agonista de complejo de CD3/TCR incluyen un agonista de CD3 y/o un agonista de TCR. Como el agonista de CD3, se puede mencionar un anticuerpo anti-agonista de CD3 (que será también simplemente referido como un "anticuerpo anti-CD3"), o un fragmento de enlace del mismo, y como el agonista del TCR, se pueden mencionar por lo menos uno que se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo anti-agonista de TCR (que será también simplemente referido como un "anticuerpo anti-TCR"), o un fragmento de enlace del mismo, un complejo peptídico de MHC/antígeno o un multímero del mismo, y un complejo de MHC/superantígeno o un multímero del mismo. Cuando se utiliza un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo anti-CD3 incluye tanto un anticuerpo policlonal como un anticuerpo monoclonal, de preferencia un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, de preferencia IgG. Como el anticuerpo anti-CD3, se pueden mencionar un anticuerpo (OKT3) producido a partir de un clon de OKT3, un anticuerpo (UCHT1) producido a partir de un clon de UCHT1, y similares, de preferencia UCHT1. La concentración del anticuerpo anti-CD3 en el medio es, por ejemplo, de 0.3 ng por mL a 10,000 ng por mL, de preferencia de 50 ng por mL a 5000 ng por mL, de una manera más preferible de 200 ng por mL a 4000 ng por mL. El agonista de complejo de CD3/TCR anteriormente mencionado puede estar disponible en el comercio, se puede purificar a partir de la naturaleza, o se puede producir por medio de la síntesis de péptidos o de las técnicas de la ingeniería genética o los métodos de síntesis química. Por ejemplo, OKT3 y UCHT1 se pueden adquirir en ThermoFisher, GeneTex, y similares.

La fibronectina o una variante de la misma está de preferencia presente en el medio en el paso (2-4). Dicha fibronectina no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una molécula capaz de enlazarse a las células positivas para CD3. La variante de fibronectina no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una molécula capaz de enlazarse a VLA-5 y VLA-4 sobre la superficie de las células positivas para CD3, y los ejemplos de la misma incluyen RetroNectin. La fibronectina y una variante de la misma pueden estar presentes en cualquier forma en el medio. Por ejemplo, pueden estar contenidas en el medio durante el cultivo, o se pueden inmovilizar en un recipiente de cultivo, y de preferencia se inmovilizan en un recipiente de cultivo.

Cuando la fibronectina o una variante de la misma está contenida en un medio, el medio puede ser el mismo que aquel que contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. La presencia o ausencia de suero, aditivo y similares pueden ser las mismas que aquellas en el medio que contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. Cuando la fibronectina o una variante de la misma está contenida en un medio, el límite inferior de la concentración de fibronectina o de una variante de la misma puede ser de no menos de 10 ng por mL, de preferencia de no menos de 100 ng por mL, y el límite superior puede ser de no más de 10,000

µg por mL, de preferencia de no más de 1000 µg por mL.

En el paso (2-4), el medio también de preferencia contiene un agonista de CD30. El agonista de CD30 no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una molécula capaz de transducir una señal a partir de un CD30 en una célula por medio del enlace específico a CD30. Los ejemplos del agonista de CD30 incluyen por lo menos uno que se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpo anti-agonista de CD30 (que será también simplemente referido como un "anticuerpo anti-CD30"), o un fragmento de enlace del mismo, y un ligando de CD30 o un fragmento de enlace del mismo.

Así como el agonista de complejo de CD3/TCR, el agonista de CD30 que se utiliza en el paso (2-4) puede estar presente en cualquier forma siempre y cuando pueda estar presente en contacto con CD30 durante el cultivo. Por ejemplo, puede estar contenido en el medio durante el cultivo, o se puede inmovilizar en un recipiente de cultivo, y está de preferencia contenido en el medio.

Cuando una agonista de CD30 está contenido en un medio, el medio puede ser el mismo que aquel que contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. La presencia o ausencia de suero, aditivo y similares pueden ser las mismas que aquellas en el medio que contiene un agonista de complejo de CD3/TCR. Cuando un agonista de CD30 está contenido en un medio, la concentración del agonista de CD30 en el medio puede ser apropiadamente determinada por las personas con una experiencia ordinaria en este campo de acuerdo con el agonista de CD30. Por ejemplo, cuando el agonista de CD30 es un anticuerpo anti-agonista de CD30 o un fragmento de enlace del mismo, la concentración del anticuerpo anti-agonista de CD30 o de un fragmento de enlace del mismo en el medio es en general de 1 ng por mL a 10,000 ng por mL, y de preferencia de 30 ng por mL a 300 ng por mL.

Cuando el agonista de CD30 se inmoviliza en un recipiente de cultivo, el recipiente de cultivo puede ser el mismo que aquel en el que se inmoviliza el agonista de complejo de CD3/TCR. Por otra parte, un método para inmovilizar el agonista de CD30 en el recipiente de cultivo puede ser el mismo que aquel para inmovilizar el agonista de complejo de CD3/TCR. El límite inferior de la concentración de una solución de un agonista de CD30 cuando el agonista de CD30 se inmoviliza en un recipiente de cultivo puede ser de no menos de 0.1 ng por mL, de preferencia de no menos de 1 ng por mL, y el límite superior puede ser de no más de 10,000 ng por mL, y de preferencia de no más de 1000 ng por mL.

Cuando se utiliza citocina en el paso (2-4), la citocina puede ser IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 o similares. Se puede utilizar solamente una clase de estas, o se pueden utilizar clases plurales (de preferencia todas las clases) de las mismas. Cuando la citocina es la IL-2, la concentración de la misma en el medio puede ser de 10 U por mL a 1000 U por mL, cuando la citocina es la IL-7, la concentración de la misma en el medio puede ser de 1 ng por mL a 1000 ng por mL. La concentración de IL-12 en el medio puede ser de 5 ng por mL a 500 ng por mL, la concentración de IL-15 en el medio puede ser de 1 ng por mL a 100 ng por mL, la concentración de IL-18 en el medio puede ser de 5 ng por mL a 500 ng por mL, y la concentración de IL-21 en el medio puede ser de 2 ng por mL a 200 ng por mL.

En el paso (2-4), una citocina de la familia de TNF puede estar contenida como la citocina en el medio. Los ejemplos de la citocina de la familia de TNF incluyen TNF-α, TNF-β, linfotoxina α, ligando Fas, TRAIL, TWEAK, TL1A, ligando RANK, ligando OX40, APRIL, AITRL, BAFF, 4-1BBL y ligando de CD40, y

similares, y es preferible TL1A. Cuando se utiliza TL1A, la concentración del mismo en el medio puede ser de 5 ng por mL a 500 ng por mL, de preferencia de 10 ng por mL a 300 ng por mL, y de una manera más preferible de 20 ng por mL a 200 ng por mL.

En el paso (2-4), más aún, un inhibidor de apoptosis puede estar además contenido en el medio. Como el inhibidor de apoptosis, se puede mencionar un inhibidor de proteasa, por ejemplo, un inhibidor de caspasa. Como el inhibidor de caspasa, es preferible el inhibidor de Pan Caspasa FMK, Z-VAD (N-benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp (O-Me) fluorometilcetona) (más adelante en la presente referido algunas veces como "Z-VAD-FMK"), y la concentración del mismo en el medio puede ser de 1 μ M a 1000 μ M, de preferencia de 1 μ M a 500 μ M, de una manera más preferible de 1 μ M a 200 μ M, y de una manera en particular preferible de 1 μ M a 50 μ M.

En la presente invención, las células $\gamma\delta$ T obtenidas se pueden utilizar después del aislamiento, o se pueden utilizar como estén (es decir, como una población de células que posiblemente contenga otro tipo de célula). Cuando se aíslan, el aislamiento se puede llevar a cabo a través del uso de por lo menos una molécula que se selecciona a partir del grupo que consiste en γ TCR, δ TCR y CD3 como un índice, y el método de aislamiento utilizado puede ser un método bien conocido por las personas que tengan una experiencia ordinaria en este campo. Los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un método a través del uso de un anticuerpo de γ TCR, δ TCR y CD3 (enlazado con perlas magnéticas y similares como sea necesario) y el aislamiento por medio de la citometría de flujo, o un método de separación magnética de las células, un método de purificación a través del uso de una columna de afinidad en la cual se inmoviliza un antígeno deseado, y similares.

