

BANCO CELULAR MAESTRO DE CÉLULAS T

[CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION]

[0001]

La presente invención se refiere a un banco celular maestro de células T, un banco celular de trabajo de células T y un sistema y similares para proporcionar un producto de células T, incluido el banco.

[0002]

(Antecedentes de la invención)

En los últimos años, la terapia con células inmunes ha atraído la atención como método de tratamiento del cáncer. La terapia con células inmunes es un método terapéutico que incluye la proliferación y activación de células inmunes fuera del cuerpo del paciente y la administración de las células inmunes al paciente para permitir que las células inmunes ataquen las células cancerosas. La terapia de células inmunes es ventajosa porque casi no causa efectos secundarios en comparación con las tres terapias principales convencionales de tratamiento quirúrgico, radioterapia y quimioterapia. Existen varios tipos de métodos de tratamiento para la terapia de células inmunes. Entre ellos, los productos de células T alogénicos disponibles en el mercado son muy esperados.

[0003]

Como sistema para proporcionar los productos de células T alogénicas antes mencionados, se ha informado de un sistema en el que una célula iPS preparada mediante la introducción de un gen CAR en una célula iPS de antemano utilizando una técnica de banco de células iPS (por ejemplo, documento de patente 1 y similares) o una técnica para introducir un gen CAR en una célula iPS (por ejemplo, documento de patente 2 y similares) se cultiva en expansión, las células se almacenan para construir un banco celular maestro de células iPS que

tienen el gen CAR, y las células T obtenidas al diferenciar las células iPS derivadas del banco celular en células T se utilizan como un producto de células T alogénicas (por ejemplo, documento no patente 1).

[0004]

En el sistema mencionado con anterioridad, se requiere un proceso para introducir un gen exógeno como un gen CAR o similar en una célula madre pluripotente como una célula iPS y diferenciar la célula en una célula T. Por lo tanto, es necesario mantener, diferenciar y cultivar células (por ejemplo, células iPS, células T, células CAR-T) en cada etapa del proceso, cumpliendo al mismo tiempo las normas GMP (Buenas Prácticas de Fabricación) establecidas por las autoridades de cada país. Por ejemplo, dado que se usa un banco celular maestro de células iPS, la preparación de productos de células T requiere la diferenciación de células iPS en células T. Sin embargo, debido a la multipotencia de las células iPS, siempre se requiere un alto nivel de gestión de procesos y calidad para inducir células diferenciadas uniformes de cada lote, y los costos humanos, de tiempo y financieros son extremadamente altos. Dichos costos tienen una gran influencia en la provisión estable de productos de células T. En particular, cuando se proporcionan varios tipos de productos de células T, el costo y el tiempo de cada uno de ellos se acumula y la influencia de los mismos se vuelve más grave. Por lo tanto, se ha deseado un sistema para suministrar un producto a bajo costo mientras se satisfaga el estándar GMP y, además, un sistema capaz de proporcionar un producto de alta calidad a bajo costo incluso cuando se utilizan varios tipos de productos de células T.

[Lista de documentos]

[Documentos de patente]

[0005]

Documento de patente 1: US-A-2009-0299763

Documento de patente 2: WO 2017/088012

[Documento no patente]

[0006]

Documento no patente 1: Bob Valamehr (Vicepresidente de Fate Therapeutics) "Generation of off-the-shelf TCR-less CAR T cells from renewable pluripotent cells", April 14-18, 2018 (AACR Annual Meeting 2018 Press Program)

[SÍNTESIS DE LA INVENCION]

[Problemas a resolver por la invención]

[0007]

Por consiguiente, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un sistema para proporcionar un producto de células T alogénicas de alta calidad disponible en el mercado, que puede reducir los costos humanos, de tiempo y financieros y minimizar la diferencia entre lotes. La presente invención también tiene como objetivo proporcionar un banco celular maestro de células T, un banco celular de trabajo de células T, y la colección de estos que se pueden usar para la provisión del sistema mencionado con anterioridad.

[Medios para resolver los problemas]

[0008]

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos en un intento de resolver los problemas antes mencionados y asumieron que las técnicas convencionales descritas en el documento 1 no patente y similares se centran exclusivamente en el método de construcción de un banco celular maestro de células iPS porque las células iPS son superiores a las células T en la capacidad proliferativa. Por tanto, consideraron que una célula T o células T suficientemente proliferadas por

cultivo de expansión se pueden utilizar como banco celular maestro. Es decir, los presentes inventores concibieron la idea de que un producto de células T de alta calidad puede proporcionarse rápidamente a partir de un banco celular maestro de células T que contiene un gen exógeno como el gen CAR y similares, en lugar de un banco celular maestro de células iPS que tiene el gen exógeno. Hasta donde sabían los presentes inventores, la idea de construir un banco celular maestro de células T era una idea completamente nueva y completamente desconocida. Los presentes inventores han estudiado más en base a estos hallazgos y han completado la presente invención.

[0009]

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un sistema para proporcionar un producto de células T, que comprende un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T.

[2] El sistema de [1], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T derivada de una célula madre pluripotente inducida.

[3] El sistema de [1] o [2], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T con expresión suprimida de al menos un tipo de gen HLA.

[3a] El sistema de cualquiera de [1] a [3], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T en la que se ha introducido un gen exógeno.

[3b] El sistema de cualquiera de [1] a [3a], que además comprende una etapa de construir una colección de banco celular maestro de células T y/o una colección de banco celular de trabajo de células T que comprende dos o más tipos de bancos

celulares maestros de células T y/o bancos celulares de trabajo de células T mediante la recolección de los bancos celulares maestros de células T y/o los bancos celulares de trabajo de células T.

[3c] El sistema de uno cualquiera de [1] a [3b], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden dos o más tipos de los mismos.

[3d] El sistema de cualquiera de [1] a [3c], que comprende además una etapa de seleccionar un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T.

[4] El sistema de cualquiera de [1] a [3d], que además comprende una etapa de introducir un ácido nucleico que comprende el gen exógeno en una célula T preparada a partir del banco celular maestro de células T y/o banco celular de trabajo de células T.

[5] El sistema de [4], en el que el gen exógeno es un gen CAR o un gen TCR exógeno.

[6] El sistema de uno cualquiera de [1] a [5], en el que el producto de células T comprende dos o más tipos del mismo.

[6a] El sistema de cualquiera de [1] a [6], que comprende además una etapa de seleccionar el producto de células T.

[7] El sistema de cualquiera de [1] a [6a], que comprende además una etapa de cultivo de expansión de una célula T preparada a partir del banco celular maestro de células T y/o del banco celular de trabajo de células T.

[8] El sistema de [7], en el que la etapa de cultivo de expansión de la célula T comprende un proceso de estimulación de la célula con un agonista de CD30.

[8a] El sistema de [7], en el que la etapa de cultivo de expansión de la célula T comprende un proceso de cultivo de la célula en presencia de un agonista de CD30.

[9] El sistema de cualquiera de [7] a [8a], que comprende además una etapa de producción de un producto de células T

congeladas que comprende las células T cultivadas en expansión.

[10] El sistema de cualquiera de [6] a [9], que comprende además una etapa de construir una colección de productos de células T que comprende dos o más tipos de productos de células T mediante la recogida de productos de células T.

[10a] El sistema de cualquiera de [1] a [10], que comprende además una etapa de obtener información de un sujeto de prueba.

[10b] El sistema de [10a], que además comprende una etapa de seleccionar un banco celular maestro apropiado de células T y/o un banco celular de trabajo apropiado de células T en base a la información del sujeto de prueba.

[10c] El sistema de [10a], que comprende además una etapa de seleccionar un producto de células T apropiado en base a la información del sujeto de prueba.

[11] El sistema de cualquiera de [1] a [10c], que comprende además una etapa de identificación de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor expresado en un tumor del sujeto de prueba.

[12] El sistema de [11], que además comprende una etapa de seleccionar un producto de células T que exprese un CAR o un TCR exógeno que reconozca y se una al antígeno identificado de una colección de productos de células T que comprenda dos o más tipos de productos de células T.

[13] Un método para producir un producto de células T, que comprende un proceso de construcción de un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T.

[14] El método para producir un producto de células T de [13], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T derivada de una célula madre pluripotente inducida.

[15] El método para producir un producto de células T de [13] o [14], en el que el banco celular maestro de células T y/o

el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T con expresión suprimida de al menos un tipo de gen HLA.

[15a] El método para producir un producto de células T de cualquiera de [13] a [15], en el que el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T comprenden una célula T en la que se ha introducido un gen exógeno.

[16] El método para producir un producto de células T de cualquiera de [13] a [15a], que comprende además un proceso de introducción de un ácido nucleico que comprende el gen exógeno en una célula T preparada a partir del banco celular maestro de células T y/o banco celular de trabajo de células T.

[17] El método para producir un producto de células T de [16], en el que el gen exógeno es un gen CAR o un gen TCR exógeno.

[18] El método para producir un producto de células T de cualquiera de [13] a [17], que comprende además un proceso de cultivo de expansión de una célula T.

[19] El método para producir un producto de células T de [18], en el que el proceso de cultivo de expansión de las células T comprende un proceso de estimulación de la célula con un agonista de CD30.

[19a] El método para producir un producto de células T de [18], en el que el proceso de cultivo de expansión de la célula T comprende un proceso de cultivo de la célula en presencia de un agonista de CD30.

[20] Un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T.

[21] El banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T de [20], que comprende una célula T derivada de una célula madre pluripotente inducida.

[22] El banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T de [20] o [21], que comprende una

célula T con expresión suprimida de al menos un tipo de gen HLA.

[22a] El banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T de cualquiera de [20] a [22], que comprende una célula T en la que se ha introducido un gen exógeno.

[23] Una colección de banco celular maestro de células T y/o una colección de banco celular de trabajo de células T que comprende dos o más tipos de bancos celulares maestros de células T y/o bancos celulares de trabajo de células T de cualquiera de [20] a [22a].

[24] Un método para construir un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T, que comprende los siguientes procesos:

- (I) un proceso de diferenciación de una célula madre pluripotente inducida libre de un gen receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula T para la terapia CAR-T,
- (II) un proceso de almacenamiento de células T diferenciadas,
- y
- (III) un proceso de caracterización de la célula T diferenciada.

[25] Un método para construir un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T, que comprende los siguientes procesos:

- (i) un proceso de diferenciación de una célula madre pluripotente inducida libre de un gen receptor de células T exógeno (TCR) en una célula T para la terapia TCR-T,
- (ii) un proceso de almacenamiento de células T diferenciadas,
- y
- (iii) un proceso de caracterización de la célula T diferenciada.

[25a] El método de [24] o [25], en el que la célula madre pluripotente inducida tiene un gen exógeno.

[26] El método de [24] o [25a], en el que la célula madre pluripotente inducida tiene un gen del receptor de células T exógeno (TCR).

[27] El método de uno cualquiera de [24] a [26], en el que al menos un tipo de gen HLA se delecciona en la célula madre pluripotente inducida.

[27a] El método de uno cualquiera de [24] a [26], en el que la célula madre pluripotente inducida se suprime en la expresión de al menos un tipo de gen HLA.

[28] El método de cualquiera de [24] a [27a], en el que la célula T expresa CD8 $\alpha\beta$.

[29] Un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T construido mediante el método de [24] a [28].

[30] Un método para producir un producto de células T que exprese un CAR o un TCR exógeno, que comprende los siguientes procesos:

(A) un proceso de preparación de una célula T del banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T de [29],

(B) un proceso de introducción de un gen CAR o un gen TCR exógeno en la célula T preparada, y

(C) un proceso de expansión cultivando la célula T en la que se ha introducido el gen CAR o el gen TCR exógeno.

[30a] El método de [30], que además comprende (D) un proceso de congelación de las células T cultivadas en expansión.

[31] El método de [30] o [30a], en el que el CAR o TCR exógeno reconoce y se une a un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor.

[32] El método de cualquiera de [30] a [31], en el que el proceso (C) comprende un proceso de estimulación de la célula T con un agonista de CD30.

[32a] El método de cualquiera de [30] a [31], en el que el

proceso (C) comprende un proceso de cultivo de las células en presencia de un agonista de CD30.

[33] Un producto de células T producido por el método de cualquiera de [30] a [32a].

[34] Un método para construir una colección de productos de células T que comprende dos o más tipos de productos de células T, que comprende un proceso de recolección del producto de células T de [33].

[35] Una colección de productos de células T construida mediante el método de [34].

[36] Un método para proporcionar un producto de células T adecuado para un sujeto de prueba, que comprende los siguientes procesos:

(x) un proceso de identificación de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor expresado en el tumor de un sujeto de prueba, y

(y) un proceso de selección de un producto de células T que expresa un CAR o un TCR exógeno que reconoce y se une al antígeno identificado de la colección de productos de células T de [35].

[37] Un método para proporcionar un producto de células T adecuado para un sujeto de prueba, que comprende los siguientes procesos:

(p) un proceso de obtención de información de un sujeto de prueba, y

(q) un proceso de selección de un banco celular maestro apropiado de células T y/o un banco celular de trabajo apropiado de células T en base a la información obtenida del sujeto de prueba.

[Efecto de la invención]

[0010]

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema para proporcionar un producto de células T alogénicas

de alta calidad disponible en el mercado, que puede reducir los costos humanos, de tiempo y financieros y minimizar la diferencia entre lotes, y un método para proporcionarlo. Tal sistema y método de provisión son particularmente superiores cuando se proporcionan varios tipos de productos de células T. La presente invención también proporciona un banco celular maestro de células T, un banco celular de trabajo de células T, y también se proporciona la colección de estos que pueden usarse para la provisión del sistema o método antes mencionado. [0011]

Varias células utilizadas en la presente memoria descriptiva se indican a veces como sigue. También se describe el contorno de cada célula.

<Célula madre pluripotente inducida (iPSC)>

$\alpha\beta$ -iPSC: célula iPS en la que se han introducido el gen de la cadena TCR- α (gen TRA) y el gen de la cadena TCR- β (gen TRB)

V γ 9V δ 2-iPSC: célula iPS en la que se han introducido el gen de la cadena TCR- γ (gen TRG) y el gen de la cadena TCR- δ (gen TRD) que codifican V γ 9V δ 2TCR G115

<Célula progenitora hematopoyética (HPC)>

V γ 9V δ 2-iHPC: HPC en la que se han introducido el gen de la cadena TCR- γ (gen TRG) y el gen de la cadena TCR- δ (gen TRD) que codifican V γ 9V δ 2TCR G115

<Célula T>

i $\gamma\delta$ TC: célula T diferenciada de la célula iPS libre de introducción de TCR exógeno

i $\alpha\beta$ TC: célula T diferenciada de $\alpha\beta$ -iPSC

V γ 9V δ 2-iTC: célula T diferenciada de V γ 9V δ 2-iPSC

V γ 9V δ 2-iHTC: célula T diferenciada de V γ 9V δ 2-iHPC

<Célula T en la que se ha introducido el gen CAR>

CD19i $\alpha\beta$ CARTC: célula T producida al introducir un gen que codifica anti-CD19-CAR en i $\alpha\beta$ TC

BCMA $\alpha\beta$ CARTC: célula T producida al introducir un gen que codifica anti-BCMA-CAR en $\alpha\beta$ TC

CD19-CD30- $\alpha\beta$ CARTC: célula T producida mediante la introducción de un gen que codifica anti-CD19-CAR que contiene el dominio intracelular derivado de CD30 en $\alpha\beta$ TC

<Célula T en la que se han introducido el gen CAR y el gen IL-15R α /IL-15>

CD19/IL15 $\alpha\beta$ CARTC: célula T producida mediante la introducción de un gen que codifica anti-CD19-CAR y un gen que codifica la proteína quimérica IL-15R α /IL-15 en $\alpha\beta$ TC

CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC: Célula T producida al introducir el gen que codifica anti-CD19-CAR y el gen que codifica la proteína quimérica IL-15R α /IL-15 en V γ 9V δ 2-iTC

CD19/IL15i $\gamma\delta$ CARTC: célula T producida mediante la introducción de un gen que codifica anti-CD19-CAR y un gen que codifica la proteína quimérica IL-15R α /IL-15 en i $\gamma\delta$ TC

[BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

[0012]

La Fig. 1 muestra una forma de realización de un sistema de suministro de producto de células T que incluye un banco celular de células T.

La Fig. 2 muestra una forma de realización de un sistema para proporcionar una pluralidad de productos de células T a partir de una colección de células T del banco celular. En la Fig. 2, "blindado" significa que se ha introducido un gen exógeno relacionado con la secreción de citoquinas y/o quimioquinas.

La Fig. 3 muestra la expresión de CD3, $\gamma\delta$ TCR y $\alpha\beta$ TCR en la superficie de la membrana celular de i $\gamma\delta$ TC. Los picos rellenos muestran los resultados del grupo sin tinción del anticuerpo, y los picos en blanco muestran los resultados de la tinción utilizando cada anticuerpo específico de antígeno.

La Fig. 4 muestra la expresión de la cadena TCR-V δ 1 y la cadena TCR-V δ 2 en la superficie de la membrana celular de i γ δ TC. El eje horizontal y el eje vertical muestran respectivamente la expresión de la cadena TCR-V δ 1 (Vdelta1) y la cadena TCR-V δ 2 (Vdelta2).

La Fig. 5 muestra la expresión de la molécula de CD3 y γ δ TCR en la superficie de la membrana celular de V γ 9V δ 2-iTC. El eje horizontal y el eje vertical en la Figura de la izquierda muestran respectivamente la expresión de CD3 y pan- γ δ TCR. El eje horizontal y el eje vertical en la Figura de la derecha muestran respectivamente la expresión de la cadena TCR-V δ 2 y la cadena TCR-V γ 9.

La Fig. 6 muestra la expresión de la molécula de CD3 y γ δ TCR en la superficie de la membrana celular de V γ 9V δ 2-iHTC. El eje horizontal y el eje vertical en la Figura de la izquierda muestran respectivamente la expresión de CD3 y pan- γ δ TCR. El eje horizontal y el eje vertical en la Figura de la derecha muestran respectivamente la expresión de la cadena CD3 y TCR-V γ 9.

La Fig. 7 muestra la proliferación celular de células i γ δ TC. El eje vertical muestra el número de células y el eje horizontal muestra los días después del inicio del cultivo de proliferación. Las flechas muestran el día en que se inició la estimulación con anticuerpo agonista anti-CD3 en fase sólida/RetroNectin (marca comercial registrada) y anticuerpo agonista anti-CD30.

La Figura 8 muestra la proliferación celular de V γ 9V δ 2-iTC. El eje vertical muestra el número de células y el eje horizontal muestra los días después del inicio del cultivo de proliferación. Las flechas muestran el día en que se inició la estimulación con anticuerpo agonista anti-CD3 en fase sólida/RetroNectin (marca comercial registrada).

La Fig. 9 muestra una curva de proliferación de CD19-

$\alpha\beta$ CARTC estimulada con anticuerpo agonista anti-CD3 en fase sólida/RetroNectin (marca comercial registrada). El eje vertical muestra el número de células y el eje horizontal muestra los días después del inicio del cultivo de proliferación. Las flechas muestran el día en que se inició la estimulación con anticuerpo agonista anti-CD3 en fase sólida/RetroNectin (marca comercial registrada).

La Fig. 10 muestra la actividad citotóxica de las células CAR T preparadas mediante la introducción de un gen que codifica anti-CD19-CAR o un gen que codifica anti-BCMA-CAR en $\alpha\beta$ TC (CD19 $\alpha\beta$ CARTC (A) y BCMA $\alpha\beta$ CARTC (B), respectivamente) e $\alpha\beta$ TC contra células Raji positivas para CD19 (A) o células H929 positivas para BCMA (B).

La Fig. 11 muestra la actividad citotóxica de CD19-CD30- $\alpha\beta$ CARTC contra células cancerosas Raji positivas para CD19. El eje vertical muestra el porcentaje de células muertas después de 2 horas, y el eje horizontal muestra la proporción de mezcla de la célula efectora (CD19 $\alpha\beta$ CARTC) y la célula diana (célula cancerosa Raji positiva para CD19).

La Fig. 12 muestra la actividad citotóxica específica de antígeno de CD19/IL15 $\gamma\delta$ CARTC. Los círculos negros y blancos indican respectivamente la actividad citotóxica contra la célula cancerosa Raji CD19 positiva y la célula cancerosa CCRF-CEM CD19 negativa. El eje vertical muestra el porcentaje de células restantes después de 2 horas, y el eje horizontal muestra la proporción de mezcla de la célula efectora (CD19/IL15 $\gamma\delta$ CARTC) y la célula diana (célula de cáncer Raji CD19 positiva o CCRF-CEM CD19 negativa célula cancerosa).

La Fig. 13 muestra la proliferación celular de CD19/IL15 γ 9V δ 2CARTC. El eje vertical muestra el número de células y el eje horizontal muestra los días después del inicio del cultivo de proliferación. Las flechas muestran el día en que se inició la estimulación con anticuerpo agonista anti-

CD3 en fase sólida/RetroNectin (marca registrada).

La Fig. 14 muestra el efecto de CD19/IL15iγδCARTC sobre la prolongación de los días de supervivencia del ratón de xenoinjerto de tumor Nalm6 que expresa CD19 humano.

La Fig. 15 muestra el efecto de CD19/IL15iVγ9δ2CARTC sobre la prolongación de los días de supervivencia del ratón de xenoinjerto de tumor Nalm6 que expresa CD19 humano.

La Fig. 16 muestra una forma de realización de un sistema de suministro de producto de células T que incluye un banco celular de células T.

La Fig. 17 muestra una forma de realización de una constitución de hardware contenida en una parte de selección de productos de células T.

[0013]

(DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION)

1. Banco celular maestro de células T, banco celular de trabajo de células T y sistema de suministro de productos de células T

La presente invención proporciona un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T. En lo que sigue, la expresión "banco celular de células T" se usa a veces para abarcar un banco celular maestro de células T y un banco celular de trabajo de células T. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un sistema para proporcionar un producto de células T, que comprende un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T (de aquí en adelante, algunas veces se denominará "el sistema de provisión de la presente invención").

[0014]

En la presente memoria descriptiva, el "banco celular" significa los mismos materiales de partida que se han caracterizado, que cumplen con los estándares de calidad y similares establecidos por las autoridades farmacéuticas de

todo el mundo de acuerdo con la directriz de ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (ICH guideline Q5D). En general, un banco celular se construye congelando las células llenas en un recipiente adecuado. Sin embargo, se distingue en los puntos mencionados con anterioridad de un stock congelado obtenido simplemente congelando células. Cuando es necesario, el banco celular se prueba para evaluar la calidad además de la caracterización. El método para construir el banco celular y los elementos de prueba para la caracterización y la evaluación de la calidad del banco celular construido varían según las propiedades biológicas (por ejemplo, auxotrofia), el historial de cultivo y la viabilidad de la prueba de las células que serán objeto del banco celular, y son determinados apropiadamente por los expertos en la técnica, o en base al contenido de las discusiones entre los expertos en la técnica y las autoridades reguladoras, y similares. La información relacionada con el método de construcción del mismo y los resultados de la caracterización y evaluación de la calidad se presentan a las autoridades farmacéuticas al solicitar la aprobación de fabricación y comercialización en cada país. El "banco celular maestro" significa una reserva de semillas que será la fuente de todas las semillas de células de producción, que se cultivan en determinadas condiciones de cultivo a través de un número mínimo de pases y se distribuyen en varias ampollas. Cuando la célula es célula T, el banco se denomina "banco celular maestro de células T". El "banco celular de trabajo" significa células obtenidas agrupando uno o más bancos celulares maestros, cultivadas adicionalmente en condiciones en que se confirmó que son suficientemente estables y distribuidas en múltiples ampollas. Cuando la célula es de células T, el banco se denomina "banco celular de trabajo de células T" (en la presente memoria descriptiva,

el banco celular maestro de células T y el banco celular de trabajo de células T a veces se denominan "banco celular de células T"). Según ICH Q5D, las pruebas de caracterización se llevan a cabo generalmente en el banco celular maestro, y una parte de las pruebas de caracterización se realiza generalmente en cada banco celular de trabajo.