Cuando se utilizan como estén, la proporción de las células $\gamma\delta$ T en la población de las células se puede aumentar a través del empleo de un método bien conocido por las personas que tengan una experiencia ordinaria en este campo. Los ejemplos del método para aumentar la proporción de las células $\gamma\delta$ T en la población de las células incluyen, pero no se limitan a, los métodos de Front. Immunol., 5: 636 (2014), la Publicación Nacional de la Solicitud Internacional de Patente No. 2017-537625, la Publicación Nacional de la Solicitud Internacional de Patente No. 2003-529363, y similares.

Las células utilizadas para el método de producción de la presente invención de una forma opcional tienen un ácido nucleico que codifica un TCR exógeno y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), cada uno de los cuales reconoce y se enlaza a un antígeno o a un complejo de antígeno-HLA. Por lo tanto, una modalidad de la presente invención puede incluir un paso para la introducción de un ácido nucleico que codifique el TCR mencionado en lo anterior (es decir, (i) α TCR y β TCR, (ii) γ TCR y δ TCR), y/o un ácido nucleico que codifique (iii) el CAR mencionado en lo anterior en la célula (por ejemplo, célula madre pluripotente, célula progenitora hematopoyética, etc.) obtenido en cualquier momento de (1) un paso para establecer una célula madre pluripotente inducida a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T, y (2) un paso para diferenciar la célula madre pluripotente inducida establecida en el paso (1) en las células T. De estos, el ácido nucleico que codifica (i) α TCR y β TCR se introduce en las células $\gamma\delta$ T que se obtienen durante cualquiera de los pasos de diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en las células T. En la presente memoria descriptiva, el ácido nucleico que

codifica el TCR significa un ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica una cadena que forma el TCR y una secuencia de bases que codifica la otra cadena. El ácido nucleico que codifica el TCR también significa una combinación de un ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica una cadena que forma el TCR y un ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica la otra cadena. Es decir, cuando se introduce en una célula un ácido nucleico que codifica el TCR ((i) α TCR y β TCR), se puede introducir un ácido nucleico que contiene tanto la secuencia de bases que codifica el α TCR y la secuencia de bases que codifica el β TCR, o se pueden introducir por separado la secuencia de bases que codifica el α TCR y la secuencia de bases que codifica el β TCR. Cuando se introducen por separado, estos ácidos nucleicos se pueden introducir de una manera simultánea o en secuencia. Se aplica lo mismo a (ii) γ TCR y δ TCR.

El TCR utilizado en la presente invención abarca no solamente uno en donde la cadena α y la cadena β del TCR constituyen un heterodímero (es decir, $\alpha\beta$ TCR), o en donde la cadena γ y la cadena δ del TCR constituyen un heterodímero (es decir, $\gamma\delta$ TCR), sino que también uno en donde estas constituyen un homodímero. De una forma adicional, también se pueden utilizar uno que carezca de una parte o de toda la región constante, y uno con la recombinación de una secuencia de aminoácidos. De estos, $\gamma\delta$ TCR es preferible, y V γ 9V δ 2TCR es en particular preferible.

La región constante de la cadena de TCR anteriormente mencionada puede ser la región constante de la cadena del TCR del clon del linfocito T citotóxico (CTL, por sus siglas en inglés) a partir del cual se deriva, en donde la región se ha sometido a una modificación previamente determinada. Los ejemplos de la modificación incluyen, pero no se limitan a, el reemplazo de residuos de aminoácidos particulares en la región constante del TCR del clon del CTL con los residuos de cisteína, con lo que se mejora de esta manera la eficiencia de la expresión del dímero a través del enlace de disulfuro entre las cadenas del TCR, y similares.

Los ejemplos del antígeno dirigido por el TCR anteriormente mencionado incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de tumores. El antígeno de tumor puede ser un antígeno específico de tumor (TSA, por sus siglas en inglés) o un antígeno asociado con un tumor (TAA, por sus siglas en inglés). Los ejemplos específicos de este antígeno de tumor incluyen una o más clases de antígenos que se seleccionan a partir del grupo que consiste en los antígenos diferenciados, tales como MART-1/Melan A (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y similares, antígenos de múltiples linajes específicos de tumores, tales como WT1, glipicano-3, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15 y similares, antígenos fetales, tales como CEA y similares, genes de tumores sobre-expresados o genes supresores de tumores mutados, tales como p53, Ras, HER-2/neu y similares, antígenos de tumores únicos causados por la translocalización de cromosomas tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR y similares, y antígenos de virus, tales como antígeno de virus Epstein Barr (EBVA, por sus siglas en inglés), antígenos E6 y E7 de virus de papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), y similares. Como otros antígenos de tumores, se pueden mencionar TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, β -catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -fetoproteína, β -HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA,

CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, proteína de enlace a TA-90/Mac-2 / proteína asociada con ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

Como se muestra en el ejemplo que se describe más adelante, en una modalidad, de entre las células $\gamma\delta$ T que se obtienen por medio del método de producción de la presente invención, las células que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) mostraron una actividad citotóxica específica para las células que expresan el antígeno blanco del CAR y una actividad antitumoral (que será también referida simplemente como una "actividad citotóxica" en la presente memoria descriptiva). Por lo tanto, a partir del aspecto de la actividad citotóxica específica del antígeno, las células $\gamma\delta$ T que se obtienen por medio del método de producción de la presente invención de preferencia expresan el CAR. El hecho de que una célula tenga una actividad citotóxica se puede confirmar por medio de un método conocido, y un método preferido incluye, por ejemplo, un método para medir la actividad citotóxica contra las células que expresan el antígeno blanco de CAR por medio de un ensayo de liberación de cromo, o similares.

En la presente invención, el "receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés)" significa una proteína de fusión que contiene un dominio de enlace al antígeno, un dominio transmembranal, y un dominio de transducción de señales intracelular. El dominio de enlace al antígeno de CAR incluye un anticuerpo de cadena corta (scFv), en donde la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH) de la región variable del anticuerpo se enlazan en fila por medio de un espaciador tal como un enlazador (por ejemplo, un enlazador compuesto de G y S (enlazador de GS) (por ejemplo, GGGS, GGGGS o un enlazador que combine estos (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4 o 5, etc.), y similares)). Las células $\gamma\delta$ T que expresan el CAR reconocen el antígeno en la región scFv y a continuación transducen la señal de reconocimiento del mismo en las células T a través del dominio de transducción de señales intracelular. La introducción de CAR en las células $\gamma\delta$ T hace posible impartir especificidad al antígeno de interés. Por otra parte, debido a que el CAR puede reconocer directamente las moléculas de antígeno sin depender de los HLA clase I o clase II, también se puede inducir una alta respuesta inmunitaria contra las células con una disminución de la expresión génica de los HLA clase I o clase II. Como el antígeno dirigido por el CAR mencionado en lo anterior, se pueden mencionar los mismos antígenos que los antígenos previamente mencionados dirigidos por el TCR mencionado anteriormente.

Los ejemplos del dominio transmembranal de CAR incluyen, pero no se limitan a, los dominios transmembranales derivados a partir de una o más proteínas seleccionadas a partir del grupo que consiste en cadena α , cadena β o cadena ζ del TCR, CD28, cadena ϵ de CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, 4-1BB (CD137), y CD154, y similares. Se puede utilizar el dominio transmembranal de la molécula a partir de la cual se deriva el primer dominio de transducción de señales intracelular enlazado al dominio de enlace al antígeno. Por ejemplo, cuando la molécula a partir de la cual se deriva el primer dominio de transducción de señales intracelular enlazado al dominio de enlace al antígeno es CD28, el dominio transmembranal también se puede derivar a partir de CD28. De una manera alternativa, también se puede utilizar un dominio transmembranal artificialmente diseñado.