[0015]

Las pruebas de caracterización evalúan principalmente la ausencia de contaminación con un factor infeccioso exógeno. En particular, dado que la contaminación con virus exógenos puede tener consecuencias graves en el uso clínico, se evalúa de acuerdo con ICH Q5A (R1). Otras pruebas incluyen una prueba de identidad para detectar contaminación cruzada con otra línea celular. Además, también se pueden realizar análisis de cariotipo y prueba de tumorigenicidad.

Los elementos de prueba de evaluación de la calidad incluyen la prueba de confirmación usando el fenotipo celular apropiado como célula T, prueba de pureza, prueba de impurezas derivada del proceso de producción y pruebas cuantitativas como número de células, tasa de supervivencia celular y similares.

El banco celular de células T puede ser construido por una persona que produce y/o proporciona un producto de células T, o el banco celular construido por otros puede introducirse y usarse para producir un producto de células T.

Según ICH Q5D, el concepto de banco celular de dos pasos de construir un banco celular de trabajo a partir de un banco celular maestro se acepta generalmente como el método más práctico para suministrar sustratos de células para la producción continua de productos farmacéuticos.

[0016]

Un banco celular de trabajo se deriva de un banco celular maestro en uno o más contenedores. El banco celular de trabajo se puede regenerar desde el banco celular maestro cuando sea

necesario. En ICH Q5D se establece que es necesaria la confirmación apropiada de la elegibilidad de un banco celular de trabajo recién construido mediante la forma de realización de la caracterización, y similares.

[0017]

En una forma de realización de la presente invención, se puede construir un banco celular maestro de células T dispensando células T en múltiples recipientes de almacenamiento (viales asépticos y similares), y congelándolos y almacenándolos. Las células T en un recipiente de este banco celular maestro de células T se pueden descongelar y someter adecuadamente a una prueba de análisis de propiedades. Además, se puede construir un banco celular de trabajo de células T distribuyendo células T del mismo recipiente o de otro recipiente descongelado en múltiples recipientes adecuados, y congelarlos y almacenarlos. En una forma de realización de la presente invención, se puede producir un producto de células T descongelando células T en uno o más contenedores de un banco celular de células T, introduciendo ácido nucleico que contiene un gen exógeno en las células T y cultivándolas por expansión.

[0018]

En la presente invención, "almacenamiento" significa que una pluralidad de recipientes, en los que se dispensan (asignan) células como las células T, se almacenan juntas de manera adecuada, y se controlan las condiciones de almacenamiento como la temperatura, etc., el equilibrio y similares. Los contenedores pueden almacenarse en un lugar o en múltiples lugares.

[0019]

En la presente invención, la "célula T" significa una célula CD3 positiva. Ejemplos de células T utilizables en la presente invención incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL) que son células CD8 positivas, células T auxiliares que son células

CD4 positivas, células T reguladoras, células T efectoras, células $\gamma\delta$ T que es la cadena del receptor (TCR) γ de células T y la célula positiva de cadena TCR δ , y similares. Además, una célula CD4/CD8 doble positiva también está incluida en una célula T. TCR en la célula T puede ser TCR debido a la expresión de un gen TCR endógeno o un TCR debido a la expresión de un gen TCR exógeno. El TCR exógeno puede ser una variante del TCR que se describe a continuación. Las células T en el banco celular de células T proporcionadas por la presente invención son preferentemente células T citotóxicas, más preferentemente células T citotóxicas positivas para CD8 $\alpha\beta$ que expresan CD8 $\alpha\beta$. En la presente memoria descriptiva, el "producto de células T" significa células T llenas en un recipiente de almacenamiento (vial aséptico, bolsa de transfusión de sangre, etc.), o tal recipiente de almacenamiento debidamente empaquetado o etiquetado. Aunque el producto de células T puede o no congelarse, preferentemente se congela durante el almacenamiento a largo plazo desde el punto de vista de la estabilidad de las células T. En la presente memoria descriptiva, un producto de células T congelado a veces se denomina particularmente "producto de células T congelado". En la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, el "producto de células T" incluye tanto un producto de células T no congelado como un producto de células T congelado. Como se usa en el presente documento, el "producto de células T" incluye tanto un producto para ensayos clínicos como un producto para uso comercial que se administra a sujetos de prueba de mamíferos, incluidos humanos.

[0020]

Como se describió con anterioridad, los métodos convencionales para proporcionar un producto de células T mediante el uso de un banco celular maestro o un banco celular de trabajo de

células iPS requieren costos humanos, de tiempo y financieros extremadamente altos. En particular, cuando se proporcionan dos o más tipos de productos de células T, el costo y el tiempo de cada uno de ellos se acumula y la influencia de los mismos se vuelve más seria. Por el contrario, dado que el sistema de suministro de la presente invención usa un banco celular maestro o un banco celular de trabajo de células T, los costos humanos, de tiempo y financieros pueden reducirse extremadamente en comparación con las técnicas convencionales, particularmente cuando se proporcionan dos o más tipos de T productos celulares. Por lo tanto, aunque el tipo de producto de células T que proporcionará el sistema de suministro de la presente invención puede ser uno, se obtienen efectos particularmente superiores cuando se proporcionan dos o más tipos de productos de células T.

[0021]

En la presente memoria descriptiva, ser "positivo" significa que una proteína o un gen se expresa en una cantidad detectable mediante un método conocido en la técnica. La proteína puede detectarse mediante un ensayo inmunológico utilizando un anticuerpo, como ELISA, inmunotinción y citometría de flujo. En el caso de una proteína que se expresa intracelularmente y no aparece en la superficie celular (por ejemplo, factor de transcripción o subunidad del mismo, y similares), se expresa una proteína reportera junto con la proteína, y la proteína diana puede detectarse mediante la detección de la proteína reportera. El gen puede detectarse mediante, por ejemplo, un método de amplificación de ácido nucleico y/o un método de detección de ácido nucleico como RT-PCR, biochip (por ejemplo, microarray), RNAseq y similares.

[0022]

En la presente memoria descriptiva, ser "negativo" significa que el nivel de expresión de la proteína o gen es menor que

el límite inferior de detección por todos o cualquiera de los métodos conocidos mencionados con anterioridad. El límite inferior de detección de la expresión de proteínas o genes puede variar según cada método.

[0023]

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 denominada transcripción o expresión de ARNm) como la síntesis de proteína basada en la información del ARNm (también denominada traducción o expresión de proteínas). A menos que se especifique lo contrario, la "expresión genética" o "expresión" simple significa expresión de proteína.

[0024]

En la presente memoria descriptiva, el "cultivo" se refiere al mantenimiento, proliferación (crecimiento) y/o diferenciación de células en un entorno in vitro. "Cultivar" significa mantener, proliferar (hacer crecer) y/o diferenciar células extratejido o ex vivo, por ejemplo, en una placa, placa o matraz de cultivo celular.

[0025]

Las células T que constituyen un banco de células T se pueden producir induciendo la diferenciación de células madre con potencia de diferenciación en células T. Los ejemplos de células madre incluyen célula madre pluripotente, célula madre multipotente, y similares. En la presente memoria descriptiva, la "célula madre pluripotente" se refiere a una célula madre que tiene la capacidad de diferenciarse en tejidos y células que tienen varias formas y funciones diferentes de un cuerpo vivo, y diferenciarse en células de cualquier linaje de tres capas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo). Si bien la célula madre pluripotente no está particularmente limitada, por ejemplo, célula madre pluripotente inducida (a veces

denominada "célula iPS" en la presente memoria descriptiva), célula madre embrionaria (célula ES), célula madre embrionaria derivada del embrión clon obtenido por trasplante nuclear (célula madre embrionaria de transferencia nuclear: célula ntES), célula madre germinal pluripotente, célula germinal embrionaria (célula EG) y similares. En la presente memoria descriptiva, la "célula madre multipotente" se refiere a una célula madre que tiene la capacidad de diferenciarse en una pluralidad de un número limitado de linajes de células. Los ejemplos de "célula madre multipotente" incluyen célula madre hematopoyética, célula madre pulpar, célula madre derivada de la mucosa de la cavidad bucal, célula madre del folículo piloso, célula madre somática derivada de cultivo de fibroblasto o célula madre mieloide, y similares. Las células madre pluripotentes preferidas son la célula ES y la célula iPS, y se prefiere particularmente la célula iPS. Cuando la célula madre pluripotente mencionada con anterioridad es una célula ES o cualquier célula derivada de un embrión humano, la célula puede ser una célula producida destruyendo el embrión o una célula preparada sin destruir el embrión. Preferentemente, es una célula preparada sin destruir el embrión. La célula madre mencionada con anterioridad se deriva preferentemente de un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejillo de indias, perro, mono, orangután, chimpancé, humano), más preferentemente humano. Por tanto, la célula madre que se va a utilizar en la presente invención es lo más preferentemente una célula iPS humana.

[0026]

La "célula madre pluripotente inducida (célula iPS)" se refiere a una célula obtenida al introducir un factor específico (factor de reprogramación nuclear) en una célula somática de mamífero o una célula madre indiferenciada y reprogramarla. Actualmente, existen varios tipos de "células

madre pluripotentes inducidas (célula iPS)" y también se pueden utilizar células iPS establecidas por Yamanaka, et al. introduciendo 4 factores de Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc en fibroblasto de ratón (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676), la célula iPS derivada de una célula humana establecida mediante la introducción de similares 4 factores en fibroblasto humano (Takahashi K, Yamanaka S., et al., Cell, (2007) 131: 861-872), célula Nanog-iPS establecida seleccionando con la expresión de Nanog como índice después de la introducción de lo anterior 4 factores mencionados (Okita, K., Ichisaka, T., y Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317), célula iPS producida por un método libre de c-Myc (Nakagawa M, Yamanaka S., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106), y la célula iPS se estableció mediante la introducción de 6 factores mediante un método libre de virus (Okita K et al., Nat. Methods 2011 May; 8(5): 409-12, Okita K et al., Stem Cells. 31(3): 458-66). Además, también se puede utilizar la célula madre pluripotente inducida establecida por Thomson et al. introduciendo 4 factores de OCT3/4, SOX2, NANOG y LIN28 (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.), células madre pluripotentes inducidas producidas por Daley et al. (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146), células madre pluripotentes inducidas (JP-A-2008-307007) y similares.

Además, cualquiera de las células madre pluripotentes inducidas conocidas en la técnica que se describen en artículos publicados (por ejemplo, Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., Et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., Et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797), o patentes (por ejemplo, JP-A-2008-307007, JP-A-2008-283972, US 2008-2336610, US 2009-047263, WO 2007/069666, WO 2008/118220, WO 2008/124133, WO 2008/151058, WO 2009/006930,

WO 2009/006997, WO 2009/007852). Como línea de células madre pluripotentes inducidas, pueden usarse varias líneas de células iPS establecidas por NIH, RIKEN, Universidad de Kyoto, y similares. Ejemplos de la línea celular iPS humana incluyen la cepa HiPS-RIKEN-1A, la cepa HiPS-RIKEN-2A, la cepa HiPS-RIKEN-12A, la cepa Nips-B2 de RIKEN, la cepa 253G1, la cepa 201B7, la cepa 409B2, la cepa 454E2, la cepa 606A1, la cepa 610B1, la cepa 648A1, reserva de células iPS para medicina regenerativa (por ejemplo, la cepa Ff-I01s04, la cepa QHJI, etc.) de la Universidad de Kyoto, y similares.

[0027]

La célula ES es una célula madre que es pluripotente y proliferativa por autorreplicación y se establece a partir de la masa celular interna de embriones de mamíferos tempranos (por ejemplo, blastocisto) como humanos, ratones y similares. La célula ES se descubrió en ratones en 1981 (MJ Evans y MH Kaufman (1981), *Nature* 292: 154-156), y la línea de células ES se estableció posteriormente en primates como humanos, monos y similares (JA Thomson et al., (1998), *Science* 282: 1145-1147; JA Thomson et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7844-7848; JA Thomson et al., (1996), *Biol. Reprod.*, 55: 254-259; JA Thomson y VS Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38: 133-165). La célula ES puede establecerse eliminando la masa celular interna del blastocisto del óvulo fertilizado del animal objetivo y cultivando la masa celular interna en un alimentador de fibroblastos. Los métodos para establecer y mantener las células madre embrionarias humanas y de mono se describen, por ejemplo, en los documentos USP 5.843.780; Thomson JA et al., (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92: 7844-7848; Thomson JA et al., (1998), *Science*. 282: 1145-1147; Suemori H. et al., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345: 926-932; Ueno M. et al., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 9554-9559; Suemori H. et al., (2001),

Dev. Dyn., 222: 273-279; Kawasaki H. et al., (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1580-1585; Klimanskaya I. et al., (2006), Nature. 444: 481-485 y similares. Alternativamente, la célula ES también se puede establecer usando solo blastómeros individuales en la etapa de escisión antes de la etapa de blastocisto (Chung Y. et al., (2008), Cell Stem Cell 2: 113-117), o también se puede establecer usando embriones que tienen cesó el desarrollo (Zhang X. et al., (2006), Stem Cells 24: 2669-2676.). Como la "célula ES", varias líneas de células ES de ratón establecidas por el laboratorio de orientación inGenious, RIKEN (Instituto de Investigación Física y Química) y similares se pueden usar como células ES de ratón, y varias líneas de células ES humanas establecidas por la Universidad de Wisconsin, NIH, RIKEN, National Center for Child Health and Development and Cellartis y similares pueden usarse como célula ES humana. Por ejemplo, como línea celular ES humana, cepas CHB-1 - CHB-12, cepa RUES1, cepa RUES2, cepas HUES1 - HUES28 y similares proporcionadas por ESI Bio, cepa H1, cepa H9 y similares proporcionadas por WiCell Research, se pueden utilizar la cepa KhES-1, la cepa KhES-2, la cepa KhES-3, la cepa KhES-4, la cepa KhES-5, la cepa SSES1, la cepa SSES2, la cepa SSES3 y similares proporcionadas por RIKEN.

[0028]

La célula ES nt es una célula ES derivada de un embrión clonado producido por la tecnología de transferencia nuclear y tiene casi las mismas propiedades que las células ME derivadas de huevos fertilizados (Wakayama T. et al., (2001), Science, 292: 740-743; S. Wakayama et al., (2005), Biol. Reprod., 72: 932-936; Byrne J. et al., (2007), Nature, 450: 497-502). Es decir, una célula ES establecida a partir de la masa celular interna de blastocisto derivada de un embrión clonado obtenido al sustituir el núcleo de un óvulo no fertilizado con el núcleo

de la célula somática es la célula ES nt (transferencia nuclear ES). Para la producción de la célula ES nt, se utiliza una combinación de técnica de transferencia nuclear (Cibelli JB et al., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16: 642-646) y la técnica de producción de células ES (arriba) (Kiyoka Wakayama et al. (2008), *Experimental Medicine*, Vol. 26, No. 5 (Edición especial), págs. 47-52). En la transferencia nuclear, la reprogramación se realiza inyectando el núcleo de la célula somática en un huevo de mamífero enucleado no fertilizado y cultivándolo durante varias horas.

[0029]

La célula madre germinal de pluripotencia es una célula madre pluripotente derivada de una célula madre germinal (célula GS). Al igual que las células madre embrionarias, esta célula puede inducir la diferenciación en células de varios linajes y tiene propiedades como la capacidad de producir un ratón quimérico cuando se trasplanta a un blastocisto de ratón y similares (Kanatsu-Shinohara M. et al., (2003) *Biol. Reprod.*, 69: 612-616; Shinohara K. et al., (2004), *Cell*, 119: 1001-1012). La célula puede autorreplicarse en un medio de cultivo que contiene un factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), y puede producir una célula madre germinal mediante pases repetidos en las mismas condiciones de cultivo que para las células ES (Masanori Takebayashi et al. (2008), *Experimental Medicine*, Vol. 26, No. 5 (Edición especial), págs. 41-46, YODOSHA CO., LTD. (Tokio, Japón)).

[0030]

La célula EG es una célula con pluripotencia similar a la de las células ME y se establece a partir de una célula germinal primordial embrionaria. Puede establecerse cultivando células germinales primordiales en presencia de una sustancia como LIF, bFGF, factor de células madre y similares (Matsui Y. et al., (1992), *Cell*, 70: 841-847; JL Resnick et al., (1992),

Nature, 359: 550-551).

[0031]

1-1. Inducción de diferenciación en linfocitos T

Para la inducción de la diferenciación de células madre en células T, puede usarse un método conocido sin ninguna limitación particular siempre que se pueda realizar la diferenciación en células T. Cuando se usa una célula madre pluripotente como célula madre, la inducción de diferenciación mencionada con anterioridad en células T puede incluir, por ejemplo, (1) un proceso para diferenciar células madre pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas, y (2) un proceso para diferenciar las células progenitoras hematopoyéticas en células T.

[0032]

(1) Proceso para diferenciar células madre pluripotentes inducidas en células progenitoras hematopoyéticas

En la presente memoria descriptiva, la "célula progenitora hematopoyética (HPC)" significa célula CD34 positiva, preferentemente, célula CD34/CD43 doble positiva (DP). 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 particularmente.

[0033]

El método de diferenciación de células madre pluripotentes en células progenitoras hematopoyéticas no está particularmente limitado siempre que pueda provocar la diferenciación en células progenitoras hematopoyéticas. Los ejemplos del mismo incluyen un método que incluye el cultivo de células madre pluripotentes en un medio para la inducción de células progenitoras hematopoyéticas, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 2013/075222, WO 2016/076415 y Liu S. et al., Cytotherapy, 17 (2015); 344-358, y similares.

[0034]

En la presente invención, un medio utilizado para la inducción en células progenitoras hematopoyéticas no está particularmente limitado. Se puede preparar un medio usado para cultivar células animales en un medio basal. Los ejemplos del medio basal incluyen, pero sin limitación, 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 MCDB104, 107, 131, 151, 153), medio de Fischer, medio 199, medio de cultivo para células ES de primates (medio de cultivo para primates Célula ES/iPS, Reprocell), medio para células ES de ratón (medio de cultivo TX-WES, Thromb-X), medio sin suero (mTeSR, Stemcell Technologies), ReproFF, StemSpan (marca registrada) SFEM, StemSpan (marca registrada) H3000, StemlineII, medio ESF-B, medio ESF-C, medio CSTI-7, medio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific), medio StemPro-34, StemFit (marca registrada) (por ejemplo, StemFit AK03N, StemFit AK02N), y similares. Además, estos medios se pueden mezclar y usar según sea necesario y, por ejemplo, se pueden mencionar el medio DMEM/F12, y similares.

[0035]

Cuando sea necesario, el medio basal puede contener un aditivo de medio y similares. Los ejemplos del aditivo medio incluyen suero, vitamina C (por ejemplo, ácido ascórbico), albúmina, insulina, transferrina, compuesto de selenio (por ejemplo, Selenito de sodio), ácido graso, oligoelementos, 2-mercaptoetanol, tioglicerol (por ejemplo, α -monotioglicerol (MTG)), lípidos, aminoácidos, L-glutamina, L-alanil-L-glutamina (por ejemplo, Glutamax (marca registrada)), aminoácidos no esenciales, vitaminas, factores de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomicina), antioxidantes, ácido pirúvico,

tampones, sales inorgánicas, citoquinas y similares.

[0036]

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

[0037]

Cuando se usa vitamina C, la vitamina C se agrega (suministra) preferentemente cada cuatro días, cada tres días, cada dos días o todos los días. La vitamina C se agrega más preferentemente todos los días. En una forma de realización, la vitamina C se agrega preferentemente al medio en una cantidad correspondiente a 5 ng/ml a 500 ng/ml (por ejemplo, una cantidad correspondiente a 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml o 500 ng/ml). En otra forma de realización, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad correspondiente a 5 µg/ml - 500 µg/ml (por ejemplo, una cantidad correspondiente a 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml).

[0038]

El medio que se utilizará en el proceso (1) puede complementarse adicionalmente con al menos un tipo de citoquina seleccionada 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 Flt3) y bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos). Es más preferentemente un cultivo complementado con BMP4, VEGF y bFGF, y más preferentemente un cultivo complementado con BMP4, VEGF, SCF y bFGF.

[0039]

Cuando se usa citoquina, su concentración en el medio puede ser, por ejemplo, 5 ng/ml - 500 ng/ml para BMP4, 5 ng/ml - 500 ng/ml para VEGF, 5 ng/ml - 100 ng/ml para SCF, 1 ng/ml - 100 ng/ml para TPO, 1 ng/ml - 100 ng/ml para FLT-3L y 5 ng/ml - 500 ng/ml para bFGF.

[0040]

El medio mencionado con anterioridad puede complementarse con un inhibidor de TGF β . El inhibidor de TGF β es un inhibidor de molécula pequeña que interfiere con la transducción de señales de la familia TGF β e incluye, por ejemplo, SB431542, SB202190 (ambos RK Lindemann et al., 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 TGF β es SB431542, su concentración en el medio es preferentemente de 0,5 μ M a 100 μ M.

[0041]

Las células madre pluripotentes inducidas pueden cultivarse mediante cultivo adherente o cultivo en suspensión. En casos de cultivo adherente, el cultivo se puede llevar a cabo en un recipiente de cultivo recubierto con un componente de matriz extracelular y/o se puede cocultivar con células alimentadoras. Aunque la célula alimentadora no está particularmente limitada, por ejemplo, se pueden mencionar fibroblasto (fibroblasto de embrión de ratón (MEF), fibroblasto de ratón (STO) y

similares). Las células alimentadoras se inactivan preferentemente mediante un método conocido per se, por ejemplo, radiación (rayos gamma y similares), irradiación, tratamiento con un agente anticanceroso (mitomicina C y similares) y similares. Como componente de la matriz extracelular, proteínas fibrosas como Matrigel (Niwa A, et al., PLoS One.6 (7): e22261, 2011), gelatina, colágeno, elastina y similares, glucosaminoglicano y proteoglicano como ácido hialurónico, sulfato de condroitina y similares, se pueden mencionar proteínas de adhesión celular tales como fibronectina, vitronectina, laminina y similares.