Los ejemplos del dominio de transducción de señales intracelular de CAR incluyen, pero no se limitan a, los dominios intracelulares derivados a partir de una o más proteínas seleccionadas a partir del grupo que consiste en cadena ζ de CD3 (cadena ζ de TCR), cadena γ de FcR, cadena β de FcR, cadena γ de CD3, cadena δ de CD3, cadena ϵ de CD3, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. De estos, es preferible un dominio de transducción de señales intracelular derivado a partir de la cadena ζ de CD3. El dominio de transducción de señales intracelular puede contener además un dominio intracelular de una molécula coestimulante. Los ejemplos de la molécula coestimulante incluyen los dominios intracelulares de una o más clases de las proteínas seleccionadas a partir del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado con la función de los linfocitos 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y CD83. La fuerza y duración de la actividad del CAR se pueden controlar por medio de la selección del tipo y número de la molécula coestimulante que se vayan a enlazar (por ejemplo, Mol Ther. 2009; 17: 1453-1464).

Se puede incorporar un espaciador entre el dominio de enlace al antígeno y el dominio transmembranal de CAR o entre el dominio de transducción intracelular y el dominio transmembranal de CAR. Como el espaciador, se puede utilizar un péptido que consiste en términos generales en no más de 300 aminoácidos, de preferencia de 10 a 100 aminoácidos, y de una manera más preferible de 25 a 50 aminoácidos. Los ejemplos específicos del mismo incluyen, pero no se limitan a, los péptidos que contienen una región de articulación derivada a partir de IgG1 y una región CH2CH3 de inmunoglobulina y una parte de CD3, y similares.

Los ejemplos de los CAR específicos incluyen, pero no se limitan a, un CAR de la primera generación en donde el scFv y la cadena ζ de CD3 se enlazan por medio de un espaciador, un CAR de la segunda generación en donde se incorporan un dominio transmembranal derivado a partir de CD28 y un dominio intracelular entre el scFv y la cadena ζ de CD3 del CAR de la primera generación con el fin de mejorar la capacidad para activar las células T, y un CAR de la tercera generación en donde se incorpora el dominio intracelular de una molécula coestimulante (4-1BB u OX40) diferente de CD28 entre el dominio intracelular de CD28 y la cadena ζ de CD3 de la segunda generación.

Los ejemplos más específicos de CAR utilizados en la presente invención incluyen un receptor de antígeno quimérico que contiene scFv que reconoce el CD19 como un dominio de enlace al antígeno, un dominio transmembranal de CD8 como un dominio transmembranal, un dominio intracelular derivado a partir de CD28 como un dominio de transducción de señales intracelular, un dominio intracelular derivado a partir de CD30, un dominio intracelular derivado a partir de 4-1BB y un dominio intracelular derivado a partir de la cadena ζ de CD3. El orden de los dominios intracelulares que se mencionan en lo anterior contenidos en el dominio de transducción de señales intracelular no se limita de una manera particular y, por ejemplo, se adopta el orden del dominio intracelular derivado a partir de CD28, el dominio intracelular derivado a partir de CD30 o el dominio intracelular derivado a partir de 4-1BB, y el dominio intracelular derivado a partir de la cadena ζ de CD3. De una manera más específica, el receptor de antígeno quimérico de la presente invención está compuesto de, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de aminoácidos que se obtiene por medio de la sustitución, supresión,

adición y/o inserción de uno o dos o más (de preferencia, de aproximadamente 1 a 100, de preferencia de aproximadamente 1 a 50, además de preferencia de aproximadamente 1 a 10, y de una manera en particular preferible de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2.

Los ejemplos del dominio intracelular derivado a partir de CD30 incluyen una secuencia de aminoácidos que se obtiene por medio de la sustitución, supresión, adición y/o inserción de uno o dos o más (de preferencia, de aproximadamente 1 a 100, de preferencia de aproximadamente 1 a 50, además de preferencia de aproximadamente 1 a 10, y de una manera en particular preferible de 1 a varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Cuando la secuencia de aminoácidos está sustituida, suprimida, añadida y/o insertada tal y como se describe en los párrafos anteriores, la localización de la sustitución, supresión, adición y/o inserción no se limita de una manera particular siempre y cuando se mantenga la función del dominio intracelular de CD30.

Se puede confirmar por medio de un método conocido que el TCR y/o el CAR anteriormente mencionados (más adelante en la presente algunas veces serán abreviados como "TCR, etc.") reconocen de una forma específica el antígeno y se pueden enlazar al mismo. Un método adecuado incluye, por ejemplo, el ensayo de dextrámero, el ensayo de ELISPOT, y similares. A través de la realización del ensayo de ELISPOT, se puede confirmar que las células T que expresan el TCR sobre la superficie celular reconocen el antígeno blanco por medio del TCR etc., y la señal del mismo ha sido transmitida al interior de las células.

De una forma adicional, los presentes inventores encontraron que la actividad citotóxica aumenta en las células que expresan una proteína de fusión que contiene IL-15 e IL-15R α (más adelante en la presente algunas veces serán abreviadas como "IL-15/IL-15R α ") junto con el CAR mencionado en los párrafos anteriores, en comparación con las células que expresan el CAR solo. Por lo tanto, a partir del aspecto de la actividad citotóxica, las células $\gamma\delta$ T que se obtienen por medio del método de producción de la presente invención de preferencia expresan IL-15/IL-15R α , y de una manera muy preferible expresan el CAR mencionado en los párrafos anteriores. Por lo tanto, para obtener las células $\gamma\delta$ T que expresan IL-15/IL-15R α , el método de producción de la presente invención puede incluir un paso de introducir un ácido nucleico que codifica IL-15/IL-15R α en las células que se obtienen en cualquiera de los pasos (1) y (2) del inciso 1 mencionado anteriormente. (por ejemplo, las células T positivas para CD3 que se obtienen en el paso (2-2), las células T positivas para CD3 concentradas en el paso (2-3), y similares).

En el sistema de transducción de señales de la IL-15, la IL-15R α expresada sobre las células presentadoras de antígeno en términos generales se enlaza a una IL-15, y la IL-15 se presenta ante el receptor de la IL-15 que consiste en IL-15R β y una cadena γ común (γ c) en la célula positiva para CD8 y negativa para CD4 (trans-presentación), en donde se mantiene la actividad citotóxica de la célula positiva para CD8 y negativa para CD4. Por lo tanto, cuando la célula positiva para CD3 que expresa IL-15/IL-15R α es positiva para CD8 y negativa para CD4, la célula puede transmitir la señal de IL-15 en su propia célula por medio del receptor de IL-15. De una manera alternativa, la célula positiva para CD3 que expresa IL-15/IL-15R α puede transmitir la señal de IL-15 en otras células positivas para CD8 y negativas para CD4

por medio del receptor de IL-15. Tal y como se describe en los párrafos anteriores, debido a que IL-15/IL-15R α pueden mantener la actividad citotóxica de la célula positiva para CD8 y negativa para CD4, se espera que muestre un efecto citotóxico continuo sobre las células dirigidas por el CAR.

IL-15/IL-15R α puede ser una proteína de tipo transmembranal o una proteína secretora. Se sabe que, en IL-15R α , el dominio de enlace a la IL-15 de 1 a 65 aminoácidos a partir del término N de la proteína madura es la región responsable de enlazarse a IL-15 (Wei X. y colaboradores, J. Immunol., 167: 277-282, 2001). Por lo tanto, la proteína de tipo transmembranal puede ser una proteína que conserve el dominio de enlace a la IL-15 y que conserve el dominio transmembranal de IL-15R α . Por otra parte, la proteína secretora puede ser una proteína que mantenga el dominio de enlace a la IL-15 y que carezca del dominio transmembranal de IL-15R α (por ejemplo, la proteína que consiste en 1 a 65 residuos de aminoácidos, de 1 a 85 residuos de aminoácidos, o de 1 a 182 residuos de aminoácidos de IL-15R α , el péptido que contiene una secuencia de aminoácidos no menos del 85 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos, y similares).

Se puede incorporar un espaciador entre IL-15 e IL-15R α de IL-15/IL-15R α . Como el espaciador, se puede utilizar un péptido que consista en términos generales en no más de 300 aminoácidos, de preferencia de 10 a 100 aminoácidos, y de una manera más preferible de 20 a 50 aminoácidos. Los ejemplos específicos del mismo incluyen, pero no se limitan a, el enlazador GS mencionado en lo anterior, y similares.