[0042]

El cultivo en suspensión significa cultivar células en un estado de no adhesión a un recipiente de cultivo y no está particularmente limitado. Para mejorar la adhesividad a las células, un recipiente de cultivo libre de un tratamiento artificial (por ejemplo, tratamiento de recubrimiento con matriz extracelular y similares), o un recipiente de cultivo sometido a un tratamiento para suprimir artificialmente la adhesión (por ejemplo, tratamiento de recubrimiento con ácido polihidroxietil metacrílico (poli-HEMA) o poliol tensioactivo no iónico (Pluronic F-127, etc.)). En el cultivo en suspensión, el embriode (EB) se forma y se cultiva preferentemente.

[0043]

En la presente invención, la célula progenitora hematopoyética también se puede preparar a partir de una estructura en forma de saco (que también se denomina saco ES o saco iPS) obtenida cultivando células madre pluripotentes. Como se usa en este documento, la "estructura en forma de saco" es una estructura sacular tridimensional (con espacios en el interior) derivada de células madre pluripotentes, que está formada por una población de células endoteliales y similares y contiene células progenitoras hematopoyéticas en su interior.

[0044]

Las condiciones de temperatura no están particularmente limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, preferentemente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el período de cultivo controlando el número de células progenitoras hematopoyéticas y/o similares. El número de días de cultivo no está limitado siempre que se puedan obtener células progenitoras hematopoyéticas. Los ejemplos del período de cultivo incluyen al 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 preferentemente de 14 días. Mientras que un período de cultivo más largo generalmente no plantea un problema en la producción de células progenitoras hematopoyéticas, preferentemente no es más de 35 días, más preferentemente no más de 21 días. El cultivo se puede llevar a cabo en condiciones de bajo oxígeno, y la condición de bajo contenido de oxígeno en la presente invención significa, por ejemplo, una concentración de oxígeno del 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% o más bajo que estos.

[0045]

(2) Etapa de diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en células T

Un método para diferenciar células progenitoras hematopoyéticas en células T no está particularmente limitado siempre que pueda diferenciar células progenitoras hematopoyéticas en células T. Los ejemplos del mismo incluyen un método para cultivar células progenitoras hematopoyéticas en las mismas condiciones de cultivo que las de un método para inducir células T a partir de células progenitoras hematopoyéticas, como se describe en los documentos WO

2016/076415, WO 2017/221975 y similares.

[0046]

En la presente invención, un medio para inducir la diferenciación en células T no está particularmente limitado, y un medio utilizado para cultivar células animales puede prepararse en un medio basal. Cuando sea necesario, el medio basal puede contener un aditivo de medio y similares. Los ejemplos del medio basal y el aditivo del medio incluyen aquellos similares al medio basal y el aditivo del medio utilizados en el proceso mencionado con anterioridad (1).

[0047]

Cuando se usa vitamina C en el proceso (2), la vitamina C puede ser la misma que la descrita en el proceso (1) y se puede añadir de forma similar. En una forma de realización, la concentración de vitamina C en el medio o un medio de cultivo es preferentemente de 5 µg/ml - 200 µg/ml. En otra forma de realización, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad correspondiente a 5 µg/ml - 500 µg/ml (por ejemplo, cantidad correspondiente a 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml).

[0048]

En el proceso (2), son preferibles el inhibidor de p38 y/o SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales). En la presente invención, el "inhibidor de p38" significa una sustancia que inhibe las funciones de la proteína p38 (p38 MAP quinasa). Los ejemplos del mismo incluyen, pero sin limitación, inhibidor químico de p38, mutante dominante negativo de p38 o ácido nucleico que lo codifica y similares.

[0049]

Los ejemplos del inhibidor químico de p38 que se utilizará en la presente invención incluyen, pero sin limitación, 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, SC10-469, SCIO-323, VX-702 y FR167653. Estos compuestos están disponibles comercialmente y, por ejemplo, SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 y PD169316 están disponibles de Calbiochem, y SC10-469 y SCIO-323 están disponibles de Scios y similares. El inhibidor químico de p38 es preferentemente SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol), o un derivado del mismo.

[0050]

Los ejemplos del mutante dominante negativo de p38 que se utilizará en la presente invención incluyen p38T180A obtenido por mutación puntual de la treonina en la posición 180 localizada en la región de unión de ADN de p38 a alanina, p38Y182F obtenido por mutación puntual de la posición 182 de tirosina de p38 en humanos y ratones a fenilalanina y similares. El inhibidor de p38 está contenido en un medio a, por ejemplo, aproximadamente 1 μ M - aproximadamente 50 μ M. Cuando se usa SB203580 como inhibidor de P38, puede estar contenido en un medio a 1 μ M - 50 μ M, 5 μ M - 30 μ M, 10 μ M - 20 μ M.

[0051]

El SDF-1 que se utilizará en la presente invención puede ser no solo SDF-1 α o una forma madura del mismo, sino también una isoforma como SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , SDF-1 ϕ y similares o una forma madura de los mismos, o una mezcla de estos en cualquier proporción o similar. Preferentemente, se usa SDF-1 α . A veces, SDF-1 se denomina CXCL-12 o PBSF.

[0052]

En la presente invención, uno o varios aminoácidos en la

secuencia de aminoácidos de SDF-1 pueden eliminarse, sustituirse, insertarse y/o agregarse siempre que tenga la actividad de la quimioquina (SDF-1 con tal eliminación, la sustitución, inserción y/o adición de aminoácidos también debe denominarse "mutante SDF-1"). De manera similar, la cadena de azúcar se puede eliminar, sustituir, insertar y/o agregar en SDF-1 o SDF-1 mutante. Los ejemplos del mutante del SDF-1 antes mencionado incluyen aquellos que mantienen al menos 4 residuos de cisteína (Cys30, Cys32, Cys55 y Cys71 en SDF-1 α humano) y que tienen no menos del 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de una sustancia, aunque la mutación de aminoácidos no se limita a ella. El SDF-1 puede obtenerse de un mamífero, por ejemplo, mamífero humano o no humano como mono, oveja, bovino, caballo, cerdo, perro, gato, conejo, rata, ratón y similares. Por ejemplo, la proteína registrada como número de acceso de GenBank: NP_954637 puede usarse como SDF-1 α humano, y la proteína registrada como número de acceso de GenBank: NP_000600 puede usarse como SDF-1 β .

[0053]

El SDF-1 puede estar disponible comercialmente, purificado de la naturaleza o producido mediante síntesis de péptidos o técnicas de ingeniería genética. El SDF-1 está contenido en un medio dentro del intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. Además, la alternativa de SDF-1 que tiene una actividad similar a SDF-1 también se puede usar en lugar de SDF-1. Los ejemplos de dicha alternativa de SDF-1 incluyen el agonista de CXCR4, y se puede añadir al medio un compuesto de bajo peso molecular que tiene una actividad agonista de CXCR4 y similares en lugar de SDF-1.

[0054]

El medio de cultivo usado en el proceso (2) puede complementarse adicionalmente con al menos un tipo, preferentemente todas, de citoquinas seleccionadas del grupo

que consiste en SCF, TPO (trombopoyetina), FLT-3L e IL-7. La concentración de estos es, por ejemplo, 10 ng/ml a 100 ng/ml para SCF, 10 ng/ml a 200 ng/ml para TPO, 1 ng/ml a 100 ng/ml para IL-7 y 1 ng/ml a 100 ng/ml para FLT-3L.

[0055]

En el proceso (2), las células progenitoras hematopoyéticas pueden cultivarse mediante cultivo adherente o cultivo en suspensión. En casos de cultivo adherente, se puede usar un recipiente de cultivo revestido y/o las células progenitoras hematopoyéticas se pueden cocultivar con células alimentadoras y/o similares. Los ejemplos de células alimentadoras para el cocultivo incluyen una línea de células estromales de médula ósea, células OP9 (disponibles en Riken BioResource Center). La célula OP9 es preferentemente una célula OP9-DL4 o una célula OP9-DL1, que expresa constantemente 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 los que se utilizan células OP9 como células alimentadoras, DLL1, o una DLL4 o DLL1 preparada por separado, o una proteína de fusión de DLL4 o DLL1, y Fc o similar, puede añadirse al medio para realizar la cocultivo. Cuando se usan células alimentadoras, las células alimentadoras se reemplazan preferentemente de manera apropiada durante el cultivo. La sustitución de las células alimentadoras se puede llevar a cabo transfiriendo las células sujeto que se están cultivando a las células alimentadoras que se sembraron preliminarmente. El reemplazo puede realizarse cada cinco días, cada cuatro días, cada tres días o cada dos días. Cuando se obtienen células progenitoras hematopoyéticas mediante cultivo en suspensión de embrioide, es preferible realizar un cultivo de adhesión después de la disociación en células individuales. Aunque las células pueden cocultivarse con células alimentadoras, el cultivo se lleva a cabo preferentemente sin

usar 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, et al. PLoS One, 6 (7): e22261, 2011)), colágeno, gelatina, laminina, heparán sulfúrico proteoglicano ácido, RetroNectin (marca comercial registrada), proteína de fusión de DLL4 o DLL1, o DLL4 o DLL1, y la región Fc del anticuerpo (en lo sucesivo, a veces denominado Fc) y similares (por ejemplo, quimera DLL4/Fc), entactina y/o una combinación de estos, y es preferible una combinación de RetroNectin y proteína de fusión de DLL4 y Fc, etc.

[0056]

En el proceso (2), las condiciones de temperatura de cultivo no están limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, preferentemente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el período de cultivo mediante el control del número de células T y similares. El número de días de cultivo no está limitado siempre que se puedan obtener células T. Los ejemplos del período de cultivo típicamente incluyen al 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 y no menos de 20 días. El período de cultivo es preferentemente de 21 días. Además, es preferible no más de 90 días y es más preferible no más de 42 días.

[0057]

La población de células obtenida mediante la etapa anterior incluye células T. El proceso (2) puede contener además el siguiente proceso (3).

[0058]

(3) Proceso para condensar células T

Un método para condensar células T no está particularmente

limitado siempre que las células T puedan condensarse. Por ejemplo, se puede mencionar un método para cultivar células T en las mismas condiciones de cultivo que en una etapa de inducción de células T positivas para CD8 a partir de células T doble positivas para CD4CD8, como se describe en los documentos WO 2016/076415, WO 2017/221975 y similares.

[0059]

En la presente memoria descriptiva, "concentrar" se refiere a aumentar la proporción de un componente constituyente particular en una composición como una composición celular y similares, y "concentrado" cuando se usa para describir una composición celular como una población celular significa que la cantidad de un componente constituyente particular en la población celular ha aumentado con respecto a la del componente en la población celular antes de concentrarse. Por ejemplo, una composición como una población celular y similares se puede concentrar para el tipo de célula diana. Por tanto, la proporción del tipo de célula diana aumenta en comparación con la proporción de la célula diana presente en la población celular antes de ser concentrada. También puede concentrarse una población de células para el tipo de célula diana mediante un método de selección de células o un método de clasificación conocido en la técnica. La población celular también puede concentrarse mediante un método de cultivo particular, clasificación o un proceso de selección, descrito en la presente memoria descriptiva. En una forma de realización particular de la presente invención, la población celular se concentra en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de la población de células diana mediante un método de concentración de la población de células diana.

[0060]

En la presente memoria descriptiva, la "población de células"

significa dos o más células del mismo tipo o tipos diferentes. La "población celular" también significa una masa de células del mismo tipo o de diferentes tipos.

[0061]

En la presente invención, el medio usado para concentrar células T no está particularmente limitado, y un medio usado para cultivar células animales puede prepararse en un medio basal. Cuando sea necesario, el medio basal puede contener un aditivo de medio y similares. Ejemplos de medio basal y aditivo medio incluyen aquellos similares al medio basal usado en el proceso mencionado con anterioridad (1).

[0062]

Cuando se usa vitamina C en el proceso (3), la vitamina C puede ser similar a las descritas en el proceso (1) y se puede añadir de forma similar. En una forma de realización, la concentración de vitamina C en el medio o medio de cultivo es preferentemente de 5 µg/ml - 200 µg/ml. En otra forma de realización, la vitamina C se agrega en una cantidad correspondiente a 5 µg/ml - 500 µg/ml en el medio de cultivo (por ejemplo, cantidad correspondiente a 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml).

[0063]

Cuando se usa hormona en el proceso (3), los ejemplos de la hormona incluyen corticosteroide. El corticosteroide es un glucocorticoide o un derivado del mismo, y se citan como ejemplos acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de fludrocortisona, predonisolona, triamcinolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona y dipropionato de beclometasona. Se prefiere la dexametasona. Cuando el corticosteroide es dexametasona, su concentración en el medio es 1 nM - 100 nM.

[0064]

En el proceso (3), el medio puede contener un agonista del complejo CD3/TCR. El agonista del complejo CD3/TCR no está particularmente limitado siempre que sea una molécula capaz de transducir una señal de un complejo CD3/TCR a una célula T uniéndose específicamente al complejo CD3/TCR. Los ejemplos del agonista del complejo CD3/TCR incluyen agonista CD3 y/o agonista TCR. Como agonista de CD3, se puede mencionar un anticuerpo agonista anti-CD3 (que también se denominará simplemente "anticuerpo anti-CD3") o un fragmento unido al mismo, y como agonista de TCR, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo agonista anti-TCR (que también se denominará simplemente "anticuerpo anti-TCR") o un fragmento unido al mismo, un complejo MHC/péptido antígeno o un multímero del mismo, y un complejo MHC/superantígeno o un multímero del mismo pueden ser mencionado. Cuando se usa un anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo anti-CD3 incluye tanto un anticuerpo policlonal como un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, preferentemente IgG. Como anticuerpo anti-CD3, se pueden mencionar un anticuerpo producido a partir del clon OKT3 (OKT3), un anticuerpo (UCHT1) producido a partir del clon UCHT1 y similares, preferentemente UCHT1. La concentración de anticuerpo anti-CD3 en el medio es, por ejemplo, 10 ng/ml - 1000 ng/ml, preferentemente 50 ng/ml - 800 ng/ml, más preferentemente 250 ng/ml - 600 ng/ml. El agonista del complejo CD3/TCR mencionado con anterioridad puede estar disponible comercialmente, purificado de la naturaleza o producido mediante síntesis de péptidos o técnicas de ingeniería genética o métodos de síntesis química. Por ejemplo, OKT3 y UCHT1 se pueden comprar en ThermoFisher, GeneTex y similares.

[0065]

Cuando se usa citoquina en el proceso (3), IL-2 e IL-7 y similares se pueden mencionar como citoquina. Cuando la citoquina es IL-2, la concentración de la misma en el medio es de 10 U/ml - 1000 U/ml, y cuando es IL-7, la concentración de la misma en el medio es de 1 ng/ml - 1000 ng/ml.

[0066]

En el proceso (3), las condiciones de temperatura de cultivo no están particularmente limitadas. La temperatura es, por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C, preferentemente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 39 °C. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el período de cultivo controlando el número de células T y similares. El número de días no está limitado siempre que se puedan concentrar las células. El período de cultivo es, por ejemplo, no menos de 1 día, no menos de 2 días, no menos de 3 días, no menos de 4 días, no menos de 5 días, preferentemente no menos de 6 días. Preferentemente no es más de 28 días, más preferentemente no más de 14 días.

[0067]

En las células T que constituyen un banco celular de células T, la expresión del gen endógeno puede regularse de manera apropiada. Específicamente, en las células T que constituyen un banco celular de células T, la expresión de al menos un tipo (por ejemplo, un tipo, dos tipos, tres tipos, seis tipos, nueve tipos) del gen HLA (antígeno leucocitario humano) se suprime preferentemente o el gen HLA se elimina preferentemente para reducir el rechazo en el trasplante alogénico. Por lo tanto, en una forma de realización de la presente invención, el sistema de provisión de la presente invención contiene células T en las que se suprime la expresión de al menos un tipo de gen HLA. En la presente memoria descriptiva, la supresión de la expresión del gen HLA también incluye la delección del gen.

[0068]

Como gen de HLA mencionado con anterioridad, se pueden mencionar específicamente uno o más tipos de genes de HLA seleccionados del grupo que consiste en HLA de clase I (es decir, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G) y el gen HLA de clase II (es decir, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP). Alternativamente, se puede suprimir la expresión génica importante para la expresión mencionada con anterioridad del gen HLA y la presentación del mismo en la superficie celular. Los ejemplos del gen incluyen el gen B2M que codifica B2M, que es una proteína importante para presentar HLA de clase I en la superficie celular, y el gen CIITA que codifica CIITA, que es una proteína importante para la expresión del gen HLA de clase II. Por otro lado, dado que una célula con supresión de la expresión del gen HLA es fácilmente dirigida por las células asesinas naturales (NK) debido a la supresión de la expresión del gen HLA, también es preferible evitar ser atacado por las células NK sobreexpresando el gen CD47 o suprimiendo la expresión de solo dos genes, el gen HLA-A y el gen HLA-B y el mantenimiento de la expresión del gen HLA-C, el gen HLA-E, el gen HLA-F y el gen HLA-G, que son importantes para evitar ataques de células NK (en este caso, la expresión del gen HLA de clase II puede estar suprimida o no, pero es preferible suprimir la expresión génica en vista de la inmunocompatibilidad. En una forma de realización preferida, por lo tanto, la combinación de genes HLA cuya expresión debe ser suprimido incluye (i) combinación de gen HLA-A y gen HLA-B, (ii) combinación de gen HLA-A, gen HLA-B, gen HLA-DR, gen HLA-DQ y gen HLA-DP, y (iii) combinación de gen HLA-A, gen HLA-B, gen HLA-C, gen HLA-E, gen HLA-F, gen HLA-G, gen HLA-DR, gen HLA-DQ y gen HLA-DP. El HLA, que es un complejo de histocompatibilidad principal (MHC) humano, se ha descrito como ejemplo en lo anterior. Incluso cuando se usa un MHC no

humano, es preferible suprimir la expresión de al menos un tipo de gen MCH de la misma manera.

[0069]

Como método para suprimir la expresión del gen HLA, puede usarse apropiadamente un método conocido. Por ejemplo, la expresión del gen HLA se puede eliminar mediante la introducción de ARNm de HLA, ARNm de B2M y/o ARNip, ARNhc, miARN, ácido oligonucleico antisentido, ribozima que se dirige al ARNm de CIITA en las células en la etapa de diferenciación de células pluripotentes en células T (por ejemplo, células madre pluripotentes, células progenitoras hematopoyéticas (CD34+/CD43+), células ProT (CD4-/CD8-), células T CD3+/CD4+/CD8+, células T CD3+/CD4-/CD8+ u otras células (por ejemplo, células CD3-/CD4+/CD8+, etc.), etc.), o introduciendo un ácido nucleico que codifica la molécula en las células mediante el método mencionado a continuación. Alternativamente, el gen HLA, el gen B2M y/o el gen CIITA en las células pueden eliminarse mediante edición del genoma (por ejemplo, sistema CRISPR, TALEN, ZFN y similares).

[0070]

En las células T que constituyen un banco celular de células T, es preferible suprimir la expresión de la cadena de TCR mediante ARNip, o suprimir la expresión de TCR en las células T mediante la introducción de TCR exógeno que se sabe que es inofensivo para el sujeto de prueba al que se administran las células T. Cuando se aplica el método antes mencionado por ARNip a este método, para evitar el efecto del ARNip sobre el TCR exógeno, es preferible que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que codifica el TCR sea una secuencia (secuencia del tipo de conversión de codón) diferente de la secuencia de nucleótidos correspondiente al ARN sobre el que actúa el ARNip que suprime la expresión de la cadena TCR endógena. Estos métodos se describen, por ejemplo, en el

documento WO 2008/153029. La secuencia de bases antes mencionada se puede producir introduciendo una mutación silenciosa en un ácido nucleico que codifica TCR obtenido de forma natural o sintetizando químicamente un ácido nucleico diseñado artificialmente. Para evitar el emparejamiento incorrecto con la cadena de TCR endógena, una parte o la totalidad de las regiones constantes del ácido nucleico que codifica el TCR introducido también pueden sustituirse por una región constante derivada de un animal distinto del sujeto de prueba.

[0071]

En las células T que constituyen un banco celular de células T, además, puede introducirse un ácido nucleico que contiene un gen exógeno, o puede expresarse el producto génico exógeno.

[0072]

El gen exógeno mencionado con anterioridad no está particularmente limitado, y se puede usar un gen exógeno que codifica una proteína, citoquina, quimioquina y similares que pueden contribuir a la regulación de la función de las células T. Los ejemplos del gen exógeno mencionado con anterioridad incluyen un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) (en lo sucesivo también denominado "gen CAR"), un gen que codifica un receptor de células T exógeno (TCR) (de aquí en adelante también se denominará como "gen TCR") y similares. Los CAR y TCR mencionados con anterioridad expresados a partir de genes introducidos en células pueden reconocer y unirse al antígeno y/o al complejo antígeno-HLA. En la presente memoria descriptiva, el ácido nucleico que codifica TCR es un ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica una hebra que forma TCR y una secuencia de bases que codifica la otra hebra.

[0073]

La expresión "capaz de unirse", como se usa en el presente documento, significa "tener la capacidad de unirse" y se refiere a la capacidad de formar un complejo no covalente con una o más de otras moléculas. En la técnica se conocen varios métodos y ensayos para determinar la capacidad de unión. La unión suele ser una unión con alta afinidad, en la que la afinidad de unión medida en valores de KD es preferentemente menor de 1 μ M, más preferentemente menor de 100 nM, incluso más preferentemente menor de 10 nM, incluso más preferentemente menor de 1 nM, incluso más preferentemente menos de 100 pM, incluso más preferentemente menos de 10 pM, incluso más preferentemente 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 técnica e indica la afinidad de unión intermolecular. Un valor de KD más pequeño muestra una mayor afinidad de unión.

[0074]

El TCR utilizado en la presente invención abarca no solo uno en el que la cadena α y la cadena β de TCR constituyen un heterodímero (es decir, $\alpha\beta$ TCR), o la cadena γ y la cadena δ de TCR constituyen un heterodímero (es decir, $\gamma\delta$ TCR), pero también uno en el que constituyen un homodímero. Además, también se puede usar uno que carece de una parte o de la región constante completa y uno con recombinación de una secuencia de aminoácidos.

[0075]

La región constante de la cadena TCR mencionada con anterioridad puede ser la región constante de la cadena TCR del clon de linfocitos T citotóxicos (CTL), del cual se deriva, en donde la región se ha sometido a una modificación predeterminada. Los ejemplos de la modificación incluyen, pero sin limitación, reemplazar residuos de aminoácidos particulares en la región constante del TCR del clon CTL con

residuos de cisteína, mejorando así la eficiencia de la expresión del dímero por enlace disulfuro entre cadenas de TCR y similares.