IL-15/IL-15R α no se limita de una manera particular siempre y cuando sea una proteína, en donde IL-15 e IL-15R α se fusionan, y los ejemplos específicos de la misma incluyen un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 6. Si bien la IL-15/IL-15R α no se limita de una manera particular siempre y cuando se pueda enlazar al receptor de la IL-15 y transmitir la señal de la IL-15 en la célula, por ejemplo, se puede mencionar un péptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una homología o identidad de no menos de aproximadamente el 90 por ciento, de preferencia de no menos de aproximadamente el 95 por ciento, de una manera más preferible de no menos de aproximadamente el 97 por ciento, de una manera particularmente preferible de no menos de aproximadamente el 98 por ciento, de una manera más preferible de no menos de aproximadamente el 99 por ciento con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6. Como se utiliza en el presente documento, la "homología" o "identidad" significa la proporción (el porcentaje) del mismo aminoácido o del residuo de aminoácido similar (los mismos residuos de aminoácidos en el caso de la identidad) con todos los residuos de aminoácidos traslapados en un alineamiento óptimo en donde dos secuencias de aminoácidos se alinean a través del uso de un algoritmo matemático conocido en el campo técnico pertinente (de preferencia, el algoritmo es de una manera tal que se puede introducir un hueco en una o ambas de las secuencias para el alineamiento óptimo). El "aminoácido similar" significa los aminoácidos que tienen propiedades físico-químicas similares y, por ejemplo, se pueden mencionar los aminoácidos clasificados en el mismo grupo, tales como los aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), los aminoácidos alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), los aminoácidos polares (Gln, Asn), los aminoácidos básicos (Lys, Arg, His), los aminoácidos ácidos (Glu, Asp), los aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (Ser, Thr), los aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña (Gly, Ala, Ser, Thr, Met), y similares. Se predice que la sustitución con tales aminoácidos similares

no cambie el fenotipo de la proteína (es decir, la sustitución de aminoácidos conservadora). Los ejemplos específicos de la sustitución de aminoácidos conservadora son bien conocidos en el campo técnico y se describen en diversos documentos (por ejemplo, Bowie y colaboradores, Science, 247: 1306-1310 (1990)). La homología o identidad de la secuencia de aminoácidos en la presente memoria descriptiva se puede

5 calcular a través del uso del algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool), y bajo las siguientes condiciones (expectativa = 10; aceptar hueco; matriz = BLOSUM62; filtración = OFF (apagada)).

El término "capaz de enlazarse", como se utiliza en el presente documento, significa "que tiene una capacidad para enlazarse" y se refiere a una capacidad para formar un complejo no covalente con una o

10 más de otras moléculas. Se conocen en la materia diversos métodos y ensayos con el fin de determinar la capacidad de enlace. El enlace es por lo regular un enlace con una alta afinidad, en donde la afinidad como se mide en valores de KD de preferencia es de menos de 1 μ M, de una manera más preferible de menos de 100 nM, todavía de una manera más preferible de menos de 10 nM, todavía de una manera más preferible de menos de 1 nM, todavía de una manera más preferible de menos de 100 pM, todavía de una

15 manera más preferible de menos de 10 pM, y todavía de una manera más preferible de menos de 1 pM. El término "KD" o "valor de KD" se refiere a la constante de disociación en equilibrio como se conoce en la materia.

El TCR etc. anteriormente mencionado se introduce en las células en la forma de un ácido nucleico que codifica el TCR etc. Por otra parte, una proteína de fusión que contiene las IL-15 e IL-15R α también

20 se introduce en una célula en la forma de un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, o una quimera de ADN/ARN, y de preferencia ADN. Por otra parte, el ácido nucleico puede ser de doble cadena o de una sola cadena. En el caso de las dobles cadenas, se puede utilizar el ADN de doble cadena, el ARN de doble cadena o el ADN:ARN híbrido. Cuando el ácido nucleico es ARN, T se debe leer como U con respecto a la secuencia de ARN. Por otra parte, el ácido nucleico

25 puede contener los nucleótidos naturales, los nucleótidos modificados, los análogos de nucleótidos, o una mezcla de los mismos, siempre y cuando se pueda expresar el polipéptido *in vitro* o en una célula.

El ácido nucleico mencionado en lo anterior se puede construir por medio de un método que es conocido por sí mismo. Por ejemplo, con base en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia de ácido nucleico del TCR o CAR conocidos, una cadena de ADN se sintetiza químicamente, o se sintetiza por

30 medio de un traslape parcial de cadenas cortas de oligo ADN que se conectan a través del uso del método de PCR o del método de ensamblaje de Gibson, en donde se puede construir un ADN que codifica la longitud completa o una parte del TCR o CAR. El ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que contiene IL-15 e IL-15R α también se puede construir de la misma manera.

El ácido nucleico mencionado en lo anterior se puede incorporar en un vector de expresión. El vector

35 puede ser un vector que se integra o no se integra en el genoma de la célula blanco. En una modalidad, el vector que no se integra en el genoma es capaz de replicarse afuera del genoma de la célula blanco. El vector puede estar presente en múltiples copias afuera del genoma de la célula blanco. En otra modalidad de la invención, el vector se integra en el genoma de la célula blanco. En las modalidades preferibles, el

vector se integra en una ubicación definida previamente del genoma de la célula blanco.

Los ejemplos del promotor para usarse en el vector mencionado en lo anterior incluyen el promotor EF1 α , el promotor de CAG, el promotor de SR α , el promotor de SV40, el promotor de LTR, el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor de RSV (virus de sarcoma de Rous), el promotor de MoMuLV (virus de leucemia de ratón de Moloney) LTR, HSV-TK (cinasa de timidina de virus de herpes simple), el promotor del gen V α de TCR, el promotor del gen V β de TCR, y similares. De estos, son preferibles el promotor de EF1 α , el promotor de CAG, el LTR de MoMuLV, el promotor de CMV, el promotor de SR α , y similares.

El vector mencionado en lo anterior puede contener la secuencia reguladora de transcripción y traducción, el sitio de enlace al ribosoma, el potenciador, el origen de replicación, la señal de adición de poli A, el gen marcador de selección, y similares sobre demanda además de los promotores mencionados anteriormente. Los ejemplos del gen marcador de selección incluyen el gen de reductasa de dihidrofolato, el gen de resistencia a la neomicina, el gen de resistencia a la puromicina, y similares.

En una modalidad de la presente invención, los heterodímeros de cadena α y de cadena β del TCR se pueden construir en la célula blanco y sobre la superficie celular por medio de la introducción de un vector de expresión que contenga un ácido nucleico que codifique la cadena α del TCR y un ácido nucleico que codifique la cadena β del TCR en la célula blanco. En este caso, el ácido nucleico que codifica la cadena α del TCR y el ácido nucleico que codifica la cadena β del TCR se pueden incorporar en vectores de expresión separados o en un solo vector de expresión. Cuando se incorporan en un solo vector de expresión, estas dos clases de ácidos nucleicos de preferencia se incorporan por medio de una secuencia que haga posible la expresión policistrónica. A través del uso de una secuencia que haga posible la expresión policistrónica, los genes plurales incorporados en una clase de vector de expresión se pueden expresar de una forma más eficiente. Los ejemplos de la secuencia que hace posible la expresión policistrónica incluyen la secuencia 2A (por ejemplo, la secuencia 2A derivada del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV, por sus siglas en inglés) (F2A), la secuencia 2A derivada del virus de rinitis de caballo A (ERAV, por sus siglas en inglés) (E2A), la secuencia 2A derivada del teschovirus porcino (PTV-1, por sus siglas en inglés) (P2A), la secuencia 2A derivada del virus Thosea asigna (TaV, por sus siglas en inglés) (secuencia de T2A) (PLoS ONE3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007), el sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,937,190), y similares. Desde el aspecto de los niveles de expresión uniformes, son preferibles la secuencia de P2A y la secuencia de T2A. Se aplica lo mismo al caso del uso de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la cadena γ del TCR y un ácido nucleico que codifica la cadena δ del TCR.

El vector de expresión previamente mencionado no se limita de una manera particular siempre y cuando pueda expresar el TCR etc., durante un período de tiempo suficiente para la prevención o el tratamiento de una enfermedad cuando se introduzca en una célula. Los ejemplos del mismo incluyen un vector de virus, un vector de plásmido, y similares. Como el vector de virus, se pueden mencionar un vector de retrovirus (el cual incluye un vector de lentivirus y un vector de tipo pseudo), un vector de adenovirus, un vector de virus adeno-asociado, un vector de virus de herpes, Sendaivirus, un vector episómico, y similares. También se puede utilizar un sistema de expresión de transposón (sistema PiggyBac). Como el

vector del plásmido, se puede mencionar un plásmido de expresión de célula de animal (por ejemplo, pa1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo), y similares.

No hay ninguna limitación particular sobre el método para introducir el ácido nucleico o el vector mencionados en lo anterior en las células, y se pueden emplear los métodos conocidos. Cuando se introducen el ácido nucleico y el vector de plásmido, se puede utilizar un método similar al método que se describe en el paso 1.(1) mencionado anteriormente. De una manera alternativa, el ácido nucleico mencionado en lo anterior se puede introducir en el genoma de la célula por medio de la edición del genoma (por ejemplo, sistema de CRISPR, TALEN, ZFN, y similares).

El ácido nucleico mencionado en lo anterior también se puede introducir de una forma directa en las células en la forma de ARN y se utiliza para expresar el TCR etc. en las células. Como un método para introducir el ARN, se puede utilizar un método conocido y, por ejemplo, se puede utilizar de preferencia un método de lipofección, un método de electroporación, o similares.

En los pasos (1) y (2) mencionados en lo anterior, el momento de la introducción del ácido nucleico previamente mencionado no se limita de una manera particular siempre y cuando se pueda expresar el TCR etc. introducido en las células $\gamma\delta$ T. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede introducir en la etapa de la célula iPS, HPC (CD34+/ CD43+), las células ProT (CD4-/ CD8-), las células T CD3+/ CD4+/ CD8+, las células T CD3+/ CD4-/ CD8+, u otras células (por ejemplo, las células CD3-/ CD4+/ CD8+, etc.).

Cuando el ácido nucleico mencionado en lo anterior se introduce en las células, la expresión de la cadena endógena del TCR expresada intrínsecamente por medio de las células de preferencia se suprime por medio del siARN en virtud de un incremento en la expresión del TCR introducido, la supresión del surgimiento del TCR mal emparejado, y la supresión de la reactividad no propia. Cuando el ácido nucleico mencionado en lo anterior se aplica a este método, para evitar el efecto del siARN sobre el TCR, es preferible que la secuencia de bases del ácido nucleico que codifica el TCR sea una secuencia (secuencia de tipo de conversión de codones) diferente de la secuencia de bases correspondiente al ARN sobre el que actuó el siARN por medio de la supresión de la expresión de la cadena del TCR endógeno. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2008/153029. La secuencia de bases mencionada en lo anterior se puede producir por medio de la introducción de una mutación silenciosa en un ácido nucleico que codifique el TCR que se obtiene de una forma natural o por medio de la síntesis química del ácido nucleico artificialmente diseñado. Con el fin de evitar un mal emparejamiento con la cadena del TCR endógeno, una parte o todas las regiones constantes del ácido nucleico que codifica el receptor de las células T introducido también pueden ser sustituidas con una región constante derivada a partir de un animal diferente de un ser humano, tal como un ratón.

2. Células $\gamma\delta$ T o población de células que contiene células $\gamma\delta$ T

La presente invención también proporciona una célula $\gamma\delta$ T, o una población de células que contiene las células $\gamma\delta$ T, en donde la célula $\gamma\delta$ T es una célula diferenciada a partir de una célula madre pluripotente inducida derivada a partir de una célula diferente de una célula $\alpha\beta$ T. La proporción de las células $\gamma\delta$ T contenidas en la población de células que se menciona en el párrafo anterior (número de células $\gamma\delta$ T contenidas en la población de células/ número total de las células contenidas en la población de células)

es de preferencia de no menos del 90 por ciento (por ejemplo, de no menos del 90 por ciento, de no menos del 95 por ciento, de no menos del 96 por ciento, de no menos de 97 por ciento, de no menos del 98 por ciento, de no menos del 99 por ciento o del 100 por ciento). Dicha población de células se puede obtener, por ejemplo, por medio del método de producción de la presente invención. La proporción se calcula a través de la medición de la proporción de las células que expresan γ TCR, δ TCR y CD3 por medio de la citometría de flujo. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona células $\gamma\delta$ T que se producen por medio del método de producción de la presente invención y/o una población de células que contiene las células $\gamma\delta$ T. Las células $\gamma\delta$ T mencionadas en lo anterior pueden contener el ácido nucleico que codifica el TCR exógeno, el ácido nucleico que codifica el CAR, y/o el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que contiene IL-15 e IL-15R α , los cuales se describen en el inciso 1 anteriormente mencionado. En lo siguiente, las células $\gamma\delta$ T o la población de células que contiene las células $\gamma\delta$ T mencionadas son referidas de una forma colectiva como "la célula etc. de la presente invención".

3. Medicamento que contiene la célula etc. de la presente invención

La presente invención proporciona un medicamento que contiene la célula etc. de la presente invención, como un ingrediente activo (más adelante en la presente será algunas veces referido como "el medicamento de la presente invención"). La célula etc. de la presente invención puede exhibir una actividad citotóxica contra la célula de cáncer, la célula madre de cáncer, la célula tumoral, y similares. Por lo tanto, un medicamento que contiene la célula etc. de la presente invención se puede utilizar para la profilaxis o el tratamiento de un tumor tal como cáncer, y se puede administrar, por ejemplo, a los mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono, ser humano), de preferencia a un ser humano. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, se proporciona la célula etc. de la presente invención, para usarse para la profilaxis o el tratamiento de un tumor. Por otra parte, se proporciona un método para la prevención o el tratamiento de tumores, el cual incluye la administración de la célula etc. de la presente invención, de preferencia en la forma de un medicamento que contiene la célula, y similares.

Dicho tumor tal como cáncer prevenido o tratado por medio del medicamento de la presente invención o la célula etc. de la presente invención se describe, por ejemplo, en "Daniel Baumhoer y colaboradores, Am J. Clin Pathol, 2008, 129, 899-906" y similares. El tumor incluye un tumor benigno, un tumor maligno (también referido como "cáncer"), y un tumor que puede ser diagnosticado o determinado como benigno o maligno. Los ejemplos específicos del tumor incluyen, pero no se limitan a, cáncer de hígado (por ejemplo, hepatoma), cáncer de ovario (por ejemplo, adenocarcinoma de células claras de ovario), cáncer infantil, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar microcelular), cáncer de testículos (por ejemplo, tumor de células germinales no seminomas), tumor de tejido blando (por ejemplo, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno), cáncer del útero (por ejemplo, tumor intraepitelial de cérvix, carcinoma de células escamosas de cérvix), melanoma, tumor de glándula suprarrenal (por ejemplo, adenoma de glándula suprarrenal), tumor neurótico (por ejemplo, schwannoma), cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma de estómago), cáncer renal (por ejemplo, tumor de Grawitz), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma lobular invasivo, cáncer mucoso), cáncer de la tiroides (por

ejemplo, cáncer medular), cáncer de laringe (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cáncer de vejiga urinaria (por ejemplo, carcinoma invasivo de células de transición), y similares.