[0076]

El TCR mencionado con anterioridad puede ser una variante. A continuación, a menos que se especifique lo contrario, TCR incluye variantes del mismo. Los ejemplos de la variante incluyen la variante del receptor de células T desarrollada por el presente inventor y que consiste en una combinación de dos polipéptidos que contienen la región constante de una cadena de TCR seleccionada del grupo que consiste en cadena α , cadena β , cadena γ y cadena δ y similares. La variante de TCR se caracteriza porque no incluye una región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena TCR γ y cadena β , o una región determinante de complementariedad (CDR) (preferentemente una parte o toda la región variable que contiene CDR) del mismo tipo de cadena, y que no incluye una región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena del receptor de células T de la que deriva la región constante, o una región determinante de complementariedad (CDR) (preferentemente una parte o toda la región variable que contiene CDR) del mismo tipo de cadena. En consecuencia, la variante mencionada con anterioridad no incluye un tipo natural o un tipo artificial (por ejemplo, especies animales de las que la región constante y la región variable se derivan son diferentes) de variantes $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR o TCR en las que los aminoácidos se agregan adicionalmente al TCR de estos. Por ejemplo, cuando un polipéptido correspondiente a al menos una de las cadenas de la variante de la presente invención contiene la región constante de la cadena α del receptor de células T, el polipéptido no contiene la región determinante de complementariedad de la cadena α del receptor de células T, preferentemente una parte o toda la región variable que

contiene la región determinante de complementariedad. Sin embargo, puede contener una cadena TCR distinta a la cadena α y la cadena β , por ejemplo, CDR y la región variable de la cadena γ y la cadena δ . De manera similar, cuando un polipéptido correspondiente a al menos una de las cadenas de la variante antes mencionada contiene la región constante de la cadena β del receptor de células T, el polipéptido no contiene la región determinante de complementariedad de la cadena β del receptor de células T, preferentemente una parte o toda la región variable que contiene la región determinante de complementariedad. Sin embargo, puede contener una cadena TCR distinta a la cadena α y la cadena β , por ejemplo, CDR y la región variable de la cadena γ y la cadena δ . Lo mismo se aplica a la cadena γ y la cadena δ .

[0077]

Se puede añadir un péptido señal de transferencia de membrana (en lo sucesivo denominado "péptido señal") al TCR mencionado con anterioridad. Como péptido señal, CD8, inmunoglobulina-H (IGH), CD4, péptido señal de transferencia de membrana derivado de un gen que codifica varios péptidos que tienen dominio transmembrana y/o una secuencia de aminoácidos obtenida por delección, sustitución, inserción y/o adición de una o se pueden usar varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido señal, o un péptido señal compuesto por una secuencia de aminoácidos que tiene identidad con la secuencia de aminoácidos del péptido señal. Cuando se añade un péptido señal, la posición de unión y el número de péptidos señal no están particularmente limitados.

[0078]

En la presente invención, el "receptor de antígeno quimérico (CAR)" significa una proteína de fusión que contiene un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un

dominio de transducción de señales intracelulares. El dominio de unión al antígeno de CAR incluye un anticuerpo de cadena corta (scFv) en el que la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH) de la región variable del anticuerpo están unidas en tándem mediante un espaciador como un enlazador (por ejemplo, enlazador compuesto por G y S (enlazador GS)). Las células que expresan CAR reconocen el antígeno en la región scFV y luego transducen la señal de reconocimiento del mismo en células T a través del dominio de transducción de señales intracelulares. La introducción de CAR en las células permite conferir especificidad al antígeno de interés. Además, dado que el CAR puede reconocer directamente moléculas de antígeno sin depender del HLA de clase I o de clase II, también se puede inducir una alta respuesta inmune contra células con expresión génica de HLA de clase I o II disminuida. Como antígeno dirigido por el CAR mencionado con anterioridad, se pueden mencionar los mismos antígenos que los antígenos mencionados con anterioridad como blanco del TCR mencionado con anterioridad.

[0079]

Los ejemplos del dominio transmembrana de CAR incluyen, pero sin limitación, dominios transmembrana derivados de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en cadena α , cadena β o cadena ζ de TCR, CD28, cadena CD3 ζ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, 4-1BB (CD137) y CD154 y similares. Puede usarse el dominio transmembrana de la molécula a partir del cual se deriva el primer dominio de transducción de señales intracelulares unido al dominio de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando la molécula de la que se deriva el primer dominio de transducción de señales intracelulares unido al dominio de unión al antígeno es CD28, el dominio transmembrana también puede derivarse de CD28. De modo alternativo, también se puede usar

un dominio transmembrana diseñado artificialmente.

[0080]

Los ejemplos del dominio de transducción de señales intracelulares de CAR incluyen, pero sin limitación, dominios intracelulares derivados de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consta de cadena CD3 ζ (cadena TCR ζ), cadena FcR γ , cadena FcR β , Cadena CD3 γ , cadena CD3 δ , cadena CD3 ζ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. De estos, es preferible un dominio de transducción de señal intracelular derivado de la cadena CD3 ζ . El dominio de transducción de señales intracelulares puede contener además un dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Los ejemplos de la molécula coestimuladora incluyen dominios intracelulares de uno o más tipos de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, función de linfocitos asociada antígeno-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y CD83. La fuerza y duración de la actividad CAR se pueden controlar seleccionando el tipo y número de molécula coestimuladora que se unirá (por ejemplo, Mol Ther. 2009; 17: 1453-1464).

[0081]

Puede incorporarse un espaciador entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana de CAR o entre el dominio de transducción intracelular y el dominio transmembrana de CAR. Como espaciador, puede usarse un péptido que generalmente consta de no más de 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, lo más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero sin limitación, péptidos que contienen una región bisagra derivada de IgG1, y la región CH2CH3 de inmunoglobulina y una parte de CD3 y similares.

[0082]

Los ejemplos de CAR específico incluyen, pero sin limitación,

un CAR de primera generación en el que scFv y la cadena CD3ζ se unen mediante un espaciador, un CAR de segunda generación en el que se incorporan un dominio transmembrana derivado de CD28 y un dominio intracelular entre el scFv y la cadena CD3ζ del CAR de primera generación para mejorar la capacidad de activar las células T, y un CAR de tercera generación en el que se incorpora el dominio intracelular de una molécula coestimuladora (4-1BB u OX40) diferente de CD28 entre el dominio intracelular de la cadena CD28 y CD3ζ de la segunda generación.

[0083]

Los ejemplos más específicos de CAR usados en la presente invención incluyen un receptor de antígeno quimérico que contiene scFv que reconoce a CD19 como un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana de CD8 como un dominio transmembrana, un dominio intracelular derivado de CD28 como un dominio de transducción de señales intracelulares, un dominio intracelular derivado de CD30, un dominio intracelular derivado de 4-1BB y un dominio intracelular derivado de la cadena CD3ζ. El orden de los dominios intracelulares mencionados con anterioridad contenidos en el dominio de transducción de señales intracelulares no está particularmente limitado y, por ejemplo, el orden del dominio intracelular derivado de CD28, el dominio intracelular derivado de CD30 o el dominio intracelular derivado de 4-1BB, y se adopta el dominio intracelular derivado de la cadena CD3ζ. Más específicamente, el receptor de antígeno quimérico en la presente invención se compone, por ejemplo, de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 o 5, o una secuencia de aminoácidos obtenida por delección, sustitución, inserción y/o adición de una o dos o más (preferentemente, aproximadamente 1 - 100, de preferencia, aproximadamente 1 - 50, más preferentemente, aproximadamente 1 - 10, de particular

preferencia, 1 - varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4 o 5.

[0084]

Los ejemplos del dominio intracelular derivado de CD30 incluyen una secuencia de aminoácidos obtenida por delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o dos o más (preferentemente, aproximadamente 1 - 100, de preferencia, aproximadamente 1 - 50, de mayor preferencia, aproximadamente 1 - 10, de particular preferencia, 1 - varios (2, 3, 4 o 5)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7. Cuando la secuencia de aminoácidos se elimina, sustituye, inserta y/o agrega como descrito con anterioridad, la ubicación de la delección, sustitución, inserción y/o adición no está particularmente limitada siempre que se mantenga la función del dominio intracelular de CD30.

[0085]

Los ejemplos del antígeno dirigido por los TCR y CAR mencionados con anterioridad incluyen, pero sin limitación, antígenos tumorales. El antígeno tumoral puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Los ejemplos específicos de tal antígeno tumoral incluyen uno o más tipos de antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígenos diferenciados tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y similares, antígenos multilínaje específicos de tumor tales como WT1, Glypican-3, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15 y similares, antígenos fetales tales como CEA y similares, genes de tumor sobreexpresado o genes supresores de tumores mutados como p53, Ras, HER-2/neu y similares, antígenos tumorales únicos causados por translocación cromosómica como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR y similares, y antígenos de virus tales como el antígeno del virus de Epstein Barr EBVA,

los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV) y similares. Como otros antígenos tumorales, pueden ser mencionados 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 unión TA-90/Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

[0086]

Puede confirmarse mediante un método conocido que el TCR o CAR mencionado con anterioridad (en lo sucesivo, a veces abreviado como "TCR, etc.") reconoce específicamente el antígeno y puede unirse al mismo. Un método adecuado incluye, por ejemplo, ensayo de dextrámero, ensayo ELISPOT y similares. Al realizar el ensayo ELISPOT, se puede confirmar que las células T que expresan TCR en la superficie celular reconocen el antígeno diana por el TCR, etc. y la señal del mismo se ha transmitido a las células.

[0087]

Previamente, 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 (de aquí en adelante algunas veces se abrevia como "IL-15/IL-15R α ") junto con el CAR antes mencionado, en comparación con las células que expresan CAR solo. Por tanto, desde el aspecto de la actividad citotóxica, las células T que constituyen un banco celular de células T expresan preferentemente IL-15/IL-15R α , y más preferentemente expresan el CAR mencionado con anterioridad. Para obtener células T que expresan IL-15/IL-15R α , el gen IL-15/IL-15R α se introduce en las células en la

etapa de diferenciación de células pluripotentes en células T (por ejemplo, células madre pluripotentes, células progenitoras hematopoyéticas (CD34+/CD43+), células ProT (CD4-/CD8-), células T CD3+/CD4+/CD8+, células T CD3+/CD4-/CD8+ u otras células (por ejemplo, células CD3-/CD4+/CD8+, etc.) etc.). Es preferible introducir IL-15/IL-15R α en la célula en forma de un ácido nucleico que lo codifica. La introducción se puede realizar de la misma manera que en la etapa de introducción de ácido nucleico mencionado con anterioridad.

[0088]

En el sistema de transducción de señales de IL-15, IL-15R α expresado en células presentadoras de antígeno generalmente se une a IL-15 e IL-15 se presenta al receptor de IL-15 que consiste en una cadena γ común (γ c) con IL-15R β en células CD8 positivas y CD4 negativas (presentación trans), por lo que se mantiene la actividad citotóxica de las células CD4 positivas CD8 negativas. Por tanto, cuando la célula T que expresa IL-15/IL-15R α es CD4 positiva para CD8 negativa, la célula puede transmitir la señal de IL-15 a su propia célula a través del receptor de IL-15. Alternativamente, la célula T que expresa IL-15/IL-15R α puede transmitir la señal de IL-15 a otras células CD4 positivas para CD8 negativas a través del receptor de IL-15. Como se describió con anterioridad, dado que IL-15/IL-15R α puede mantener la actividad citotóxica de las células CD4 negativas CD8 positivas, se espera que muestre un efecto citotóxico continuo en las células diana por CAR.

[0089]

IL-15/IL-15R α puede ser una proteína de tipo transmembrana o una proteína secretora. Se sabe que, en IL-15R α , el dominio de unión a IL-15 de 1-65 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína madura es la región responsable de la unión a IL-15 (Wei X. et al., J. Immunol., 167: 277-282, 2001). Por

tanto, la proteína de tipo transmembrana puede ser una proteína que retiene el dominio de unión de IL-15 y retiene el dominio transmembrana de IL-15R α . Por otro lado, la proteína secretora puede ser una proteína que mantiene el dominio de unión de IL-15 y carece del dominio transmembrana de IL-15R α (por ejemplo, proteína que consta de 1-65 residuos de aminoácidos, 1-85 residuos de aminoácidos, o 1-182 residuos de aminoácidos de IL-15R α , péptido que contiene una secuencia de aminoácidos no menor al 85% (por ejemplo, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%) idéntica a la secuencia de aminoácidos, y similares). [0090]

Puede incorporarse un espaciador entre IL-15 e IL-15R α de IL-15/IL-15R α . Como espaciador, puede usarse un péptido que generalmente consiste en no más de 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, lo más preferentemente de 20 a 50 aminoácidos. Los ejemplos específicos del mismo incluyen, pero sin limitación, el enlazador GS mencionado con anterioridad y similares. [0091]

IL-15/IL-15R α no está particularmente limitada siempre que sea una proteína en la que IL-15 e IL-15R α están fusionadas, y ejemplos específicos de las mismas incluyen un péptido que consiste en SEQ ID NO: 7. Mientras que IL-15/IL-15R no está particularmente limitada siempre que pueda unirse al receptor de IL-15 y transmitir la señal de IL-15 a la célula, por ejemplo, se puede mencionar un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología o identidad de no menos de aproximadamente 90%, preferentemente no menos de aproximadamente 95%, más preferentemente no menos de aproximadamente 97%, de particular preferencia, no menos de aproximadamente 98%, lo más preferentemente no menos de aproximadamente 99%, con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7. Como se usa en este documento, la "homología"

o "identidad" significa la proporción (%) del mismo aminoácido y resto de aminoácido similar (mismos restos de aminoácido en el caso de identidad) a todos los restos de aminoácido superpuestos en la alineación óptima donde dos secuencias de aminoácidos se alinean usando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico relevante (preferentemente, el algoritmo es tal que se puede introducir un espacio en una o ambas secuencias para la alineación óptima). El "aminoácido similar" significa aminoácidos que tienen propiedades fisicoquímicas similares y, por ejemplo, se pueden mencionar aminoácidos clasificados en el mismo grupo, tales como aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), aminoácidos alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), aminoácidos polares (Gln, Asn), aminoácidos básicos (Lys, Arg, His), aminoácidos ácidos (Glu, Asp), aminoácidos que tienen un grupo hidroxilo (Ser, Thr), aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña (Gly, Ala, Ser, Thr, Met) y similares. Se predice que la sustitución con aminoácidos similares no cambia el fenotipo de la proteína (es decir, sustitución conservadora de aminoácidos). Los ejemplos específicos de la sustitución conservadora de aminoácidos son bien conocidos en el campo técnico y se describen en varios documentos (por ejemplo, Bowie et al., Science, 247: 1306-1310 (1990)). La homología o identidad de la secuencia de aminoácidos en la presente memoria descriptiva se puede calcular utilizando el algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) y en las siguientes condiciones (expectativa = 10; aceptar espacio; matriz = BLOSUM62; filtrado = APAGADO).

[0092]

Se puede introducir un gen exógeno mediante un método conocido. Cuando el ácido nucleico introducido está en forma de ADN, por ejemplo, se pueden utilizar el método de coprecipitación de

fosfato cálcico, el método de PEG, el método de electroporación, el método de microinyección, el método de lipofección y similares. Por ejemplo, se pueden usar los métodos descritos en Cell Engineering, volumen adicional 8, New Cell Engineering experiment protocol, 263-267 (1995) (publicado por Shujunsha), Virology, vol. 52, 456 (1973), Folia Pharmacol. Jpn., Vol. 119 (No. 6), 345-351 (2002) y similares. Cuando se utiliza un vector de virus, el ácido nucleico se introduce, junto con un vector de empaquetamiento según sea necesario, en una célula de empaquetamiento adecuada (por ejemplo, célula Plat-E) y una línea celular de complementación (por ejemplo, célula 293), un vector de virus producido en se recupera el sobrenadante del cultivo y se infectan las células con el vector mediante un método apropiado adecuado para cada vector de virus, mediante el cual el vector se introduce en las células. Como vector de virus, se pueden mencionar vector de retrovirus (incluyendo vector de lentivirus y vector de pseudotipo), vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector de virus de herpes, vector de Sendaivirus, vector episomal y similares. También se puede utilizar un sistema de expresión de transposones (sistema PiggyBac). Como vector plasmídico, se pueden mencionar el plásmido de expresión de células animales (por ejemplo, pa1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo) y similares. Específicamente, cuando se usa un vector retroviral como vector, se describe un medio específico en WO 2007/69666, Cell, 126, 663-676 (2006) y Cell, 131, 861-872 (2007) y similares. Particularmente, cuando se usa un vector retroviral, es posible una transfección altamente eficiente en varias células usando un fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (fabricado por Takara Bio Inc.). Cuando el ácido nucleico introducido está en forma de ADN y se usa un vector viral, el tipo de vector viral puede seleccionarse apropiadamente

dependiendo del tipo de célula a introducir. Cuando la célula diana es una célula T, se usa preferentemente un vector retroviral, y se usa más preferentemente un vector de retrovirus gamma. Cuando la célula diana es una célula iPS, se usa preferentemente un vector lentivirus.

[0093]

El ácido nucleico de introducción también puede introducirse directamente en las células en forma de ARN y usarse para expresar el gen introducido en las células. Como método para introducir ARN, se puede utilizar un método conocido y, por ejemplo, se puede utilizar preferentemente un método de lipofección, un método de electroporación o similares. Cuando el factor de reprogramación está en forma de proteína, puede introducirse en una célula mediante un método como lipofección, fusión con péptido que penetra en la membrana celular (por ejemplo, TAT y poliarginina derivados del VIH), microinyección y similares, y otros.

[0094]

El TCR, etc. mencionado con anterioridad, se introduce en las células en forma de un ácido nucleico que codifica TCR, etc. Además, también se introduce una proteína de fusión que contiene IL-15 e IL-15R α en una célula en forma de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. El ácido nucleico y un ácido nucleico para suprimir la expresión del gen HLA mencionado con anterioridad pueden ser ADN o ARN, o quimera ADN/ARN, y preferentemente ADN. Además, el ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. En el caso de cadenas dobles, puede usarse ADN de doble cadena, ARN de doble cadena o híbrido de ADN:ARN. Cuando el ácido nucleico es ARN, T debe leerse como U con respecto a la secuencia de ARN. Además, el ácido nucleico puede contener nucleótidos naturales, nucleótidos modificados, análogos de nucleótidos o una mezcla de estos siempre que pueda expresar polipéptidos in vitro o

en una célula.

[0095]

El ácido nucleico mencionado con anterioridad se puede construir mediante un método conocido per se. Por ejemplo, basándose en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico de TCR o CAR conocidos, una hebra de ADN se sintetiza químicamente, o se sintetizan cadenas cortas de oligo ADN parcialmente superpuestas que se conectan mediante el método de PCR o el método de ensamblaje de Gibson, mediante el cual un se puede construir una longitud o una parte del TCR o CAR. El ácido nucleico para suprimir la expresión del gen HLA y el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que contiene IL-15 e IL-15R α también se pueden construir de la misma manera.

[0096]

El ácido nucleico mencionado con anterioridad se puede incorporar a un vector de expresión. El vector puede ser un vector que se integra o no se integra en el genoma de la célula diana. En una forma de realización, el vector que no se integra en el genoma es capaz de replicarse fuera del genoma de la célula diana. El vector puede estar presente en múltiples copias fuera del genoma de la célula diana. En otra forma de realización de la invención, el vector se integra en el genoma de la célula diana. Alternativamente, el ácido nucleico introducido también puede integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga usando edición del genoma (por ejemplo, sistema CRISPR, TALEN, ZFN, etc.) y similares. En formas de realización preferidas, el ácido nucleico, como un vector y similares, se integran en una ubicación predefinida del genoma de la célula diana.

[0097]

Los ejemplos del promotor que se utilizará en el vector mencionado con anterioridad incluyen el promotor EF1 α , el

promotor CAG, el promotor SR α , el promotor SV40, el promotor LTR, el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor RSV (virus del sarcoma de Rous), MoMuLV (leucemia de ratón de Moloney) virus) LTR, HSV-TK (timidina quinasa del virus del herpes simple), promotor del gen TCR VCR, promotor del gen TCR V β y similares. De estos, son preferibles el promotor EF1 α , el promotor CAG, el promotor MoMuLV LTR, el promotor CMV, el promotor SR α y similares.

[0098]

El vector mencionado con anterioridad puede contener secuencia reguladora de la transcripción y traducción, sitio de unión al ribosoma, potenciador, origen de replicación, señal de adición de poliA, gen marcador de selección y similares bajo demanda además de los promotores mencionados con anterioridad. Los ejemplos del gen marcador de selección incluyen gen de dihidrofolato reductasa, gen de resistencia a neomicina, gen de resistencia a puomicina y similares.

[0099]

En una forma de realización de la presente invención, se pueden construir heterodímeros de cadena α y cadena β de TCR en la célula diana y en la superficie celular mediante la introducción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la cadena α de TCR y un ácido nucleico que codifica β cadena de TCR en la célula diana. En este caso, el ácido nucleico que codifica la cadena α de TCR y el ácido nucleico que codifica la cadena β de TCR pueden incorporarse en vectores de expresión separados o en un único vector de expresión. Cuando se incorporan en un único vector de expresión, estos dos tipos de ácidos nucleicos se incorporan preferentemente mediante una secuencia que permite la expresión policistrónica. Utilizando una secuencia que permite la expresión policistrónica, se pueden expresar más eficazmente varios genes incorporados en un tipo de vector de

expresión. Ejemplos de la secuencia que permite la expresión policistrónica incluyen la secuencia 2A (por ejemplo, secuencia 2A derivada del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (F2A), secuencia 2A derivada del virus A de la rinitis equina (ERAV) (E2A), secuencia 2A derivada de teschovirus porcino (PTV)-1 (P2A), secuencia 2A derivada del virus de Thosa asigna (TaV) (secuencia T2A) (PLoS ONE3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007), sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) (patente US N.º 4.937.190) y similares. Desde el aspecto de niveles uniformes de expresión, se prefieren la secuencia P2A y la secuencia T2A. Lo mismo se aplica al caso de usar un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la cadena α de TCR y un ácido que codifica la cadena δ de TCR.

[0100]

Un gen exógeno que se introducirá en células T que constituyen un banco celular de células T puede introducirse en una célula que se produce durante el proceso de diferenciación de células madre (por ejemplo, células iPS o células ES) en células T. Como se usa en este documento, la célula que se produce durante el proceso de diferenciación de la célula madre (por ejemplo, célula iPS o célula ES) en célula T también incluye una célula madre (por ejemplo, célula iPS o célula ES) y célula T.

[0101]

En una forma de realización de la presente invención, el gen exógeno que se va a introducir en la célula T que constituye el banco de células T se introduce en la célula iPS, la célula progenitora hematopoyética y/o la célula T.

En una forma de realización de la presente invención, antes de constituir el banco celular de células T, las células T obtenidas con anterioridad pueden cultivarse por expansión según sea necesario mediante el método que se muestra en el apartado mencionado a continuación "1-5. Cultivo de expansión".

Puede construirse un banco celular maestro de células T distribuyendo las células T obtenidas mediante el método mencionado con anterioridad en varios recipientes de conservación (viales asépticos y similares) y almacenándolos. Las células T almacenadas preferentemente se congelan.

Un contenedor de células T en el banco celular maestro de células T puede descongelarse según sea necesario y someterse a una prueba de análisis de propiedades según corresponda. Se puede construir un banco celular de trabajo de células T según sea necesario mediante el cultivo de expansión de células T preparadas a partir del mismo recipiente o de otro recipiente mediante el método que se muestra en "1-5. Cultivo de expansión" descrito más adelante, dispensando las células T obtenidas en una pluralidad de recipientes para cada cultivo de expansión, y almacenándolos. Las células T almacenadas preferentemente se congelan.