Las células que serán contenidas en el medicamento de la presente invención se pueden cultivar y/o estimular a través del uso de un medio apropiado y/o de una molécula estimulante antes de su administración a un sujeto. Los ejemplos de la molécula estimulante incluyen, pero no se limitan a, citocinas, una proteína adecuada, otros componentes y similares. Los ejemplos de las citocinas incluyen IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- γ , y similares, y de preferencia se puede utilizar la IL-2. Aunque la concentración de IL-2 en el medio no se limita de una manera particular, por ejemplo, es de preferencia de 0.01 U por mL a 1×10^5 U por mL, de una manera más preferible de 1 U por mL a 1×10^4 U por mL. Los ejemplos de la proteína adecuada incluyen el ligando de CD3, el ligando de CD28, y el anticuerpo anti-IL-4. Además de estos, también se puede agregar un factor de estimulación de linfocitos tal como lectina y similares. De una forma adicional, se puede agregar al medio un suero o plasma. Aunque la cantidad de la adición a estos medios no se limita de una manera particular, se puede mencionar del 0 por ciento en volumen al 20 por ciento en volumen. Por otra parte, la cantidad de suero o plasma para usarse se puede cambiar de acuerdo con la etapa de cultivo. Por ejemplo, la concentración en suero o en plasma se puede reducir por pasos. El origen del suero o plasma puede ser ya sea autólogo o bien alogénico, y el autólogo es el preferible desde el punto de vista de la seguridad.

El medicamento de la presente invención se utiliza de preferencia por medio de su administración parenteral al sujeto. Los ejemplos del método para su administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea, y similares. Aunque la dosis se selecciona apropiadamente de acuerdo con la afección, el peso corporal, la edad y similares del sujeto, el medicamento en general se administra de una manera tal que el número de células es en general de 1×10^6 a 1×10^{10} células, de preferencia de 1×10^7 a 1×10^9 células, y de una manera más preferible de 5×10^7 a 5×10^8 células por dosis a un sujeto con un peso corporal de 60 kg. El medicamento se puede administrar una vez, o en múltiple porciones divididas. El medicamento de la presente invención se puede formular en una forma conocida adecuada para su administración parenteral, por ejemplo, en inyección o en un agente de inyección. El medicamento de la presente invención puede contener los excipientes farmacológicamente aceptables, como sea apropiado. El medicamento de la presente invención puede contener solución salina, PBS, un medio, y similares, con el fin de mantener las células establemente. El medio no se limita de una manera particular, y los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a, un medio, tal como RPMI, AIM-V, X-VIVO10, y similares. El medicamento puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, albúmina de suero humano), un conservador, y similares para los propósitos de la estabilización.

De una forma adicional, debido a que la célula etc. de la presente invención puede ser de células aniquiladoras que expresen un antígeno blanco, tal como el antígeno de tumor mencionado en lo anterior y similares, se puede utilizar como un agente de aniquilación para las células (por ejemplo, células de cáncer, células madre de cáncer, células tumorales, etc.) que expresen el antígeno. Este agente de aniquilación se puede producir y utilizar de la misma manera que el medicamento mencionado en lo

anterior.

La presente invención también incluye las modalidades del uso de la célula etc. de la presente invención, en la producción de agentes profilácticos o terapéuticos para tumores, de acuerdo con el medicamento que contiene la célula etc. de la presente invención. Los agentes profilácticos o terapéuticos para tumores se pueden producir por medio de un método que es conocido por sí mismo. Por ejemplo, se pueden producir en una forma conocida adecuada para su administración parenteral, tal como inyección, agente inyectable, o similares, tal como en el método de preparación del medicamento de la presente invención mencionado anteriormente.

La presente invención se explica de una forma más específica por medio de los siguientes ejemplos. El alcance de la presente invención no está limitada por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudio del método para la producción de la célula que expresa $\gamma\delta$ TCR

Como una población de células que contiene las células progenitoras hematopoyéticas, se usó una población de células suspendidas diferenciadas a partir de las células iPS (cepa Ff-I01S04: derivada a partir de las células mononucleares de sangre periférica de un individuo sano) proporcionada por el Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, los métodos que se describen en Cell Reports 2 (2012) 1722-1735 y en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/221975). Para ser específicos, la cepa Ff-I01s04 se sembró a 3×10^5 células por pozo (Día 0) en una placa de 6 pozos tratada con ultra baja adhesión, se agregaron 10 ng por mL de BMP4, 50 ng por mL de bFGF, 15 ng por mL de VEGF, y 2 μ M de SB431542 al medio EB (se agregó StemPro34 con 10 μ g por mL de insulina humana, 5.5 μ g por mL de transferrina humana, 5 ng por mL de selenita de sodio, 2 mM de L-glutamina, 45 mM de α -monotioglicerol, y 50 μ g por mL de 2-fosfato de ácido ascórbico), y las células se cultivaron durante 5 días bajo condiciones de bajo contenido de oxígeno (O_2 al 5 por ciento) (Día 5). Entonces, se agregaron 50 ng por mL de SCF, 30 ng por mL de TPO, y 10 ng por mL de FLT-3L, y las células se cultivaron durante 5 a 9 días (- día 14), para dar una población de células suspendidas. El medio se cambió cada dos o tres días durante el período de cultivo. La población de células suspendidas mencionada anteriormente que contenía HPC se tiñó a través del uso del siguiente conjunto de anticuerpos.

Tabla 1

anticuerpo anti-CD34	Abcam PE/Cy7
anticuerpo anti-CD43	BD APC
anticuerpo anti-CD45	BioLegend BV510
anticuerpo anti-CD14	BioLegend APC/eFluor780
anticuerpo anti-CD235a	BD FITC

Las poblaciones de células que experimentaron la tinción mencionada en lo anterior, se sometieron a una clasificación por medio de FACS Aria. Las fracciones celulares que se obtuvieron se diferenciaron en las células linfoides de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, los métodos que se describen en Journal of Leukocyte Biology 96 (2016) 1165-1175 y en la Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/221975). Para ser específicos, la población de células progenitoras hematopoyéticas se sembró a 2000 células por pozo en una placa de 48 pozos recubierta con la quimera de h-DLL4/Fc recombinante (Sino Biological), y retronectina (Takara Bio Inc.), y se cultivaron bajo condiciones de CO₂ al 5 por ciento, a 37 °C. El medio se cambió cada dos o tres días durante el período de cultivo. Como el medio, se usó el medio α MEM adicionado con FBS al 15 por ciento, L-glutamina 2 mM, 100 U por mL de penicilina, 100 ng por mL de estreptomina, 2-mercaptoetanol 55 μ M, 50 μ g por mL de 2-fosfato de ácido ascórbico, 10 μ g por mL de insulina humana, 5.5 μ g por mL de transferrina humana, 5 ng por mL de selenita de sodio, 50 ng por mL de SCF, 50 ng por mL de IL-7, 50 ng por mL de FLT-3L, 100 ng por mL de TPO, SB 203580 15 μ M, y 30 ng por mL de SDF-1 α . Las células se pasaron a una placa de 48 pozos similarmente recubierta en el día 7 y en el día 14 desde el inicio del cultivo. Todas las células se recolectaron en el día 21 desde el inicio del cultivo (Día 35), y la presencia de las fracciones CD45(+), CD3(+) se confirmó por medio de un citómetro de flujo (BD FACS Aria^{MR} Fusion, fabricado por BD Biosciences). Las células que se obtuvieron se sembraron en una placa de 24 pozos y se cultivaron bajo condiciones de CO₂ al 5 por ciento, a 37 °C. Como el medio, se usó un medio α MEM adicionado con FBS al 15 por ciento, L-glutamina 2 μ M, 100 U por mL de penicilina, 100 ng por mL de estreptomina, 50 μ g por mL de 2-fosfato de ácido ascórbico, 10 μ g por mL de insulina humana, 5.5 μ g por mL de transferrina humana, 5 ng por mL de selenita de sodio, 500 ng por mL de anticuerpo anti-CD3 (OKT3), dexametasona 10 μ M (Fuji Pharma: 10171-H02H), 100 U por mL de IL-2, y 10 ng por mL de IL-7. Todas las células se recolectaron en el día 27 desde el inicio del cultivo (Día 41), las células se contaron por medio de un hemocitómetro, y se tiñeron a través del uso del siguiente conjunto de anticuerpos.

Tabla 2

V δ 1 Myltenyi FITC
V δ 2 Myltenyi APC
$\gamma\delta$ TCR BD BV510
CD3 BioLegend APC/Cy7
$\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC

Como un resultado de la tinción, se demostró que se puede preparar una célula que exprese $\gamma\delta$ TCR (célula positiva para $\gamma\delta$ TCR) a partir de una célula progenitora hematopoyética derivada a partir de una célula iPS (cepa Ff-I01s04) (figura 1).

De una forma adicional, debido a que la célula positiva para $\gamma\delta$ TCR contiene la célula $\gamma\delta$ T positiva para V δ 1 y la célula $\gamma\delta$ T positiva para V δ 2, se demostró que se pueden preparar las células $\gamma\delta$ T de tipo V δ 1 y de tipo V δ 2 (figura 2).

5

Ejemplo 2 - Estudio de actividad citotóxica de la célula $\gamma\delta$ T

Se evaluó la actividad citotóxica de la célula $\gamma\delta$ T derivada a partir de la célula iPS (cepa Ff-I01s04), y obtenida en el ejemplo 1. A través del uso de la línea celular de mesotelioma NCI-H226 como una célula blanco, el reactivo DELFIA BATDA (Perkin Elmer) se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se lavó; una población celular de células $\gamma\delta$ T derivadas a partir de las células iPS (cepa Ff-I01s04), y que contenía las células $\gamma\delta$ T positivas para V δ 1 y las células $\gamma\delta$ T positivas para V δ 2, se mezcló en una proporción de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 veces en relación con la célula blanco. La actividad citotóxica de las células $\gamma\delta$ T derivadas a partir de las células iPS (cepa Ff-I01s04) se evaluó con base en la muerte de la célula blanco 2 horas más tarde.

10

15

Como un resultado de la evaluación, se demostró que la célula $\gamma\delta$ T derivada a partir de la célula iPS (cepa Ff-I01s04) tiene una actividad citotóxica contra línea de células tumorales NCI-H226 (figura 3).

Cultivo en expansión y evaluación de la función de las células i $\gamma\delta$ T

Ejemplo 3 - Producción de células i $\gamma\delta$ T

Por medio del mismo método que en el ejemplo 1, con la excepción de que se utilizó UCHT1 (elaborado por GeneTex) como el anticuerpo anti-CD3, se produjeron las células $\gamma\delta$ T (células i $\gamma\delta$ T) derivadas a partir de las células iPS (cepa Ff-I01s04).

20

Ejemplo 4 - Cultivo en expansión de células i $\gamma\delta$ T

Las células i $\gamma\delta$ T obtenidas en el ejemplo 3 se suspendieron a 2,000,000 células por mL en un medio de α -mEM que contenía FBS al 15 por ciento y un aditivo que contenía citocina de la tabla 3, sembrada en una placa en fase sólida con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1), y retronectina, y se cultivaron con CO₂ al 5 por ciento y a 37 °C durante 3 días. En el tercer día de cultivo, las células se recolectaron a partir de la placa, el número de las células se contó a través del uso del NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec), y las células se suspendieron en una cantidad apropiada en un medio de α -mEM que contenía FBS al 15 por ciento y un aditivo que contenía citocina de la tabla 4, se agregaron a una placa de 6 pozos no inmovilizada G-Rex (marca comercial registrada) (WILSON WOLF), y se cultivaron con CO₂ al 5 por ciento y a 37 °C. Una parte de las células se recolectaron a partir de la placa de 4 a 6 veces en los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 y 17, y el número de las células se contó a través del uso de un hemocitómetro.

25

30

El anticuerpo anti-CD3 y la RetroNectina se inmovilizaron sobre la placa de cultivo por medio del siguiente método. El anticuerpo anti-CD3 (UCHT1, concentración final de 3000 ng por mL), y la RetroNectina (concentración final de 150 μ g por mL) disueltos en PBS en las concentraciones necesarias se agregaron a la placa y a continuación se dejaron reposar durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, la placa se sometió a la prueba.

35

Tabla 3

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina, transferrina, selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 µg por mL
IL-2	Peprotech	15 ng por mL
IL-7	Peprotech	10 ng por mL
IL-15	Peprotech	10 ng por mL
IL-21	Peprotech	20 ng por mL
IL-12	Merck	50 ng por mL
IL-18	MBL	50 ng por mL
TL-1A	Peprotech	50 ng por mL
Z-VAD-FMK	R&D	10 µM
Anticuerpo CD30 humano	R&D	300 ng por mL

Tabla 4

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina, transferrina, selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 µg por mL
IL-2	Peprotech	15 ng por mL
IL-7	Peprotech	10 ng por mL
IL-15	Peprotech	10 ng por mL
Anticuerpo CD30 humano	R&D	300 ng por mL

Se observó la proliferación de las células iγδT por medio del estímulo con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y el anticuerpo anti-CD30 (figura 4).

Ejemplo 5 - Producción de células Vy9 Vδ2T derivadas de células iPS

1. Preparación de la célula iPS

Como la célula iPS, de una forma similar al ejemplo 1, se usó la cepa Ff-I01s04 proporcionada por el Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University. Las células iPS se cultivaron de acuerdo con el protocolo de "cultivo libre de alimentador de las células iPS humanas" distribuido por el CiRA.

2. Diferenciación de la célula iPS en HPC

La diferenciación de las células iPS en las células progenitoras hematopoyéticas (HPC, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo de acuerdo con un método conocido (Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/221975) como en el ejemplo 1.

3. Gen de Vy9 Vδ2

Se usó el receptor de células T Vy9Vδ2 derivado del clon de la célula G115γδT (Vy9Vδ2TCR G115). Como un ácido nucleico que incluía un gen que codificaba Vy9Vδ2TCR G115, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codificaba un polipéptido (SEQ ID NO: 7) diseñado para alinearse en el orden que se muestra en la tabla 5 a partir del término N.

Tabla 5

Orden desde el término N	Gen	Número de aminoácido
1	TRG (derivado de G115)	315
2	P2A	22
3	TRD (derivado de G115)	292

4. Producción de vector de retrovirus portador del gen de Vy9Vδ2

Como el vector de lentivirus, se utilizó el pLVSIN-Ub en donde la secuencia que codificaba el gen de resistencia a la neomicina se retiró a partir de pLVSIN-CMV Neo (Clontech Laboratories, Inc.), y el promotor de CMV fue reemplazado con el promotor de ubiquitina humana. El oligo ADN artificial que se sintetizó en el ejemplo 5, 3. se incorporó en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pLVSIN-Ub. A través del uso de este plásmido y de la línea celular Lenti-XMR 293T y los Packaging Single Shots Lenti-X^{MR} (VSV-G) de Clontech Laboratories, Inc., se produjo un vector lentiviral.

5. Producción de células Vy9 Vδ2T derivadas de células iPS

Las células iPS preparadas en el ejemplo 5, 1., y la célula progenitora hematopoyética (HPC, por sus siglas en inglés) derivada de la célula iPS preparada en el ejemplo 5, 2., se infectó con el vector de retrovirus preparado en el ejemplo 5, 4., que era portador del gen de Vy9 Vδ2. Estas células se diferenciaron en las células T de acuerdo con un método conocido (Publicación Internacional de Patente No. WO 2017/

221975) de la misma manera que en el ejemplo 1 para la preparación de las células V γ 9V δ 2T derivadas de la célula iPS. Como el anticuerpo anti-CD3 utilizado en el paso de diferenciación, se usaron 500 ng por mL de UCHT1 (elaborado por Gene Tex). (Más adelante en la presente, las células V γ 9V δ 2T derivadas de la célula iPS preparadas a partir de las células iPS son algunas veces referidas como las "células i γ 9 δ 2T", y las células V γ 9V δ 2T derivadas de iPS preparadas a partir de las HPC derivadas de la célula iPS son algunas veces referidas como las "células iH γ 9 δ 2T"). Las células i γ 9 δ 2T y las células iH γ 9 δ 2T obtenidas se midieron para determinar la expresión de CD3, $\gamma\delta$ TCR, V γ 9 y V δ 2 sobre la superficie de la membrana celular con un citómetro de flujo (BD FACSAria^{MR} Fusion, fabricado por BD Biosciences (figuras 5 y 6).