Por lo tanto, el sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de construcción de un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T (en adelante también se denominará "etapa de construcción del banco celular de células T"). En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de construcción de un banco celular de células T se denomina a veces una "parte de construcción de banco celular de células T".

[0102]

1-2. Congelación de células T

Como se describió con anterioridad, las células T en el banco de células T se congelan preferentemente. Las células T también pueden congelarse mediante un método conocido. Los ejemplos del método incluyen, pero sin limitación, colocar el recipiente que contiene las células T en un congelador (por ejemplo, un congelador de temperatura ultrabaja) y poner las células en contacto con un medio de baja temperatura (por

ejemplo, nitrógeno líquido, etc.) y conservarlos en un congelador o sistema de criopreservación (por ejemplo, localizador, etc.). La temperatura de congelación es típicamente no más de 0 °C, preferentemente no más de -20 °C, más preferentemente no más de -40 °C, más preferentemente no más de -80 °C. La velocidad de enfriamiento en la operación de congelación es típicamente una velocidad de enfriamiento de 1 a 5 horas, preferentemente de 2 a 4 horas, en particular aproximadamente 3 horas, desde el inicio del enfriamiento a 4 °C hasta alcanzar -80 °C. Tal velocidad de enfriamiento se puede lograr proporcionando un medio de congelación ajustado a una temperatura deseada en contacto con un recipiente que contiene células T directamente o después de acomodar el recipiente en un recipiente de tratamiento por congelación. El recipiente de tratamiento por congelación puede tener la función de controlar la tasa de disminución de temperatura dentro del recipiente a una velocidad predeterminada. Como recipiente de tratamiento por congelación, se puede utilizar BICELL (marca comercial registrada) (Japón) y similares. La velocidad de enfriamiento mencionada con anterioridad se puede lograr utilizando un congelador cuya velocidad de enfriamiento se puede controlar configurando un programa o similar. Como tal congelador, se puede usar cualquier congelador conocido, por ejemplo, un congelador de programa (por ejemplo, KryoMed (Thermo Fisher), PDF-2000G (Strex), KRYO-560-16 (Asahi Life Science)), y similares.

[0103]

La operación de congelación se puede realizar utilizando un medio de cultivo en el que se sumergieron las colonias, una solución tampón fisiológica o similar como solución crioprotectora, y tratando la solución agregando un agente crioprotector o reemplazando el medio de cultivo con una solución crioprotectora que contenga un agente crioprotector.

Cuando se reemplaza el medio de cultivo con una solución crioprotectora, la solución crioprotectora se puede agregar después de eliminar sustancialmente todo el medio de cultivo, o se puede agregar la solución crioprotectora dejando una parte del medio de cultivo. La solución crioprotectora puede estar disponible comercialmente y, por ejemplo, se pueden mencionar CryoStor (marca comercial registrada) CS10 y STEM-CELLBANKER (marca comercial registrada) (ZENOAQ).

[0104]

El agente crioprotector no está particularmente limitado y ejemplos del mismo incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), 1,2-propanodiol (1,2-PD), 1,3-propanodiol (1,3-PD), butilenglicol (BG), isoprenoglicol (IPG), dipropilenglicol (DPG), glicerol y similares. El agente crioprotector se puede usar solo o se pueden usar dos tipos o tres tipos o más en combinación. Además, el agente crioprotector puede usarse en combinación con un agente crioprotector extracelular. Los ejemplos del agente crioprotector extracelular incluyen polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, hidroxietilalmidón (HES), dextrano, albúmina y similares.

[0105]

La concentración del agente crioprotector añadido al medio de cultivo, o la concentración del agente crioprotector en la solución crioprotectora, es típicamente del 2 al 20% (v/v), preferentemente del 5 al 15%, más preferentemente del 8 al 13% del medio de cultivo total o la solución crioprotectora. La concentración mencionada con anterioridad se puede ajustar apropiadamente por el tipo de agente crioprotector. Por ejemplo, cuando se usa DMSO como agente crioprotector, la concentración de DMSO es típicamente del 2 al 20% (v/v), preferentemente del 2,5 al 12,5%, más preferentemente del 5 al 10% del medio de cultivo total o la solución crioprotectora.

Los ejemplos específicos del agente crioprotector y el congelador son los mencionados con anterioridad. Como contenedor que contiene células T, se puede usar un contenedor de crioconservación. Los ejemplos específicos del recipiente de crioconservación incluyen vial aséptico (por ejemplo, ampolla de vidrio, vial de polímero (vial cerrado con AT), etc.) y similares.

[0106]

1-3. Preparación de linfocitos T

En la presente invención, un banco de células T contiene generalmente uno o más recipientes en los que se dispensan y congelan las células T. Por lo tanto, la preparación de células T también incluye un proceso de recolección de uno o más contenedores de un banco de células T y descongelar las células T, un proceso de lavado de las células descongeladas según sea necesario, un proceso de precultivo y cultivo de las células, un proceso de mantenimiento de cultivo de células, y similares. Cada uno de los procesos mencionados con anterioridad puede ser realizado por la misma entidad o por diferentes entidades.

[0107]

El método antes mencionado para descongelar las células T se puede realizar mediante un método conocido. Por ejemplo, un recipiente que contiene células T congeladas recogidas de un banco de células T se pone en contacto con un medio sólido, líquido o gaseoso (por ejemplo, agua, medio de cultivo) que tiene una temperatura superior a la temperatura de congelación mediante el uso de un baño de agua, un incubadora, o similar. El método no se limita a este método. La temperatura del medio es típicamente de 4 °C a 50 °C, preferentemente de 30 °C a 40 °C, más preferentemente de 36 °C a 38 °C. El tiempo de descongelación es típicamente de 2 minutos, particularmente 20 segundos, por lo que se puede suprimir drásticamente una disminución en la tasa de supervivencia de la célula. El tiempo

de descongelación se puede ajustar, por ejemplo, cambiando los medios de descongelación, la temperatura del medio de inmersión, el volumen o la composición del medio de cultivo o la solución crioprotectora durante la congelación y similares.

[0108]

Las células se pueden lavar mediante un método conocido. Por ejemplo, el método incluye, pero no se limita a suspender las células en un lavado celular (por ejemplo, medio de cultivo o tampón biológico, etc. que contiene suero, componentes del suero (albúmina de suero y similares)), centrifugar las mismas, descartar el sobrenadante y recoger las células precipitadas. En el proceso de lavado de las células, el ciclo de suspensión, centrifugación y recuperación puede realizarse una o varias veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más). En una forma de realización de la presente invención, el proceso de lavado de las células se realiza inmediatamente después del proceso de descongelación de las células T recogidas de un banco celular de células T. Los ejemplos de lavado de células disponibles comercialmente que se pueden usar en la presente invención incluyen CELLOTION (Japón ZENYAKU KOGYO) y similares.

[0109]

En la presente invención, un medio para el cultivo previo y de mantenimiento antes mencionado no está particularmente limitado, y un medio utilizado para cultivar células animales puede prepararse en un medio basal. Cuando sea necesario, el medio basal puede contener un aditivo de medio y similares. Como medio basal y aditivo del medio, se pueden mencionar los enumerados en 1-1., proceso (1) mencionado con anterioridad.

[0110]

El cultivo de precultivo y mantenimiento se puede realizar durante un período de cultivo apropiado según el propósito. El período de cultivo es preferentemente no menos de 1 día (por ejemplo, 5, 6, 7 días) y no más de 10 días (por ejemplo,

7, 8, 9, 10 días). La temperatura de cultivo no está particularmente limitada y es de 30 °C a 40 °C, preferentemente de 37 °C. El cultivo se realiza en presencia de aire que contiene CO₂ y la concentración de CO₂ es preferentemente del 2 al 5%.

[0111]

1-4. Introducción de ácido nucleico en células T preparadas a partir de un banco de células T

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de introducir un ácido nucleico que contiene un gen exógeno en células T preparadas a partir de un banco celular de células T (en lo sucesivo también se denominará "etapa de introducción de ácido nucleico"). En la presente memoria descriptiva, "incluir una etapa" o "incluir un proceso" significa que está contenida una parte que está constituida para realizar la etapa o proceso. En lo que sigue, una parte que está constituida para realizar la etapa de introducción de ácido nucleico se denomina a veces una "parte de introducción de ácido nucleico".

Un método para introducir un ácido nucleico en la etapa de introducción de ácido nucleico, un gen exógeno y un ácido nucleico que lo contiene son los descritos con anterioridad. El gen exógeno que se va a introducir en la etapa de introducción del ácido nucleico puede ser el mismo o diferente del gen exógeno ya introducido en las células T que constituyen un banco de células T.

[0112]

La parte de introducción de ácido nucleico puede estar provista de un medio basal, un recipiente de cultivo y un espacio estéril, y puede configurarse de modo que se pueda introducir un ácido nucleico que contenga un gen exógeno en las células T preparadas mencionadas con anterioridad. En la presente memoria descriptiva, el espacio estéril significa un

espacio interno estéril definido por una cámara limpia, un banco limpio, una habitación estéril y similares, y también incluye un espacio interno estéril definido por toda la parte de introducción de ácido nucleico y un espacio estéril que es parte del espacio interno de la parte de introducción de ácido nucleico. El dispositivo, medio, etc. proporcionado en la parte de introducción de ácido nucleico se seleccionan apropiadamente de acuerdo con la propiedad del dispositivo, el método de introducción de ácido nucleico y similares. La parte de introducción de ácido nucleico puede proporcionarse según sea necesario con uno o más tipos de aditivo de medio, banco limpio, incubadora, biorreactor para cultivo celular, microscopio, centrífuga, aspirador, ácido nucleico a introducir, proteína codificadora de ácido nucleico para edición del genoma y similares, pipeta, tubo, agente tamponador (por ejemplo, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, tampón fosfato de ácido cítrico, tampón ácido bórico, tampón ácido tartárico, tampón tris, solución salina tamponada con fosfato, tampón McIlvaine, etc.), adyuvante de transferencia génica y similares, y además provistos de otros reactivos, dispositivos y similares de acuerdo con el tipo de método de introducción de ácido nucleico.

[0113]

Los ejemplos específicos del medio basal y el aditivo de medio mencionados con anterioridad proporcionados a la parte de introducción de ácido nucleico son los mencionados con anterioridad. Los ejemplos del recipiente de cultivo incluyen placa de Petri, matraz, bolsa de plástico, bolsa de teflón (marca registrada), placa, placa de Petri, placa de cultivo de tejidos, placa de cultivo múltiple, microplaca, placa de micropocillos, multiplaca, placa de múltiples pocillos, portaobjetos de cámara, matraz de cultivo celular, matraz giratorio, tubo, bandeja, bolsa de cultivo, botella giratoria

y similares que se utilizan generalmente para el cultivo celular. El material de estos recipientes de cultivo no está particularmente limitado y, por ejemplo, se pueden mencionar vidrio, cloruro de polivinilo, polímeros tipo celulosa como etilcelulosa, acetilcelulosa y similares, plástico como poliestireno, polimetilmetacrilato, policarbonato, polisulfona, poliuretano, poliéster, poliamida, poliestireno, polipropileno, polietileno, polibutadieno, copolímero de poli(etileno-acetato de vinilo), copolímero de poli(butadieno-estireno), copolímero de poli(butadieno-acrilonitrilo), copolímero de poli(etileno-acrilato de etilo), copolímero de poli(etileno-metacrilato), policloropreno, resina de estírol, polietileno clorosulfonado, acetato de etilenvinilo, copolímero de bloque acrílico y similares, y otros.

[0114]

Como el otro reactivo y dispositivo mencionado con anterioridad, cuando, por ejemplo, la introducción de ácido nucleico se realiza mediante un método de coprecipitación de fosfato de calcio, la parte de introducción de ácido nucleico puede proporcionarse con uno o más tipos de diversos reactivos y soluciones (por ejemplo, CaCl_2 y su solución, HCl y su solución, NaCl y su solución, MgCl_2 y su solución, Na_2HPO_4 y su solución, KH_2PO_4 y su solución, NP-40 y su solución, HEPES y su solución, DMSO y su solución, etc.) y similares. Por ejemplo, cuando se usa un método de electroporación, la parte de introducción de ácido nucleico puede estar provista de uno o más tipos de electroporador, electrodo (por ejemplo, electrodo de platino, electrodo de cubeta, electrodo de placa de platino de placa de Petri, etc.), placa de electroporación, cámara (por ejemplo, cámara de electrodo, cámara de placa, etc.) y similares. Por ejemplo, cuando se utiliza un método de lipofección, se puede proporcionar con uno o más tipos de

reactivos de transfección (por ejemplo, Lipofectamine (invitrogen), jetPEI (Polyplus-transfection), Xfect™ (Clontech TaKaRa cellartis), GenomONE™ (ISHIHARA SANGYO KAISHA)), Trans IT (Mirus Bio LLC), RmesFect/RmesFect Stem (OZ BIOSCIENCES), etc.), y similares. Por ejemplo, cuando la introducción de ácido nucleico se realiza utilizando un vector de virus, la parte de introducción de ácido nucleico puede estar provista de uno o más tipos de varios vectores de virus, plásmido de vector de empaquetamiento, empaquetamiento (por ejemplo, célula Plat-E), línea celular complementaria, laboratorio de bioseguridad nivel 2 y similares mencionados con anterioridad.

[0115]

1-5. Cultivo de expansión

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de cultivo de expansión de células T preparadas a partir de un banco celular maestro de células T o células T obtenidas mediante la introducción de un ácido nucleico que contiene un gen exógeno en las células T (en adelante también se denominará como "Etapa de expansión del cultivo"). A continuación, la parte constituida para ejecutar la etapa de cultivo de expansión se denomina a veces una "parte de cultivo de expansión".

[0116]

En la presente memoria descriptiva, el "cultivo de expansión" significa cultivar con el fin de proliferar una población celular deseada y aumentar el número de células. El aumento en el número de células se puede lograr aumentando el número de células por proliferación para superar la disminución en el número por muerte, y no requiere la proliferación de todas las células de la población celular. El aumento en el número de célula puede ser 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, 1.000 veces, 3.000 veces, 5.000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces o no menos de 1.000.000 de veces, en comparación con eso antes del inicio del cultivo de expansión.

[0117]

La etapa de cultivo de expansión se puede realizar mediante un método conocido. Sin embargo, desde el aspecto de la eficacia de la proliferación celular, es preferible realizar la etapa de cultivo de expansión mediante un método que incluye un proceso de estimulación de células T con un agonista de CD30, que fue encontrado por los presentes inventores. Las células T se pueden estimular con un agonista de CD30 cultivando las células T en presencia de un agonista de CD30. Por tanto, es preferible un método que incluya un proceso de estimulación de células T en presencia de un agonista de CD30. Por tanto, en una forma de realización de la presente invención, la etapa de cultivo de expansión puede incluir un proceso de cultivo de células T en presencia de un agonista de CD30. Cuando el cultivo de expansión se realiza en presencia de un agonista de CD30, el medio de cultivo contiene preferentemente un agonista del complejo CD3/TCR y también fibronectina o una variante del mismo. El agonista del complejo CD3/TCR y el agonista CD30 pueden estimular cada uno el complejo CD3/TCR y CD30.

La capacidad proliferativa de la célula T diferenciada de la célula iPS es menor que la de la célula iPS. Por lo tanto, incluso si se construye un banco celular maestro y/o un banco celular de trabajo en la etapa de células T, ha sido difícil suministrar células T y productos de células T en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico esperado mediante la administración a uno o más humanos. La presente invención supera tal dificultad. Además, utilizando un método que

incluye el proceso mencionado con anterioridad de estimular las células T con un agonista de CD30 en la etapa de cultivo de expansión, es posible suministrar productos de células T de manera más estable mediante la construcción de un banco celular maestro y/o un banco celular de trabajo en el etapa de la célula T.

[0118]

En la presente memoria descriptiva, "estimulación" significa que una determinada sustancia se une a varios receptores y similares para activar una ruta de señal en la parte inferior de la misma.

[0119]

En la presente invención, un medio usado para la etapa de cultivo de expansión de células T no está particularmente limitado, y un medio usado para cultivar células animales puede prepararse en un medio basal. Cuando sea necesario, el medio basal puede contener un aditivo de medio y similares. Como medio basal y aditivo del medio, se pueden mencionar los enumerados en 1-1, proceso (1), mencionado con anterioridad. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, en una incubadora de CO₂ bajo una atmósfera de concentración de CO₂ de aproximadamente 1 - aproximadamente 10%, de preferencia, aproximadamente 2 - aproximadamente 5% a aproximadamente 30 - aproximadamente 40 °C, de preferencia, aproximadamente 37 °C. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente el período de cultivo controlando el número de células T y similares. El número de días no está limitado siempre que se puedan obtener células T. El período de cultivo es, por ejemplo, no menos de 3 días, no menos de 5 días, no menos de 7 días, no menos de 10 días, no menos de 14 días, no menos de 21 días, preferentemente no menos de 5 días y no más de 15 días. Preferentemente no es más de 30 días, más preferentemente no más de 21 días. El período de cultivo es, por ejemplo, 3 - 30

días, 5 - 30 días, 7 - 30 días, 10 - 30 días, 14 - 30 días, 21 - 30 días, 3 - 21 días, 5 - 21 días, 7 - 21 días, 10 a 21 días, 14 a 21 días, 3 a 15 días, 5 a 15 días, 7 a 15 días, 10 a 15 días, 14 a 15 días o similares.

[0120]

Cuando se usa vitamina C en la etapa de cultivo de expansión, la vitamina C puede ser la misma que la descrita en el proceso (2-1) y se puede agregar de manera similar. En una forma de realización, la concentración de vitamina C en el medio o medio de cultivo es preferentemente de 5 µg/ml - 200 µg/ml. En otra forma de realización, la vitamina C se agrega al medio de cultivo en una cantidad correspondiente a 5 µg/ml - 500 µg/ml (por ejemplo, cantidad correspondiente a 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml).

[0121]

Cuando se usa un agonista del complejo CD3/TCR en la etapa de cultivo de expansión, el agonista del complejo CD3/TCR usado en esta etapa puede ser el mismo que el descrito en el proceso (3) 1-1 mencionado con anterioridad. La concentración del agonista del complejo CD3/TCR en el medio es también la misma que la descrita en 1-1, proceso (3), mencionado con anterioridad.

[0122]

La fibronectina o una variante de la misma está presente preferentemente en el medio en la etapa de cultivo de expansión. Tal fibronectina no está particularmente limitada siempre que sea una molécula capaz de unirse a las células T. La variante de fibronectina no está particularmente limitada siempre que sea una molécula capaz de unirse a VLA-5 y VLA-4 en la superficie de las células T, y sus ejemplos incluyen RetroNectin. La fibronectina y una variante de la misma pueden estar presentes en cualquier forma en el medio. Por ejemplo,

pueden estar contenidos en el medio durante el cultivo, o pueden estar inmovilizados en un recipiente de cultivo, y preferentemente se inmovilizan en un recipiente de cultivo.

[0123]

Cuando la fibronectina o una variante de la misma está contenida en un medio, el medio puede ser el mismo que el que contiene un agonista del complejo CD3/TCR. La presencia o ausencia de suero, aditivo y similares puede ser la misma que en el medio que contiene un agonista del complejo 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 una variante de la misma puede ser no menos de 10 ng/ml, preferentemente no menos de 100 ng/ml, y el límite superior no puede ser más de 10000 µg/ml, preferentemente no más de 1000 µg/ml.

[0124]

En la etapa de cultivo de expansión, el medio también contiene preferentemente un agonista de CD30. El agonista de CD30 no está particularmente limitado siempre que sea una molécula capaz de transducir una señal de un CD30 a una célula al unirse específicamente a CD30. Los ejemplos del agonista de CD30 incluyen al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo agonista anti-CD30 (que también se denominará simplemente "anticuerpo anti-CD30") o un fragmento unido al mismo y un ligando CD30 o un fragmento unido al mismo.

[0125]

Como el agonista del complejo CD3/TCR, el agonista de CD30 usado en la etapa de cultivo de expansión puede estar presente en cualquier forma siempre que pueda estar presente en contacto con CD30 durante el cultivo. Por ejemplo, puede estar contenido en el medio durante el cultivo o puede estar inmovilizado en un recipiente de cultivo y preferentemente está contenido en el medio.

[0126]

Cuando un agonista de CD30 está contenido en un medio, el medio puede ser el mismo que el que contiene un agonista del complejo CD3/TCR. La presencia o ausencia de suero, aditivo y similares puede ser la misma que en el medio que contiene un agonista del complejo CD3/TCR. Cuando un agonista de CD30 está contenido en un medio, la concentración del agonista de CD30 en el medio puede ser determinada apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el agonista de CD30. Por ejemplo, cuando el agonista de CD30 es un anticuerpo agonista anti-CD30 o un fragmento de enlace del mismo, la concentración del anticuerpo agonista anti-CD30 o un fragmento de enlace del mismo en el medio es generalmente 1 ng/ml - 10000 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml - 300 ng/ml.

[0127]

Cuando el agonista de CD30 se inmoviliza en un recipiente de cultivo, el recipiente de cultivo puede ser el mismo en el que está inmovilizado el agonista del complejo CD3/TCR. Además, un método para inmovilizar el agonista de CD30 en el recipiente de cultivo puede ser el mismo que para inmovilizar el agonista del complejo CD3/TCR. El límite inferior de la concentración de una solución de agonista de CD30 cuando el agonista de CD30 está inmovilizado en un recipiente de cultivo no puede ser inferior a 0,1 ng/ml, preferentemente no inferior a 1 ng/ml, y el límite superior no puede ser superior a 10000 ng/ml, preferentemente no más de 1000 ng/ml. La concentración es, por ejemplo, 0,1 - 10000 ng/ml, 1 - 10000 ng/ml, 0,1 - 1000 ng/ml, 1 - 1000 ng/ml, 30 ng/ml - 300 ng/ml o similares.

[0128]

Cuando se usa citoquina en la etapa de cultivo de expansión, la citoquina puede ser IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, o similares. Solo se puede usar un tipo de estos o se pueden usar varios tipos (preferentemente todos los tipos) de

los mismos. Cuando la citoquina es IL-2, su concentración en el medio puede ser de 10 U/ml - 1000 U/ml o 0.01 ng/ml - 1000000 ng/ml, cuando la citoquina es IL-7, la concentración de la misma en el medio puede ser 0,1 ng/ml - 1000 ng/ml, 1 ng/ml - 500 ng/ml, 5 ng/ml - 100 ng/ml (por ejemplo, 10 ng/ml). La concentración de IL-12 en el medio puede ser de 0,1 ng/ml - 1000 ng/ml, 1 ng/ml - 500 ng/ml, 5 ng/ml - 100 ng/ml (por ejemplo, 50 ng/ml), la concentración de IL-15 en el medio puede ser de 0,1 ng/ml - 1000 ng/ml, 1 ng/ml - 500 ng/ml, 5 ng/ml - 100 ng/ml (por ejemplo, 10 ng/ml), la concentración de IL-18 en el medio puede ser 0,1 ng/ml - 1000 ng/ml, 1 ng/ml - 500 ng/ml, 5 ng/ml - 100 ng/ml (por ejemplo, 50 ng/ml), y la concentración de IL-21 en el medio puede ser de 0,1 ng/ml - 1000 ng/ml, 1 ng/ml - 500 ng/ml, 5 ng/ml - 100 ng/ml (por ejemplo, 20 ng/ml).

[0129]

En la etapa de cultivo de expansión, una citoquina de la familia de TNF puede estar contenida como citoquina en el medio. Ejemplos de citoquinas de la familia TNF incluyen TNF- α , TNF- β , linfoxina α , ligando Fas, TRAIL, TWEAK, TL1A, ligando RANK, ligando OX40, APRIL, AITRL, BAFF, 4-1BBL y ligando CD40 y similares, y Es preferible TL1A. Cuando se usa TL1A, la concentración del mismo en el medio puede ser 5 ng/ml - 500 ng/ml, preferentemente 10 ng/ml - 300 ng/ml, más preferentemente 20 ng/ml - 200 ng/ml (por ejemplo, 50 ng/ml).

[0130]

Además, en la etapa de cultivo de expansión, el medio puede contener además un inhibidor de la apoptosis. Como inhibidor de la apoptosis, se puede mencionar un inhibidor de proteasa, por ejemplo, un inhibidor de caspasa. Como inhibidor de caspasa, se prefiere el inhibidor de Pan Caspasa FMK Z-VAD (N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp (O-Me) fluorometilcetona) (en lo sucesivo, algunas veces denominado "Z-VAD-FMK"), y la

concentración del mismo en el medio puede ser 1 μM - 1000 μM , preferentemente 1 μM - 500 μM , más preferentemente 1 μM - 200 μM , de particular preferencia, 1 μM - 50 μM (por ejemplo, 10 μM).

[0131]

En la presente invención, las células T obtenidas se pueden usar después del aislamiento, o se pueden usar tal cual (es decir, como una población celular que posiblemente contenga otro tipo de células). Cuando se aísla, el aislamiento se puede realizar utilizando al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en αTCR , βTCR y CD3 como índice, y el método de aislamiento utilizado puede ser un método bien conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos del mismo incluyen, pero sin limitación, un método que usa un anticuerpo para αTCR , βTCR y CD3 (unido con perlas magnéticas y similares según sea necesario) y aislamiento por citometría de flujo o método de separación de células magnéticas, un método de purificación que usa una columna de afinidad en la que se inmoviliza un antígeno deseado y similares.

Cuando se usa tal como está, la proporción de células T en la población celular puede aumentarse usando un método bien conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos del método para aumentar la proporción de células T en la población celular incluyen, pero sin limitación, los métodos de Front. Immunol., 5: 636 (2014), Publicación Nacional de Solicitud de Patente Internacional N.º 2017-537625, Publicación Nacional de Solicitud de Patente Internacional N.º 2003-529363 y similares.

[0132]

Por tanto, la parte de cultivo de expansión está provista de un medio basal, un recipiente de cultivo, un espacio estéril y preferentemente un agonista de CD3, y está constituida para realizar un cultivo de expansión de células T. El dispositivo,

medio y similares que se proporcionarán a la parte de introducción de ácido nucleico se seleccionan apropiadamente de acuerdo con la propiedad del dispositivo, el método de cultivo de expansión y similares. Cuando se usa un agonista de CD3, el recipiente de cultivo y el agonista de CD30 se pueden proporcionar en la parte del cultivo de expansión de manera que CD30 se inmovilice en el recipiente de cultivo. La parte del cultivo de expansión puede estar provista, según sea necesario, con uno o más tipos de agonista del complejo CD3/TCR, fibronectina o una variante del mismo, inhibidor de la apoptosis, aditivo de medio, banco limpio, incubadora, biorreactor para cultivo celular, microscopio, centrífuga, aspirador, pipeta, tubo, agente tampón (por ejemplo, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, tampón fosfato de ácido cítrico, tampón ácido bórico, tampón ácido tartárico, tampón tris, solución salina tamponada con fosfato, tampón McIlvaine, etc.) y similares, y más provisto de otros reactivos, dispositivos y similares según el tipo de método de cultivo. Cuando se usa citoquina como un medio aditivo, la citoquina preferible es, por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, citoquina de la familia TNF o similares.

[0133]

Los ejemplos específicos del medio basal, aditivo de medio, agonista de CD3, agonista del complejo CD3/TCR, fibronectina o una variante de los mismos mencionados con anterioridad y el inhibidor de la apoptosis que se han de proporcionar a la parte del cultivo de expansión son los mencionados con anterioridad. Los ejemplos específicos del recipiente de cultivo incluyen el mismo descrito en 1-4. El producto de células AT se puede producir llenando las células T cultivadas en expansión en un recipiente de almacenamiento apropiado (vial estéril, bolsa de transfusión de sangre, etc.), etiquetando el recipiente según sea necesario, y envasar el

recipiente.

[0134]

1-6. Producción de producto de células T congelado

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de producción de un producto de células T congeladas a partir de las células T cultivadas en expansión antes mencionadas (en lo sucesivo también se denominará "etapa de producción de producto de células T congeladas"). En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de producción del producto de células T congeladas se denomina a veces una "parte de producción del producto de células T congeladas".

[0135]

La etapa de producción del producto de células T congeladas se puede realizar mediante un método similar al 1-2.

[0136]

Por lo tanto, la parte de producción de productos de células T congeladas puede estar provista de al menos un agente crioprotector, un recipiente de criopreservación, un congelador y/o un sistema crioprotector (por ejemplo, Locator, etc.), y constituirse para producir una reserva congelada de células T cultivadas en expansión. La parte de producción de stock congelado se puede proporcionar, según sea necesario, con uno o más tipos de medio de baja temperatura (por ejemplo, nitrógeno líquido, etc.), pipeta, tubo, agente tampón (por ejemplo, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, ácido cítrico tampón de fosfato, tampón de ácido bórico, tampón de ácido tartárico, tampón tris, solución salina tamponada con fosfato, tampón McIlvaine, etc.) y similares.

[0137]

Los ejemplos específicos del agente crioprotector y el congelador que se proporcionarán a la parte de producción del producto de células T congelado son los mencionados con

anterioridad. Los ejemplos específicos del recipiente de crioconservación incluyen un vial (por ejemplo, una ampolla de vidrio, un tubo de plástico, etc.) y similares.

[0138]

1-7. Construcción de la colección de productos de células T

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de construir una colección de productos de células T que incluya dos o más tipos de productos de células T recolectando productos de células T (en lo sucesivo también se denominará "etapa de construcción de la colección de productos de células T"). En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de construcción de la colección de productos de células T se denomina a veces una "parte de construcción de la colección de productos de células T".

[0139]

Los productos de células T que constituyen la colección de productos de células T pueden ser productos de células T congelados. Desde el aspecto de la estabilidad de las células T, es preferible un producto de células T congelado para el almacenamiento a largo plazo.

[0140]

La etapa de construcción de la colección de productos de células T también se puede realizar mediante un método conocido. Dicho método incluye la construcción produciendo dos o más tipos de productos de células T mediante el método mencionado con anterioridad, pegando una etiqueta o similar de modo que se pueda distinguir el tipo de productos de células T y almacenando los productos. El tipo de colección también se puede incrementar añadiendo más tipos de productos de células T a la colección de productos de células T construida. Para un fácil almacenamiento, es preferible almacenar en el mismo espacio (por ejemplo, en el mismo congelador, en la misma habitación, en el mismo edificio, en el mismo sitio,

etc.); sin embargo, puede almacenarse en un espacio físicamente separado. Puede usarse cualquier método para distinguir el tipo de producto de células T siempre que se pueda distinguir el tipo. Por ejemplo, se puede adherir una etiqueta y similares al recipiente, o cuando se almacenan en otro congelador o sistema crioprotector, se puede adherir una etiqueta y similares al congelador o sistema crioprotector, o se puede usar software de administración y similares para distinguir los productos y similares.

[0141]

Por lo tanto, la parte de construcción de la colección de productos de células T puede estar provista de al menos productos de células T para ser recolectadas y constituida para construir una colección de productos de células T que incluya dos o más tipos de productos de células T recolectando productos de células T contruidos como se mencionó con anterioridad. Además, la parte de construcción de la colección de productos de células T se puede proporcionar, según sea necesario, con uno o más tipos de etiqueta, congelador, sistema crioprotector, software de gestión y similares. Los ejemplos específicos del congelador son los descritos con anterioridad.

[0142]

1-8. Identificación de antígeno

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de identificación de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor (de aquí en adelante simplemente denominado "antígeno") expresado en un tumor del sujeto de prueba (de aquí en adelante también denominado como "etapa de identificación del antígeno"). A continuación, la parte constituida para ejecutar la etapa de identificación del antígeno se denomina a veces una "parte de identificación del antígeno".

[0143]

La etapa de identificación del antígeno también se puede realizar mediante un método conocido. Los ejemplos del método incluyen recolectar una muestra biológica tal como una sección de tejido tumoral, fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, etc.) que contiene células tumorales y similares de un sujeto de prueba, extraer ARNm de la muestra, sintetizar ADNc de ARNm según sea necesario e identificar el ácido nucleico mediante un método de amplificación de ácido nucleico y/o un método de detección de ácido nucleico tal como PCR digital (por ejemplo, ddPCR), RT-PCR, biochip (por ejemplo, microarray), RNAseq y similares. La PCR se puede realizar usando, por ejemplo, un conjunto de cebadores capaz de amplificar el ARNm de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a un tumor, y un dispositivo de PCR. Cuando se usa RNAseq, la PCR se puede realizar usando un secuenciador de próxima generación.

[0144]

Por tanto, la parte de identificación de antígeno puede estar constituida para poder identificar un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor expresado en el tumor del sujeto. Por ejemplo, la parte de identificación de antígeno está provista de al menos el conjunto de cebadores y el dispositivo de PCR mencionados con anterioridad, al menos el biochip mencionado con anterioridad o al menos el secuenciador de próxima generación mencionado con anterioridad.

[0145]

Los ejemplos del secuenciador de próxima generación mencionado con anterioridad incluyen, pero sin limitación, el dispositivo fabricado por illumina (por ejemplo, MiSeq, HiSeq2500), el dispositivo fabricado por Thermo Fisher Scientific (por ejemplo, Ion Proton, Ion PGM), el dispositivo fabricado por Roche Diagnostic (por ejemplo, GS FLX+, GS Junior) y similares.

[0146]

1-9. Selección de producto de células T

En el sistema de provisión de la presente invención, se obtiene información del sujeto de prueba y se puede seleccionar un producto de células T apropiado basándose en la información. Por lo tanto, el sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de obtener información del sujeto de prueba y/o una etapa de selección de un producto de células T adecuado para el sujeto de prueba. En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de obtención de información del sujeto de prueba se denomina a veces una "parte de obtención de información del sujeto de prueba".

La información del sujeto de prueba no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, información genética (por ejemplo, información relacionada con el gen HLA, información genética anormal, etc.) del sujeto de prueba, resultado del diagnóstico, historial, historial de administración de fármacos, edad, género, tipo de sangre, altura, peso corporal y cuando el sujeto de prueba tiene un tumor, información del antígeno específico del tumor o asociado al tumor expresado en el tumor.

[0147]

Una forma de realización de la presente invención puede incluir una etapa de seleccionar un producto de células T que exprese un CAR o un TCR exógeno que reconozca y se una al antígeno identificado a partir de la información del sujeto de prueba de una colección de productos de células T que contenga dos o más tipos de productos de células T (en lo sucesivo también denominados "etapa de selección de productos de células T"). En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de selección del producto de células T se denomina a veces una "parte de selección de productos de células T". El producto de células T en la etapa de selección

de productos de células T puede ser un producto de células T congelado. Desde el aspecto de la estabilidad de las células T, es preferible un producto de células T congelado.

[0148]

La etapa de selección de un producto de células T que exprese un CAR o un TCR exógeno que reconozca y se una al antígeno identificado de una colección de productos de células T que contenga productos de células T se engloba en concepto en la etapa de seleccionar un producto de células T adecuado para el sujeto de prueba basado en la información obtenida del sujeto de prueba. La parte de obtención de información del sujeto de prueba incluye una parte de identificación de antígeno. En una forma de realización de la presente invención, la etapa de selección de productos de células T puede seleccionar un banco celular de células T que contienen células T que expresan CAR apropiado, TCR exógeno, citoquina, quimioquina y similares, basándose, por ejemplo, en el contenido del plan de producción del producto de células T que se proporcionará.

[0149]

La etapa de selección del producto de células T se puede realizar mediante un método conocido. El método incluye seleccionar, basándose en el material (medio de papel o medio de datos electrónico) que muestra los resultados de la identificación mediante la etapa de identificación del antígeno antes mencionado, un producto de células T que contiene células T que expresan un CAR o un TCR exógeno que reconocen y se unen al antígeno identificado de una lista de productos de células T preparada de antemano. Cuando se expresan múltiples tipos de antígenos específicos de tumores o antígenos asociados a tumores en la etapa de identificación de antígenos, se puede seleccionar un producto de células T que contenga células T en función de los criterios de

evaluación, como uno que tenga el nivel de expresión más alto o uno que se espera que sea más eficaz con el producto de células T. Sólo se puede seleccionar un tipo de producto de células T, o se pueden seleccionar dos o más tipos. Estas etapas pueden utilizar software diseñado para la selección del producto de células T mencionado con anterioridad. El producto de células T se puede seleccionar de acuerdo con las instrucciones (prescripción médica, etc.) de un médico o institución médica.

[0150]

Por lo tanto, la parte de selección de productos de células T se proporciona con al menos un material que muestra los resultados de identificación en la etapa de identificación del antígeno, y puede estar constituida para seleccionar un producto de células T que exprese un CAR o un TCR exógeno que reconozca y se una al antígeno identificado de una colección de productos de células T que contiene productos de células T. La parte de selección de productos de células T puede proporcionarse, según sea necesario, con uno o más tipos de una lista de productos de células T, el software mencionado con anterioridad diseñado para la selección del producto de células T y similares.

[0151]

La parte de construcción de un banco celular de células T, parte de construcción de una colección del banco celular de células T (descrita más adelante), banco celular de la parte de selección de células T (descrita más adelante), parte de producción de producto de células T congeladas, parte de construcción de la colección de productos de células T y la parte de selección de productos de células T gestionan la información relativa a las células T que constituyen el banco de células T y el producto de células T (en lo sucesivo, "información relacionada con las células T"). La información

relacionada con las células T incluye registros de producción, resultados de análisis de propiedades, resultados de evaluación de calidad, registros de control de temperatura de almacenamiento, planes de producción y similares relacionados con las células T. Cuando la célula T es una célula T derivada de células iPS, se incluyen los registros de producción, los resultados del análisis de propiedades, los resultados de la evaluación de la calidad, los registros de temperatura de almacenamiento, la información genética específica y similares relacionados con la célula iPS. Cuando la célula T es una célula T en la que se ha introducido un ácido nucleico que codifica un gen exógeno, se incluye información sobre el gen exógeno (por ejemplo, tipo de proteína y citoquina codificada por el gen exógeno, etc.) y similares. En el banco celular de la parte de selección de células T y la parte de selección de productos de células T, se seleccionan cada uno un banco celular de células T y un producto de células T en función del contenido del plan de producción del producto de células T que se proporcionará. En el banco celular de la parte de selección de células T y la parte de selección del producto de células T, un banco celular de células T y un producto de células T pueden seleccionarse apropiadamente en base a la información del sujeto de prueba obtenida en la parte de obtención de información del sujeto de prueba. Por lo tanto, el banco celular de la parte de selección de células T y la parte de selección de productos de células T se pueden usar incluso cuando sólo está involucrado un tipo de banco celular de células T y/o producto de células T.

[0152]

Un aspecto de la presente invención se describe con referencia a la Fig. 16. En la presente memoria descriptiva y los dibujos, los elementos constituyentes que tienen sustancialmente el mismo constituyente funcional se designan con los mismos

símbolos para omitir la descripción duplicada.

Como se muestra en la Fig. 16, el sistema 100 de suministro de producto de células T prepara células T de un banco celular 102 de células T para proporcionar un producto 131 de células T. El banco celular 102 puede ser construido por el banco de células T parte de construcción 101. Cuando se construyen dos o más tipos de bancos celulares de células T, pueden ser recolectados por la colección de banco celular de la parte de construcción de células T 111 para construir la colección de bancos celulares de células T 112.

Las células T preparadas pueden introducirse con un gen exógeno deseado en la parte de introducción de ácido nucleico 103 según sea necesario. Además, las células T pueden cultivarse por expansión en la parte 104 del cultivo de expansión si es necesario. Además, las células T pueden congelarse en la parte 105 de producción del producto de células T congeladas para proporcionar un producto 106 de células T congelado si es necesario. Cuando se producen dos o más tipos de productos de células T congelados, pueden ser recolectados por la parte 121 de construcción de recolección de productos de células T para construir una colección 122 de productos de células T.

En el banco celular de la parte de selección de células T 154 y la parte de selección de productos de células T 155, se puede seleccionar un banco celular apropiado de células T y producto de células T como el producto de células T 131 que se proporcionará en base a la información relacionada con las células T 171. Dicha información relacionada con las células T es administrada por el banco celular de la parte 101 de construcción de células T, la colección del banco celular de la parte 111 de construcción de células T, el banco celular de la parte 154 de selección de células T, la parte de construcción de la colección de productos de células T 121, y

la parte de selección de productos de células T 155. Además, para proporcionar un producto de células T más adecuado para el tratamiento y/o prevención del sujeto, la información del sujeto de prueba 151 es obtenida por el sujeto de prueba obteniendo la información de la parte 152, y un producto de células T apropiado 131 puede ser seleccionado por el T selección de productos celulares, parte 155 basada en la información del sujeto de prueba. El producto de células T 131 es el mismo que el producto de células T 106 cuando el producto de células T es de un tipo, y uno o más tipos de productos de células T contenidos en la colección de productos de células T 122 cuando se seleccionan de la colección de productos de células T 122. La parte de obtención de información del sujeto de prueba puede incluir una parte 153 de identificación de antígeno. El banco celular de la parte 154 de selección de células T puede seleccionar un banco celular apropiado de la parte 154 de selección de células T basándose en la información obtenida en la parte 152 de obtención de información del sujeto de prueba. El banco celular de la célula T 161 es el mismo que el banco celular de la célula T 102 cuando el banco celular de la célula T es de un tipo, y cuando se selecciona de la colección del banco celular de la célula T 112, el banco celular de la célula T 161 puede ser uno o más tipos incluidos en la colección del banco celular de células T 112. Las células T pueden prepararse a partir del banco celular de células T 161 y el producto de células T puede proporcionarse de la misma manera que se describe con anterioridad.

[0153]

A continuación, se describe la constitución del hardware que puede incluirse en la parte de obtención de información del sujeto de prueba, el banco celular de la parte de construcción de células T, el banco celular de la parte de selección de células T y/o la parte de selección de productos de células

T. Dado que el banco celular de la parte de selección de células T y la parte de selección de productos de células T tienen la misma constitución de hardware, la constitución de hardware que puede incluirse en la parte de selección de productos de células T se describe aquí.

La Fig. 17 muestra una forma de realización de una constitución de hardware que puede incluirse en la parte 200 de selección de productos de células T. Como se muestra en la Fig. 17, la parte 200 de selección de productos de células T incluye el procesador 201, la memoria 202, el dispositivo de almacenamiento auxiliar 203, dispositivo I/F (interfaz) 204, el dispositivo 205 de comunicación y el dispositivo 206 de accionamiento. El hardware de la parte 200 de selección de productos de células T está conectado entre sí a través del bus 207.

El procesador 201 tiene varias unidades aritméticas como CPU (Unidad Central de Procesamiento) y GPU (Unidad de Procesamiento de Gráficos). El procesador 201 lee y ejecuta programas tales como diverso software instalado en el dispositivo de almacenamiento auxiliar 203 en la memoria 202. La memoria 202 tiene un dispositivo de almacenamiento principal como ROM (memoria de sólo lectura) y RAM (memoria de acceso aleatorio). El procesador 201 y la memoria 202 forman una computadora, y el procesador 201 realiza varias funciones ejecutando programas tales como varios programas leídos en la memoria 202.

El dispositivo de almacenamiento auxiliar 203 almacena programas tales como diverso software, información diversa (por ejemplo, información relacionada con las células T, información del sujeto de prueba, etc.) y datos utilizados cuando el procesador 201 ejecuta programas tales como diverso software.

El dispositivo I/F 204 es un dispositivo de conexión que

conecta un dispositivo de operación 210 y un dispositivo de visualización 211 a la parte 200 de selección de productos de células T. El dispositivo 204 I/F recibe varias instrucciones a la parte 200 de selección de productos de células T a través de la dispositivo 210. Además, el dispositivo I/F 204 envía el resultado del procesamiento mediante la parte 200 de selección de producto de células T a través del dispositivo 211 de visualización.

El dispositivo de comunicación 205 es un dispositivo de comunicación para comunicarse con otro dispositivo a través de la red.

El dispositivo de accionamiento 206 es un dispositivo para configurar el medio de grabación 212. El medio de grabación 212 aquí incluye un medio tal como CD-ROM, disco flexible, disco magneto-óptico o similar que graba información óptica, eléctrica o magnéticamente. Además, el medio de grabación 212 puede incluir una memoria semiconductora o similar para grabar eléctricamente información como ROM o memoria flash.

Los programas tales como varios software que se instalarán en el dispositivo de almacenamiento auxiliar 203 se instalan, por ejemplo, configurando el medio de grabación distribuido 212 en el dispositivo de accionamiento 206 y leyendo los programas tales como varios programas de software grabados en el medio de grabación 212 por el dispositivo de accionamiento 206. Alternativamente, programas tales como varios software instalados en el dispositivo de almacenamiento auxiliar 203 pueden instalarse descargándolos de la red a través del dispositivo de comunicación 205.

[0154]

1-10. Uso de producto de células T

El producto de células T proporcionado por el sistema de provisión de la presente invención puede exhibir actividad citotóxica contra células cancerosas, células madre cancerosas,

células tumorales y similares y, por lo tanto, puede usarse para la prevención o el tratamiento del cáncer o tumor y puede administrarse al sujeto de prueba. En la presente memoria descriptiva, el sujeto de prueba significa un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono, humano) al que se administra un producto de células T en un ensayo clínico o similar. El sujeto de prueba es preferentemente un ser humano.

[0155]

Los cánceres y tumores que se previenen o tratan con los productos de células T mencionados con anterioridad se describen, por ejemplo, en "Daniel Baumhoer et al., Am J. Clin Pathol, 2008, 129, 899-906" y similares. Los ejemplos específicos del mismo incluyen, pero sin limitación, 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 de pulmón de células pequeñas), cáncer de testículo (por ejemplo, tumor de células germinales no seminomas), tumor de tejido blando (por ejemplo, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno), cáncer de útero (por ejemplo, tumor intraepitelial de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de cuello uterino), melanoma, tumor de la glándula suprarrenal (por ejemplo, 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 lobulillar invasivo, cáncer de mucosas), cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer medular), laringe cáncer (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cáncer de vejiga urinaria (por ejemplo, carcinoma invasivo de células de transición) y similares.