Ejemplo 6 - Producción de células CAR/ IL-15 $\gamma\delta$ T anti-CD19 derivadas de células iPS

1. Gen de CAR anti-CD19

Como un ácido nucleico que incluye el gen de CAR anti-CD19, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codificaba un polipéptido (SEQ ID NO: 2) diseñado para alinearse en el orden que se muestra en la tabla 6 a partir del término N.

Tabla 6

Orden desde el término N	Gen	Número de aminoácido
1	Secuencia delantera de cadena pesada de inmunoglobulina	22
2	Región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	104
3	Enlazador GGGGS	15
4	Región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	120
5	Secuencia derivada de CD8 (la cual incluye región transmembranal)	83
6	Región de dominio intracelular de CD28	41
7	Región de dominio intracelular de 4-1BB	47
8	Región de dominio intracelular de CD3 ζ	112

2. Producción de vector de retrovirus portador del gen de CAR anti-CD19

El oligo ADN artificial sintetizado en el ejemplo 6, 1., se incorporó en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pMY. A través del uso de las células FRY-RD18 para la producción del vector de retrovirus, se produjo un vector de virus.

3. Gen de IL-15 α /IL-15

Como un ácido nucleico que incluye los genes de IL-15 α /IL-15, se sintetizó un oligo ADN que codificó un polipéptido (SEQ ID NO: 6) diseñado para alinearse en el orden que se muestra en la tabla 7 a partir del término N.

Tabla 7

Orden desde el término N	Gen	Número de aminoácido
1	Secuencia delantera de IL-2 humana	23
2	Secuencia C-terminal de IL-15 humana	114
3	Enlazador GGGGS	24
4	Secuencia C-terminal de IL-15RA humana	239

4. Producción de vector de retrovirus portador de los genes de IL-15 α /IL-15

El oligo ADN artificial sintetizado en el ejemplo 6, 3., se incorporó en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pMY. A través del uso de las células FRY-RD18 para la producción del vector de retrovirus, se produjo un vector de virus.

5. Producción de células CAR/IL-15 γ δ T anti-CD19 derivadas de la célula iPS

Las células i γ δ T obtenidas en el ejemplo 4 y las células iHy9 δ 2T que se produjeron en el ejemplo 5, se infectaron con el vector de retrovirus portador del gen de CAR anti-CD19 producido en el ejemplo 6, 2., y con el vector de retrovirus portador de los genes de IL-15 α /IL-15 producido en el ejemplo 6, 4., con el fin de producir las células CAR/IL-15 γ δ T anti-CD19 derivadas de la célula iPS. (Más adelante en el presente documento las células CAR/IL-15 γ δ T anti-CD19 derivadas de las células iPS preparadas a partir de las células i γ δ T son algunas veces referidas como las "células iHCD19CAR /IL-15 γ δ T", y las células CAR/IL-15 γ δ T anti-CD19 derivadas de las células iPS preparadas a partir de las células iHy9 δ 2T son algunas veces referidas como las "células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T").

Ejemplo 7 - Cultivo en expansión de las células CAR/IL-15 γ δ T anti-anti-CD19 derivadas de la célula iPS

1. Cultivo en expansión de las células iHCD19CAR /IL-15 γ δ T

Por medio de un método similar a aquel del ejemplo 4, se llevó a cabo un cultivo en expansión de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T obtenidas en el ejemplo 6. Se usó un medio que contenía un aditivo que contenía citocina de la tabla 8 en lugar del aditivo que contenía citocina de la tabla 3, y un aditivo que

contenía citocina de la tabla 9 en lugar del aditivo que contenía citocina de la tabla 4.

Tabla 8

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina, transferrina, selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 µg por mL
IL-7	Peprotech	10 ng por mL
IL-15	Peprotech	10 ng por mL
IL-21	Peprotech	20 ng por mL
IL-12	Merck	50 ng por mL
IL-18	MBL	50 ng por mL
TL-1A	Peprotech	50 ng por mL
Z-VAD-FMK	R&D	10 µM
Anticuerpo CD30 humano	R&D	300 ng por mL

Tabla 9

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina, transferrina, selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 µg por mL
IL-7	Peprotech	10 ng por mL
IL-15	Peprotech	10 ng por mL

Se observó la proliferación de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T por medio de la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y el anticuerpo anti-CD30 (figura 7).

2. Cultivo en expansión de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T

Por medio de un método similar a aquel del ejemplo 7, 1., se llevó a cabo el cultivo en expansión de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T obtenidas en el ejemplo 6. No se agregó el anticuerpo anti-CD30 humano (anticuerpo CD30 humano).

Se observó la proliferación de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T por medio del estímulo con el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) (figura 8).

Ejemplo 8 - Estudio de la actividad citotóxica de las células CAR/IL-15 γ δ T anti-CD19 derivadas de la célula iPS

Se evaluó la actividad citotóxica de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T y de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T obtenidas en el ejemplo 7. A través del uso de la célula Raji positiva para CD19 y la célula CCRF-CEN negativa para CD19 como las células blanco, se mezclaron las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T o las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T en una proporción de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 veces en relación con la célula blanco. La actividad citotóxica de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T y las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T se evaluó con base en la proporción de la muerte de la célula blanco 2 horas más tarde.

Como un resultado de la evaluación, se demostró que las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T y las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T tienen una actividad citotóxica contra la célula Raji positiva para CD19, y no tienen ninguna actividad citotóxica contra la célula CCRF-CEN negativa para CD19 (figuras 9 y 10).

Ejemplo 9 - Número de día de supervivencia que extiende el efecto de la célula iCD19CAR /IL-15 γ δ T

5 x 10⁵ células Nalm6 (ATCC) se trasplantaron a los ratones NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) (Central Institute for Experimental Animals, hembras, de 7 a 8 semanas de edad) por medio de la vena de la cola para la preparación de los ratones con xenoinjerto de Nalm6. En el día 4 después del trasplante, se administró una suspensión de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T (5 x 10⁶ (células)) obtenidas en el ejemplo 6, en 0.1 mL del regulador de HBSS o una cantidad igual del regulador de HBSS (control) por medio de la vena de la cola, y se confirmó el número de los días de supervivencia.

Todos los ratones trasplantados con las células de cáncer Nalm6 positivas para CD19 por medio de la vena de la cola murieron dentro de 3 semanas en el grupo de administración de control, mientras que todos los ratones sobrevivieron durante por lo menos 6 semanas en el grupo de administración de las células iCD19CAR /IL-15 γ δ T (figura 11).

Ejemplo 10 - Efecto antitumoral *in vivo* de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T

Las células Nalm6 que expresaban la luciferasa (5 x 10⁵ células, ATCC) se trasplantaron a los ratones NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) (Central Institute for Experimental Animals, hembras, de 7 a 8 semanas de edad) por medio de la vena de la cola para la preparación de los ratones con xenoinjerto de Nalm6 que expresaban la luciferasa. En el día 4 después del trasplante, se administró una suspensión de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T (5 x 10⁶ células)) obtenida en el ejemplo 6, en 0.1 mL del regulador de HBSS o una cantidad igual del regulador de HBSS (control) por medio de la vena de la cola. Dos semanas después de la administración, se administró luciferina por medio de la vena de la cola, y se midió

la actividad de luciferasa expresada por las células Nalm6 a través del uso del sistema de toma de imágenes IVIS (IVIS LUMINA II, fabricado por CaliperLS).

En el grupo de administración de control, se confirmó la luminiscencia derivada a partir de las células Nalm6 a través de todo el cuerpo, mientras que difícilmente se detectó la luminiscencia fue en el grupo de administración de las células iHCD19CAR /IL-15 γ 9 δ 2T (figura 12).

Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con la presente invención, la célula γ δ T se puede obtener de una forma eficiente, y la célula obtenida de esta manera es útil para la profilaxis o el tratamiento de las enfermedades, tales como los tumores y similares.

Esta solicitud se basa en la Solicitud de Patente No. 2018-133727 presentada en Japón (fecha de presentación: 13 de julio de 2018), y en la Solicitud de Patente No. 2019-117891 presentada en Japón (fecha de presentación: 25 de junio de 2019), cuyo contenido se incorpora por completo en el presente documento.