[0156]

Las células T que van a estar contenidas en el producto de

células T antes mencionado pueden cultivarse y/o estimularse usando un medio apropiado y/o una molécula estimulante antes de la administración a un sujeto de prueba. Los ejemplos de la molécula estimulante incluyen, pero sin limitación, citoquinas, proteína adecuada, otros componentes y similares. Los ejemplos de citoquinas incluyen IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- γ y similares, y se puede usar preferentemente IL-2. Aunque la concentración de IL-2 en el medio no está particularmente limitada, por ejemplo, es preferentemente de 0,01 a 1×10^5 U/ml, más preferentemente de 1 a 1×10^4 U/ml. Los ejemplos de la proteína adecuada incluyen ligando CD3, ligando CD28, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD30 y anticuerpo anti-IL-4. Además de estos, también se puede añadir un factor estimulante de linfocitos como lectina y similares. Además, puede añadirse suero o plasma al medio. Aunque la cantidad de adición a estos medios no está particularmente limitada, se puede mencionar 0% en volumen - 20% en volumen. Además, la cantidad de suero o plasma a utilizar puede cambiarse según la etapa de cultivo. Por ejemplo, la concentración de suero o plasma se puede reducir gradualmente. El origen del suero o plasma puede ser autólogo o alogénico, y es preferible uno autólogo desde el punto de vista de la seguridad.

[0157]

Las células T mencionadas con anterioridad se usan preferentemente por administración parenteral al sujeto de prueba. Los ejemplos del método para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea y similares. Si bien la dosis se selecciona apropiadamente de acuerdo con la condición, peso corporal, edad y similares del sujeto de prueba, el medicamento generalmente se administra de manera que el número de células es generalmente 1×10^6 -

1×10^{10} células, preferentemente $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ células, más preferentemente $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ células, por dosis a un sujeto de prueba con un peso corporal de 60 kg. Las células T se pueden administrar una vez o en porciones múltiples.

[0158]

2. Método de construcción del banco celular maestro de células T y/o banco celular de trabajo de células T

La presente invención también proporciona un método para construir el banco celular maestro de células T mencionado con anterioridad y/o el banco celular de trabajo de células T (en lo sucesivo, algunas veces denominado "el método de construcción de bancos celulares de la presente invención"). En una forma de realización de la presente invención, cuando el gen exógeno mencionado con anterioridad es el gen CAR, el método de construcción del banco celular de la presente invención incluye (I) un proceso para diferenciar una célula madre pluripotente inducida libre de un receptor de antígeno quimérico (CAR) gen en una célula T para la terapia CAR-T, (II) un proceso de almacenamiento de las células T diferenciadas, y (III) un proceso de caracterización de las células T diferenciadas. Si bien los procesos (II) y (III) mencionados con anterioridad se realizan generalmente en este orden, el proceso (II) puede realizarse después del proceso (III). En otra forma de realización, cuando el gen exógeno mencionado con anterioridad es el gen TCR, el método de construcción del banco celular de la presente invención incluye (i) un proceso para diferenciar una célula madre pluripotente inducida libre de un gen TCR en una célula T para TCR-T terapia, (ii) un proceso de almacenamiento de las células T diferenciadas, y (iii) un proceso de caracterización de las células T diferenciadas. Si bien los procesos (ii) y (iii) mencionados con anterioridad se realizan generalmente en este orden, el proceso (ii) puede realizarse después del

proceso (iii). Cada uno de los procesos mencionados con anterioridad puede ser realizado por la misma entidad o entidades diferentes.

[0159]

En otra forma de realización de la presente invención, un banco celular maestro de células T y/o un banco celular de trabajo de células T construido por el método de construcción de bancos celulares de la presente invención (en lo sucesivo, algunas veces denominado "el banco celular de células T de la presente invención").

[0160]

2-1. Inducción de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas sin gen CAR o gen TCR exógeno en células T

Los procesos (I) e (i) del punto 2 mencionados con anterioridad se pueden realizar utilizando células madre pluripotentes inducidas libres de gen CAR y/o gen TCR exógeno y según el método descrito en los procesos (1) y (2) del punto 1-1 mencionado con anterioridad. Para la terapia CAR-T en el proceso (I) significa uso para el tratamiento o profilaxis con CAR expresado en células T, y excluye el tratamiento o profilaxis con TCR exógeno y TCR endógeno expresado en células T. La célula T puede contener un gen TCR exógeno introducido con fines distintos a los terapéuticos o preventivos, por ejemplo, con el fin de suprimir la expresión del gen TCR endógeno y con el fin de producir eficazmente células T uniformes, descrito en el punto 1-1 antes mencionado. De manera similar, para la terapia con TCR-T en el proceso (i) significa el uso para el tratamiento o profilaxis con TCR exógeno expresado en células T, y excluye el tratamiento o profilaxis con CAR exógeno y TCR endógeno expresado en células T. La célula T puede contener un gen de TCR exógeno introducido con fines distintos de los terapéuticos o preventivos, por

ejemplo, el propósito de suprimir la expresión del gen de TCR endógeno y similares, descritos en el punto 1-1 mencionado con anterioridad.

[0161]

La descripción de CAR y TCR en los procesos (I) e (i) mencionados con anterioridad, ejemplos específicos del antígeno dirigido por TCR y CAR, definición de cada término, como célula T y similares, y otros, se describen en los puntos 1 y 1-1 mencionados con anterioridad. Ejemplos específicos de linfocitos T obtenidos por inducción de diferenciación en el proceso mencionado con anterioridad son los descritos en el anterior 1. El linfocito T es preferentemente un linfocito T citotóxico, más preferentemente un linfocito T citotóxico positivo para CD8 $\alpha\beta$ que expresa CD8 $\alpha\beta$.

[0162]

2-2. Stock de células T diferenciadas

Los procesos (III) y (iii) en el punto 2 mencionado con anterioridad se pueden realizar usando células T obtenidas en el punto 2-1 mencionado con anterioridad, y de acuerdo con el método descrito en los puntos 1-1 y 1-2 mencionados con anterioridad.

[0163]

Las células madre pluripotentes inducidas que se utilizarán para el método de construcción del banco celular de la presente invención y el banco de células T de la presente invención pueden establecerse mediante el método descrito en el punto 1-1 mencionado con anterioridad. La célula T que se utilizará para la célula madre pluripotente inducida antes mencionada o los procesos (II) y (ii) de los 2 mencionados con anterioridad es preferentemente una célula T que muestra una expresión suprimida de al menos un tipo de gen HLA como en la célula descrita en el punto 1-1 anterior. El gen y la combinación de HLA específicos, la definición de supresión de la expresión

génica y un método de supresión, y similares, son como se describe en el punto 1-1 mencionado con anterioridad.

[0164]

2-3. Caracterización de la célula T

Los elementos de prueba para la caracterización en los procesos (III) y (iii) en el punto 2 mencionado con anterioridad varían según las propiedades biológicas (por ejemplo, auxotrofia), el historial de cultivo y la viabilidad de la prueba de las células para ser objeto del banco celular, y son determinados apropiadamente por los expertos en la técnica, o en base al contenido de las discusiones entre los expertos en la técnica y las autoridades reguladoras, y similares. La información relacionada con el método de construcción del mismo y los resultados de la caracterización y evaluación de la calidad se presentan a las autoridades farmacéuticas al solicitar la aprobación de fabricación y comercialización en cada país. La caracterización de un banco celular de células T evalúa principalmente la ausencia de contaminación con un factor infeccioso exógeno. En particular, dado que la contaminación con virus exógenos puede tener consecuencias graves en el uso clínico, se evalúa minuciosamente de acuerdo con ICH Q5A (R1). Otras pruebas incluyen una prueba de identidad para detectar contaminación cruzada con otra línea celular. Además, también se pueden realizar análisis de cariotipo y prueba de tumorigenicidad. Los elementos de prueba de la evaluación de la calidad incluyen la prueba de confirmación usando el fenotipo celular apropiado como célula T, prueba de pureza, prueba de impurezas derivada del proceso de producción y pruebas cuantitativas como número de células, tasa de supervivencia celular, y similares.

[0165]

2-4. Construcción de la colección del banco celular de células

T

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de construcción de una colección de banco celular maestro de células T y/o una colección de banco celular de trabajo de células T que contenga dos o más tipos de bancos celulares maestros de células T y/o bancos celulares de trabajo de células T (en lo sucesivo, también denominado "una colección de bancos celulares de células T") mediante la recopilación de bancos celulares maestros de células T y/o bancos celulares de trabajo de células T (en lo sucesivo también denominados "una célula colección de banco de la etapa de construcción de células T"). En la presente memoria descriptiva, la parte constituida para ejecutar la etapa de construcción de la colección de células T en el banco celular se denomina a veces una "parte de construcción de la colección de células T en el banco celular".

[0166]

Cuando un banco de células T que se usa para proporcionar uno o más productos de células T puede no ser suficiente, o cuando es apropiado usar un producto de células T de un tipo diferente de banco celular de células T dependiendo de las características del sujeto de prueba de administración, se puede añadir un banco de células T construido por separado a un banco de células T existente. Mediante la construcción de una colección de células T en bancos celulares mediante la recogida de varios bancos de células T, se puede proporcionar un sistema de provisión de productos de células T más estable y robusto.

[0167]

La recolección del banco celular de la etapa de construcción de células T también se puede realizar mediante un método conocido. Dicho método incluye la construcción produciendo dos o más tipos de bancos celulares de células T mediante el método de construcción de bancos celulares de la presente invención

mencionado con anterioridad, adjuntando una etiqueta o similar de modo que el tipo de banco celular de células T pueda ser distinguido, y almacenando los productos. El tipo de colección también se puede incrementar añadiendo un tipo diferente de banco de células T al banco celular construido de células T. Para un fácil almacenamiento, es preferible almacenar en el mismo espacio (por ejemplo, en el mismo congelador, en la misma habitación, en el mismo edificio, en el mismo sitio, etc.); sin embargo, puede almacenarse en un espacio físicamente separado. Puede usarse cualquier método para distinguir el tipo de banco celular de células T siempre que se pueda distinguir el tipo. Por ejemplo, se puede adherir una etiqueta y similares al recipiente de crioconservación, o cuando se almacena en otro congelador o sistema crioprotector, se puede adherir una etiqueta y similares al congelador o sistema crioprotector, o se puede usar software de gestión y similares para distinguir los productos y similares.

[0168]

Por lo tanto, la colección de banco celular de la parte de construcción de células T puede proporcionarse con al menos un banco celular de células T para recolectar, y constituirse para construir una colección de banco celular de células T que incluya dos o más clases de bancos celulares de células T por recolectar bancos celulares de células T construidas como se mencionó con anterioridad. Además, la colección de banco celular de la parte de construcción de células T puede proporcionarse, según sea necesario, con uno o más tipos de etiqueta, congelador, sistema crioprotector, software de gestión y similares. Los ejemplos específicos del congelador son los descritos con anterioridad. La construcción de una colección de células T de banco celular puede ser realizada por la misma entidad que la entidad que construye un banco celular de células T o entidades diferentes. La colección del

banco celular de células T puede contener un banco celular de células T construido por una entidad diferente.

[0169]

2-4-1. Selección del banco celular de células T

El sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa de seleccionar un banco celular de células T para producir un producto de células T que se proporcionará a partir de una colección de bancos celulares de células T que contienen bancos celulares de células T (en adelante también se denominará como "banco celular de la etapa de selección de células T"). En la presente memoria descriptiva, la parte constituida para ejecutar la etapa de selección de un banco celular de células T se denomina a veces una "parte de selección de banco celular de células T".

La etapa de selección del banco celular de células T se puede realizar mediante un método conocido. De acuerdo con el método, se puede seleccionar un banco celular de células T que contiene células T que expresan un receptor de células T apropiado en base al contenido del plan de producción del producto de células T que se va a proporcionar.

En una forma de realización de la presente invención, se obtiene información del sujeto de prueba y se puede seleccionar un banco de células T apropiado en base a la información. Por lo tanto, el sistema de provisión de la presente invención puede incluir una etapa para obtener información del sujeto de prueba (de aquí en adelante también se denominará "paso de obtención de información del sujeto de prueba") y/o una etapa de seleccionar un banco de células T adecuado para el sujeto de prueba. En lo que sigue, la parte constituida para ejecutar la etapa de obtención de información del sujeto de prueba se denomina a veces una "parte de obtención de información del sujeto de prueba".

La información del sujeto de prueba no está particularmente

limitada e incluye, por ejemplo, información genética (por ejemplo, información relacionada con el gen HLA, información genética anormal, etc.), resultado del diagnóstico, historial, historial de administración de medicamentos, edad, sexo, tipo de sangre, altura, peso corporal, y cuando el sujeto de prueba tiene un tumor, información del antígeno específico del tumor o asociado al tumor expresado en el tumor, del sujeto de prueba.

[0170]

3. Método para producir el producto de células T

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un producto de células T (en lo sucesivo denominado a veces como "el método de producción del producto de células T de la presente invención"). El método incluye (A) un proceso para preparar una célula T del banco de células T de la presente invención, (B) un proceso para introducir el gen CAR o el gen TCR exógeno en la célula T preparada, y (C) un proceso de expansión cultivando la célula T en la que se ha introducido el gen CAR o el gen TCR exógeno. El método de producción de un producto de células T de la presente invención puede incluir además (D) un proceso de congelación de las células T cultivadas en expansión. Además, también se proporciona un producto de células T producido mediante el método de producción de un producto de células T de la presente invención (en lo sucesivo, algunas veces denominado "el producto de células T de la presente invención"). Cada uno de los procesos mencionados con anterioridad puede ser realizado por la misma entidad o por diferentes entidades.

[0171]

3-1. Preparación de linfocitos T

El proceso (A) del punto 3 mencionado con anterioridad se puede realizar usando el banco celular de células T de la presente invención y de acuerdo con el método descrito en el

punto 1-3 mencionado con anterioridad.

[0172]

3-2. Introducción de ácido nucleico

El proceso (B) del punto 3 mencionado con anterioridad se puede realizar usando las células T preparadas por el método del 3-1 mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en los puntos 1-4 mencionados con anterioridad. Las células T utilizadas en el proceso (B) expresan preferentemente IL-15/IL-15R α . El tipo de ácido nucleico, explicaciones sobre CAR, TCR e IL-15/IL-15R α , definición de cada término, ejemplos específicos del antígeno dirigido por TCR y CAR, y similares son como se describe en el punto 1-1 antes mencionado. Por tanto, en una forma de realización, las células T contenidas en el método de producción de la reserva congelada de la presente invención, o las células T contenidas en la reserva congelada de células T de la presente invención pueden caracterizarse porque el CAR o TCR exógeno mencionado con anterioridad reconoce y se une al antígeno específico del tumor o al antígeno asociado al tumor del 1-1 mencionado con anterioridad.

[0173]

3-3. Cultivo de expansión

El proceso (C) del punto 3 mencionado con anterioridad se puede realizar usando las células T en las que se ha introducido un ácido nucleico mediante el método del punto 3-2 mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en los puntos 1-5 mencionados con anterioridad. El método de cultivo de expansión, los ejemplos específicos del compuesto usado en el cultivo de expansión, la concentración del compuesto en el medio, la definición de cada término y similares son como se describen en los puntos 1-5 mencionados con anterioridad. En una forma de realización, por lo tanto, el método de producción de la reserva congelada de la presente

invención puede incluir un proceso de cultivo de las células T mencionadas con anterioridad en presencia de un agonista de CD30.

[0174]

3-4. Congelamiento de células T

El proceso (D) del punto 3 mencionado con anterioridad se puede realizar usando la expansión de células T cultivadas por el método del punto 3-3 mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en el 1-2 mencionado con anterioridad.

[0175]

4. Método de construcción de la recolección de productos de células T

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para construir una colección de productos de células T que contiene dos o más tipos de productos de células T (en lo sucesivo, algunas veces denominado "método de construcción de la colección de productos de células T de la presente invención"), y el método puede incluir un proceso de recolección del producto de células T de la presente invención. Además, también se proporciona una colección de productos de células T construida mediante el método de construcción de la colección de productos de células T de la presente invención (en lo sucesivo a veces denominada "la colección de productos de células T de la presente invención"). El producto de células T que constituye la colección de productos de células T de la presente invención puede ser un producto de células T congelado. Desde el aspecto de la estabilidad de las células T, es preferible un producto de células T congelado.

[0176]

El proceso de recolección del producto de células T de la presente invención se puede realizar usando el producto de

células T de la presente invención y de acuerdo con el método descrito en el punto 1-7 mencionado con anterioridad. El producto de células T contenido en la colección de productos de células T puede ser producido por la misma entidad que la entidad que construye la colección de productos de células T, o producido por una entidad diferente. Por lo tanto, la colección de productos de células T puede contener un producto de células T producido por una entidad diferente.

[0177]

5. Método de producción del producto de células T

La presente invención también proporciona un método para producir un producto de células T (en lo sucesivo, a veces denominado "el método de producción del producto de células T de la presente invención"), y el método puede incluir un proceso de construcción de un banco celular maestro de T célula y/o un banco celular de trabajo de células T.

[0178]

Ejemplos específicos de células T, producto de células T, banco celular maestro, banco celular de trabajo y similares y la definición de los términos se describen en el punto 1-1 mencionado con anterioridad. Además, las células madre pluripotentes, las células T, el producto de células T, el banco celular maestro y el banco celular de trabajo mencionados con anterioridad se pueden producir y construir mediante, por ejemplo, el método descrito en los puntos 1 y 2 mencionados con anterioridad, y similares. El método de producción del producto de células T de la presente invención puede incluir (a) un proceso de diferenciación de células madre pluripotentes en células T, (b) un proceso de almacenamiento de células T diferenciadas, (c) un proceso de caracterización de las células T diferenciadas, (d) un proceso de preparación de células T a partir de la reserva celular, (e) un proceso de introducción de un ácido nucleico que

contiene el gen exógeno en una célula T, y/o (f) un proceso de expansión cultivando una célula T. Además, la célula T que se utilizará en el método de producción del producto de células T de la presente invención puede ser una célula T en la que se suprime la expresión de al menos un tipo de gen HLA. El gen HLA específico y la combinación, la definición de supresión de la expresión génica y un método de supresión y similares son los descritos en el punto 1-1 mencionado con anterioridad. Cada uno de los procesos mencionados con anterioridad puede ser realizado por la misma entidad o por diferentes entidades.

[0179]

El proceso (a) del punto 5 mencionado con anterioridad se puede realizar utilizando la célula madre pluripotente descrita en el punto 1-1 mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en los procesos (1) y (2) del 1-1 mencionado con anterioridad. La célula madre pluripotente mencionada con anterioridad es preferentemente una célula madre pluripotente inducida, más preferentemente una célula madre pluripotente inducida por humanos. Las células madre pluripotentes inducidas que se utilizarán para el método de construcción del banco celular de la presente invención y el banco de células T de la presente invención pueden establecerse mediante el método descrito en el punto 1-1 mencionado con anterioridad. El proceso (b) del punto 5 mencionado con anterioridad se puede realizar utilizando las células T diferenciadas en el mencionado proceso (1) y según el método descrito en los puntos 1-1 y 1-2 mencionados con anterioridad. El proceso (c) del punto 5 mencionado con anterioridad se puede realizar utilizando las células T diferenciadas por el mencionado proceso (1) y de acuerdo con el método descrito en el punto 2-2 mencionado con anterioridad. El proceso (d) mencionado con anterioridad se puede realizar

usando el material celular producido en el proceso (c) mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en el punto 1-3 mencionado con anterioridad.

[0180]

El proceso (e) del punto 5 mencionado se puede realizar utilizando las células T diferenciadas por el citado proceso (a), las células almacenadas en el citado proceso (b), las células T sometidas al análisis de propiedades en el citado proceso (c), o células T preparadas mediante el citado proceso (d) y de acuerdo con el método descrito en el punto 1-4 mencionado con anterioridad. Las células T usadas en el proceso (e) expresan preferentemente IL-15/IL-15R α . El tipo de ácido nucleico, explicaciones sobre CAR, TCR e IL-15/IL-15R α , definición de cada término, ejemplos específicos del antígeno dirigido por TCR y CAR, y similares son como se describe en el punto 1-1 antes mencionado. Por tanto, en una forma de realización, las células T contenidas en el método de producción de la reserva congelada de la presente invención, o las células T contenidas en la reserva congelada de células T de la presente invención pueden caracterizarse porque el CAR o TCR exógeno mencionado con anterioridad reconoce y se une al antígeno específico del tumor o al antígeno asociado al tumor del punto 1-1 mencionado con anterioridad.

[0181]

El proceso (f) del punto 5 mencionado con anterioridad se puede realizar utilizando las células T en las que se ha introducido un ácido nucleico mediante el proceso (e) mencionado con anterioridad y según el método descrito en el punto 1-5 mencionado con anterioridad. El método de cultivo de expansión, los ejemplos específicos del compuesto usado en el cultivo de expansión, la concentración del compuesto en el medio, la definición de cada término y similares son como se describen en el punto 1-5 mencionado con anterioridad. En una

forma de realización, por lo tanto, el método de producción del producto de células T de la presente invención puede incluir un proceso para estimular una célula T cultivando la célula en presencia de un agonista de CD30.

[0182]

6. Método de suministro del producto de células T

Además, la presente invención proporciona un método para proporcionar un producto de células T adecuado para un sujeto de prueba (en lo sucesivo, algunas veces denominado "el método de provisión de la presente invención"). Para proporcionar un producto de células T adecuado para un sujeto de prueba, se obtiene información del sujeto de prueba y se puede seleccionar un banco de células T apropiado y/o un producto de células T apropiado basándose en la información. Por lo tanto, el método de provisión de la presente invención incluye (p) un proceso para obtener información de un sujeto de prueba, y (q) un proceso para seleccionar un banco celular apropiado de células T y/o un producto de células T apropiado en base a la información obtenida del sujeto de prueba. Utilizando el banco celular seleccionado de células T, el proceso (e) y/o el proceso (f) en el punto 5 mencionado con anterioridad se llevan a cabo para producir un producto de células T y el producto de células T se puede proporcionar al sujeto de prueba. De acuerdo con el método de provisión de la presente invención, cuando un sujeto de prueba tiene un tumor, se obtiene información relacionada con un antígeno específico de tumor o antígeno asociado a tumor expresado en el tumor, y se puede seleccionar un producto de células T apropiado basándose en el mismo. Por lo tanto, el método de provisión de la presente invención incluye (x) un proceso de identificación de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a un tumor expresado en el tumor de un sujeto de prueba, y (y) un proceso de selección de un producto de células T que expresa un CAR o

un TCR exógeno que reconoce y se une al antígeno identificado de la colección de productos de células T de la presente invención. El (x) un proceso de identificación de un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a un tumor expresado en el tumor de un sujeto de prueba, y (y) un proceso de selección de un producto de células T que expresa un CAR o un TCR exógeno que reconoce y se une al antígeno identificado de la colección de productos de células T de la presente invención se engloban conceptualmente en (p) un proceso de obtención de información de un sujeto de prueba, y (q) un proceso de selección de un producto de células T apropiado en función de la información del sujeto de prueba. El tipo y definición de términos tales como célula T, producto de células T, sujeto de prueba y similares son los descritos en el punto 1-1 al 1-10 mencionados con anterioridad. Cada uno de los procesos mencionados con anterioridad puede ser realizado por la misma entidad o por diferentes entidades.

[0183]

El proceso (x) del punto 6 mencionado con anterioridad puede realizarse utilizando la muestra biológica del sujeto de prueba y de acuerdo con el método descrito en el punto 1-8 mencionado con anterioridad. Los ejemplos específicos de la muestra biológica del sujeto de prueba son los descritos en el punto 1-8 mencionado con anterioridad.

[0184]

El proceso (y) del punto 6 mencionado con anterioridad se puede realizar basándose en los resultados de identificación del proceso (x) mencionado con anterioridad y de acuerdo con el método descrito en el punto 1-9 mencionado con anterioridad. La explicación y definición de CAR y TCR, ejemplos específicos de antígeno específico de tumor y antígeno asociado a tumor, ejemplos específicos de los criterios de evaluación y similares se describen en el punto 1-1 y el punto 1-9

mencionados con anterioridad.

[0185]

Los ejemplos específicos del cáncer y el tumor que se van a prevenir o tratar con un producto de células T proporcionado por el método de provisión de la presente invención son los descritos en el punto 1-10 mencionado con anterioridad. Además, el método de cultivo y/o estimulación de las células T contenidas en el producto de células T mencionado con anterioridad, la vía de administración, la dosis, el tipo de sujeto de prueba y similares también se describen en el punto 1-1-10 mencionado con anterioridad.

[0186]

La presente invención se explica más específicamente mediante los siguientes ejemplos. El alcance de la presente invención no está limitado por los Ejemplos.

[Ejemplo]

[0187]

[Ejemplo 1]

1. Preparación de la célula iPS

Como célula iPS, se utilizaron células iPS (cepa Ff-I01s04: derivada de células mononucleares de sangre periférica de un individuo sano) proporcionadas por el Centro de Investigación y Aplicación de Células iPS (CiRA) de la Universidad de Kyoto. El cultivo de células iPS se realizó de acuerdo con el protocolo distribuido por CiRA, "Cultivo de células iPS humanas en condiciones libres de alimentador".

[0188]

2. Introducción del gen del receptor de células T (TCR) en la célula iPS

2-1. Introducción del gen WT1-TCR

Un gen en el que el gen TRB derivado de TAK1 y el gen TRA que codifica el TCR específico de WT1 restringido por HLA-A*24:02 suministrados por el profesor Masataka Yasukawa, Graduate

School of Medicine, Ehime University, están unidos por una secuencia P2A (WT1-TCR) se introdujo en células iPS. La transferencia de genes a las células iPS se realizó mediante la incorporación en el vector lentivirus CS-UbC-RfA-IRES2-hK01 suministrado por el Instituto de Investigación Física y Química e infectar las células iPS. A continuación, las células iPS en las que se ha introducido el gen WT1-TCR a veces se denominan "WT1 $\alpha\beta$ -iPSC".

[0189]

2-2. Introducción del gen V γ 9V δ 2-TCR

Se introdujo en células iPS un gen (V G9V δ 2TCR G115) en el que el gen TRG y el gen TRD que codifica el receptor de células T V γ 9V δ 2 derivado del clon de células T G115 5 se unieron mediante una secuencia P2A. V γ 9V δ 2TCR G115 es un oligo ADN sintetizado artificialmente que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 1) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 1 desde el N-terminal.

[0190]

[Tabla 1]

orden de N-terminal	gene	número de aminoácido
1	(G115 derivado de) TRG	315
2	P2A	22
3	(G115 derivado de) TRD	292

[0191]

Se eliminó una secuencia que codificaba el gen de resistencia a neomicina de pLVSIN-CMV Neo (Clontech), y se preparó un vector lentiviral usando pLVSIN-Ub en el que el promotor de CMV se reemplazó con el promotor de ubiquitina humana. Se incorporó un oligo ADN artificial que codifica V γ 9V δ 2TCR G115 sintetizado con anterioridad en el sitio de clonación múltiple del vector lentivirus pLVSIN-Ub. Utilizando el plásmido y la

línea celular Lenti-XTM 293T (Clontech) y Lenti-XTM Packaging Single Shots (VSV-G), se preparó un vector lentiviral. El vector de lentivirus preparado se utilizó para infectar las células iPS preparadas en el [Ejemplo 1], 1, mediante lo cual se introdujo el gen V γ 9V δ 2-TCR en las células iPS. A continuación, las células iPS en las que se ha introducido el gen V γ 9V δ 2TCR G115 se denominan a veces "V γ 9V δ 2-iPSC".

[0192]

[Ejemplo 2]

1. Diferenciación de células iPS en células progenitoras hematopoyéticas (HPC)

Para la diferenciación de células iPS en células progenitoras hematopoyéticas (HPC), se utilizó una población de células suspendidas diferenciadas según un método conocido (por ejemplo, métodos descritos en Cell Reports 2 (2012) 1722-1735 y WO 2017/221975). Específicamente, célula iPS, WT1 $\alpha\beta$ -iPSC y V γ 9V δ 2-iPSC obtenidas en el [Ejemplo 1] 1, [Ejemplo 1] 2-1 y [Ejemplo 1] 2-2 se sembraron respectivamente a 3×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos tratada con adhesión ultrabaja, se añadieron 10 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de bFGF, 15 ng/ml de VEGF, 2 μ M de SB431542 al medio EB (StemPro34 añadida con 10 μ g/ml de insulina humana, 5,5 μ g/ml de transferrina humana, 5 ng/ml de selenita de sodio, 2 mM de L-glutamina, 45 mM de α -monotioglicerol y 50 μ g/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico), y las células se cultivaron durante 5 días en condiciones de bajo oxígeno (5% de O₂). Luego, se añadieron 50 ng/ml de SCF, 30 ng/ml de TPO, 10 ng/ml de Flt3L y las células se cultivaron durante 5-9 días (- Día 14) para dar una población celular suspendida. El medio se cambió cada dos o tres días durante el período de cultivo. La población de células suspendidas que contiene HPC mencionada con anterioridad se tiñó usando el conjunto de anticuerpos de la Tabla 2. Las poblaciones de células que experimentaron la

tinción mencionada con anterioridad se sometieron a clasificación mediante FACS Aria.

[0193]

[Tabla 2]

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

[0194]

2. Introducción del gen V γ 9V δ 2-TCR en HPC

Un gen (V γ 9V δ 2TCR G115) en el que el gen TRG y el gen TRD que codifica el receptor de células T V γ 9V δ 2 derivado del clon de células T G115 $\gamma\delta$ se unieron mediante una secuencia P2A se introdujo en la fracción celular obtenida en [Ejemplo 2] 1. El gen se introdujo de la misma manera que en el [Ejemplo 1] 2-2. A continuación, la célula HPC en la que se ha introducido el gen V γ 9V δ 2TCR G115 en HPC se denomina a veces "V γ 9V δ 2-iHPC".

[0195]

[Ejemplo 3]

1. Diferenciación de HPC en células T

La fracción celular obtenida en el [Ejemplo 2] 1 y V γ 9V δ 2-iHPC obtenida en el [Ejemplo 2] 2 se diferenciaron en células linfoides de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, los métodos descritos en Journal of Leukocyte Biology 96 (2016) 1165-1175 y WO 2017/221975). Para ser específicos, la población de células progenitoras hematopoyéticas se sembró a 2000 células/pocillo en una placa de 48 pocillos recubierta con proteína quimérica recombinante h-DLL4/Fc (Sino Biological) y Retronectina (Takara Bio Inc.) y se cultivó condiciones de 5% de CO₂, 37 °C. El medio se cambió cada dos o tres días durante el período de cultivo. Como medio, medio

α MEM añadido con FBS al 15%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomicina, 55 μ M de 2-mercaptoetanol, 50 μ g/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico, 10 μ g/ml de insulina humana, 5,5 μ g/ml de transferrina humana, 5 ng/ml de selenito de sodio, 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de IL-7, 50 ng/ml de Flt3L, 100 ng/ml de TPO, 15 μ M de SB203580, 30 ng/ml de SDF-1 α . Las células se pasaron a una placa de 48 pocillos revestida de forma similar el día 7 y el día 14 desde el inicio del cultivo. Todas las células se recuperaron el día 21 desde el inicio del cultivo y se confirmó la presencia de fracciones de CD45(+), CD3(+) mediante un citómetro de flujo. Las células obtenidas se sembraron en una placa de 24 pocillos y se cultivaron en condiciones de CO₂ al 5%, 37 °C. Como medio, se usó medio α MEM añadido con FBS al 15%, 2 ml de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 ng/ml de estreptomicina, 50 ng/ml de 2-fosfato de ácido ascórbico, 10 μ g/ml de insulina humana, 5,5 μ g/ml de transferrina humana, 5 ng/ml de selenito de sodio, 500 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon UCHT1 o OKT3), 10 nM dexametasona (Fuji Pharma: 10171-H02H), 100 U/ml de IL-2, 10 ng/mL de IL-7. Todas las células se recuperaron el día 27 desde el inicio del cultivo (día 41). A continuación, una célula T diferenciada de la célula iPS obtenida en el [Ejemplo 1] 1 a veces se denomina "i $\gamma\delta$ TC", una célula T diferenciada de la WT1 $\alpha\beta$ -iPSC obtenida en el [Ejemplo 1] 2-1, a veces se denomina "iWT1 $\alpha\beta$ TC", una célula T diferenciada de V γ 9V δ 2-iPSC obtenida en el [Ejemplo 1] 2-2, A veces se denomina "V γ 9V δ 2-iTC", y una célula T diferenciada de V γ 9V δ 2-iHPC obtenida en el [Ejemplo 1] 2, a veces se denomina "V γ 9V δ 2-iHTC".

Se tiñó i $\gamma\delta$ TC usando el conjunto de anticuerpos que se muestra en la Tabla 3 (Figuras 3 y 4).

[0196]

[Tabla 3]

V δ 1 Myltenyi FITC
V δ 2 Myltenyi APC
γ δ TCR BD BV510
CD3 BioLegend APC/Cy7
α β TCR eBioscience FITC

[0197]

Con respecto a i γ δ TC, la expresión de CD3, V δ TCR, α β TCR, cadena TCR-V δ 1 y cadena TCR-V δ 2 en la superficie de la membrana celular se midió mediante un citómetro de flujo (Fig. 3 y 4).

[0198]

Con respecto a V γ 9V δ 2-iTC (Fig. 5) y V γ 9V δ 2-iHTC (Fig. 6), la expresión de CD3, V δ TCR, cadena TCR-V δ 1 y cadena TCR-V δ 2 en la superficie de la membrana celular se midió con un citómetro de flujo.

[0199]

[Ejemplo 4]

Cultivo de expansión de linfocitos T

1. Cultivo de expansión de i γ δ TC

1-1. Cultivo de expansión

El i γ δ TC obtenido en el [Ejemplo 3] se suspendió a 2.000.000 de células/ml en un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 4 a medio α -MEM que contenía 15% de FBS, y la suspensión se sembró en una placa que contenía anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y RetroNectin inmovilizados sobre el mismo y cultivados a 5% de CO₂/37 °C durante 3 días. Las células se recogieron de la placa el día 3 de cultivo y se midió el número de células usando NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 5 al medio α -MEM que contenía un 15% de FBS, añadido a una placa de 6 pocillos G-Rex (marca registrada) no solidificada (WILSONWOLF) y se

cultivó a 5% de CO₂/37 °C. A partir de entonces, se recogió una parte de las células de la placa de 4 a 6 veces en cualquiera de los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 de cultivo, y se midió el número de células utilizando NucleoCounter (marca registrada marca) NC-200. Las células se inmovilizaron en la placa de cultivo con anticuerpo anti-CD3 y RetroNectin mediante el siguiente método. Se añadieron a la placa un anticuerpo anti-CD3 (UCHT1, concentración final 3000 ng/ml) y RetroNectin (concentración final 150 µg/ml) disueltos en PBS a las concentraciones necesarias y la placa se dejó reposar durante la noche a 4 °C.

[0200]

1-2. Tasa de proliferación

La tasa de proliferación del número de células iγδTC cuando el cultivo de expansión de [Ejemplo 4] 1-1, se repitió 5 veces se muestra en la Fig. 7. iγδTC se puede cultivar en expansión al menos no menos de 10¹¹ veces, y pueden usarse como células T que constituyen el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T.

[0201]

[Tabla 4]

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina-transferrina-selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 µg/ml
IL-2	Peprotech	15 ng/ml
IL-7	Peprotech	10 ng/ml
IL-15	Peprotech	10 ng/ml
IL-21	Peprotech	20 ng/ml

IL-12	Merck	50 ng/ml
IL-18	MBL	50 ng/ml
TL-1A	Peprtech	50 ng/ml
Z-VAD-FMK	R&D	10 μ M
Anticuerpo CD30 humano	R&D	300 ng/ml

[0202]

[Tabla 5]

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina-transferrina-selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 μ g/ml
IL-2	Peprtech	15 ng/ml
IL-7	Peprtech	10 ng/ml
IL-15	Peprtech	10 ng/ml

[0203]

2. Cultivo de expansión de Vy9V δ 2-iTC

2-1. Cultivo de expansión

El Vy9V δ 2-iTC obtenido en el [Ejemplo 3] se suspendió a 2.000.000 de células/ml en un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 6 al medio α -MEM que contenía 15% de FBS, y la suspensión se sembró en una placa que contenía anticuerpo anti-CD3 (OKT3) y RetroNectin inmovilizados sobre el mismo y cultivados a 5% de CO₂/37 °C durante 3 días. Las células se recogieron de la placa el día 3 de cultivo y se midió el número de células usando

NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 5 al medio α -MEM que contenía un 15% de FBS, añadido a una placa de 6 pocillos G-Rex (marca registrada) no solidificada (WILSONWOLF) y se cultivó a 5% de CO₂/37 °C. A partir de entonces, se recogió una parte de las células de la placa de 4 a 6 veces en cualquiera de los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 de cultivo, y se midió el número de células utilizando NucleoCounter (marca registrada marca) NC-200. Las células se inmovilizaron en la placa de cultivo con anticuerpo anti-CD3 y RetroNectin mediante el método del [Ejemplo 4] 1-1.

[0204]

2-2. Tasa de proliferación

La tasa de proliferación del número de células V γ 9V δ 2-iTC cuando se repitió 5 veces el [Ejemplo 4] 2-1, se muestra en la Fig. 8. V γ 9V δ 2-iTC puede cultivarse por expansión al menos no menos de 10¹² veces, y pueden usarse como células T que constituyen el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T.

[0205]

[Tabla 6]

Nombre del producto	Fabricante	Concentración final
Suplementos de insulina-transferrina-selenio	Invitrogen	1 x
2-fosfato de ácido ascórbico	Sigma	50 μ g/ml
IL-2	Peptotech	15 ng/ml
IL-7	Peptotech	10 ng/ml

IL-15	Peprotech	10 ng/ml
IL-21	Peprotech	20 ng/ml
IL-12	Merck	50 ng/ml
IL-18	MBL	50 ng/ml
TL-1A	Peprotech	50 ng/ml
Z-VAD-FMK	R&D	10 μ M

[0206]

3. Cultivo de expansión de WT1 $\alpha\beta$ -iTc

3-1. Cultivo de expansión

El iWT1 $\alpha\beta$ Tc obtenido en el [Ejemplo 3] se suspendió a 2.000.000 de células/ml en un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 6 a medio α -MEM que contenía 15% de FBS, y la suspensión se sembró en una placa que contenía anticuerpo anti-CD3 (OKT3) y RetroNectin inmovilizados sobre el mismo y cultivados a 5% de CO₂/37 °C durante 3 días. Las células se recogieron de la placa el día 3 de cultivo y se midió el número de células usando NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 5 al medio α -MEM que contenía un 15% de FBS, añadido a una placa de 6 pocillos G-Rex (marca registrada) no solidificada (WILSONWOLF) y se cultivó a 5% de CO₂/37 °C. Posteriormente, se recogió una parte de las células de la placa de 4 a 6 veces en cualquiera de los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17 de cultivo, y se midió el número de células utilizando NucleoCounter (marca registrada) NC-200. Las células se inmovilizaron en la placa de cultivo con anticuerpo anti-CD3 y RetroNectin mediante el siguiente método. Se añadieron a la placa un anticuerpo anti-CD3 (OKT3, concentración final 3000 ng/ml) y RetroNectin

(concentración final 150 µg/ml) disueltos en PBS a las concentraciones necesarias y la placa se dejó reposar durante la noche a 4 °C.

[0207]

3-2. Tasa de proliferación

La tasa de proliferación del número de células iWT1αβTC cuando el cultivo de expansión de [Ejemplo 4] 3-1, se repitió 4 veces se muestra en la Fig. 9. iWT1αβTC se puede cultivar en expansión al menos no menos de 10¹⁰ veces, y pueden usarse como células T que constituyen el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T.

[0208]

[Ejemplo 5]

1. Construcción del banco celular maestro de células T

El medio de cultivo de células T obtenido en el [Ejemplo 4] se reemplaza con una solución crioprotectora (CryoStor CS10) que contiene un agente crioprotector y se distribuye en una pluralidad de recipientes de almacenamiento (viales estériles (viales de polímero (vial cerrado con AT))). Las células T se congelan colocando el recipiente que contiene las células T en un congelador. Como congelador se utiliza un programa de congelación, CryoMed (Thermo Fisher). Al almacenarlo, se construye un banco celular maestro congeladas de células T.

[0209]

2. Construcción del banco celular de trabajo de células T

Se recupera un recipiente que contiene células T del banco celular maestro congeladas de células T del [Ejemplo 5] 1. El recipiente se sumerge en un baño de agua a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 15 segundos para descongelar las células T. Las células obtenidas por descongelación se suspenden en una cantidad apropiada de un medio que contiene la citoquina que se muestra en la Tabla 5, se añaden a una placa de 6 pocillos (WILSONWOLF) y se cultivan a 5% de CO₂/37

°C. Después de cultivar durante 3 días a partir del día 1, las células T se cultivan por expansión mediante el método del [Ejemplo 4], se descongelan de la misma manera que se describe con anterioridad y se almacenan para construir un banco de células T de trabajo.

[0210]

3. Análisis de la propiedad y evaluación de la calidad

De la misma manera que en el [Ejemplo 5] 2, se recupera un recipiente que contiene células T del banco celular maestro de células T y/o del banco celular de trabajo de células T, y las células T se descongelan. Las células T obtenidas se someten a análisis de propiedades y evaluación de calidad.

[0211]

4. Construcción de colección de células T en banco celular

Se recolectan varios tipos de bancos celulares maestros de células T obtenidos en el [Ejemplo 5] 1, se etiquetan de manera que se pueda distinguir y almacenar el tipo de banco celular maestro de células T, por lo que se construido.

[0212]

[Ejemplo 6]

1. Preparación de células T

De la misma manera que en el [Ejemplo 5] 2, se recogió un recipiente del banco celular maestro de células T y/o del banco celular de trabajo de células T y se descongelaron las células T. Las células T obtenidas por descongelación se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio que contenía citoquina que se muestra en la Tabla 5, se añadieron a una placa de 6 pocillos y se cultivaron a 5% de CO₂/37 °C. Después de cultivar durante 3 días a partir del día 1, las células se suspendieron a 2.000.000 de células/ml en un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 4 o en la Tabla 6 al medio α -MEM que contiene 15% de FBS, sembrado en una placa que contiene anticuerpo anti-

CD3 (UCHT1 o OKT3) y RetroNectin inmovilizados sobre el mismo y cultivados a 5% de CO₂/37 °C durante 3 días. Las células se recogieron de la placa el día 3 de cultivo y se midió el número de células usando NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 5 al medio α -MEM que contenía 15% de FBS, se agregaron a un matraz de cultivo celular no solidificado (25 cm² o 75 cm²) y se cultivaron al 5% CO₂/37 °C durante un día para preparar las células T.

[0213]

2. Introducción de ácido nucleico en células T

2-1. Introducción del gen anti-CD19-CAR

Como gen que codifica anti-CD19-CAR, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 2) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 7 desde el N-terminal.

[0214]

[Tabla 7]

orden de N-terminal	gen	número de aminoácido
1	secuencia principal de la cadena pesada de inmunoglobulina	22
2	región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (FMC63)	104
3	Enlazador GGGGS	15
4	región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (FMC63)	120
5	Secuencia derivada de CD8 (incluida la región transmembrana)	83

6	región de dominio intracelular de CD28	41
7	región del dominio intracelular de 4-1BB	47
8	región de dominio intracelular de CD3 ζ	112

[0215]

El oligo ADN artificial sintetizado en lo anterior se incorporó en el sitio de clonación múltiple del vector retrovirus pMEI-5. La producción del vector del virus se subcontrató a Unitech. El iWT1 α β TC producido en el [Ejemplo 3] se infectó con el vector de retrovirus producido que lleva un gen que codifica anti-CD19-CAR, por lo que las células anti-CD19-CART derivadas de células iPS (en lo sucesivo a veces denominadas "CD19iWT1 α β CARTC").

[0216]

2-2. Introducción del gen anti-BCMA-CAR

Como gen que codifica anti-BCMA-CAR, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 3) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 8 desde el N-terminal.

[0217]

[Tabla 8]

orden de N-terminal	gen	número de aminoácido
1	secuencia principal de la cadena pesada de inmunoglobulina	19
2	región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-BCMA	111
3	enlazador	18
4	región variable de anti-BCMA-anti-cadena de peso corporal	117
5	secuencia derivada de CD8	86

	(incluida la región transmembrana)	
6	región de dominio intracelular de CD28	41
7	región del dominio intracelular de 4-1BB	47
8	región de dominio intracelular de CD3ζ	112

[0218]

El oligo ADN artificial sintetizado en lo anterior se incorporó en el sitio de clonación múltiple del vector retrovirus pMEI-5. La producción del vector del virus se subcontrató a Unitech. El iWT1αβTC producido en el [Ejemplo 3] se infectó con el vector retroviral producido que lleva un gen que codifica anti-BCMA-CAR, por lo que células anti-BCMA-CART derivadas de células iPS (en lo sucesivo a veces denominadas "BMCAiWT1αβ CARTC").

[0219]

2-3. Introducción del gen anti-CD19-CAR que contiene el dominio intracelular derivado de CD30

Como gen anti-CD19-CAR que contiene dominio intracelular derivado de CD30, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 4) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 9 desde el N-terminal.

[0220]

[Tabla 9]

orden de N-terminal	gen	número de aminoácido
1	secuencia principal de la cadena pesada de inmunoglobulina	22
2	región variable de la cadena	104

	ligera del anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	
3	enlazador GGGGS	15
4	región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (FMC60)	120
5	secuencia derivada de CD8 (incluida la región transmembrana)	83
6	región de dominio intracelular de CD28	41
7	región de dominio intracelular (SEQ ID NO: 6) de CD30	87
8	región de dominio intracelular de CD3 ζ	112

[0221]

Se incorporó un oligo ADN artificial sintetizado con anterioridad en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pMY. Usando células FLYRD18 para la producción de vectores de retrovirus, se produjo un vector de virus. WT1 $\alpha\beta$ -iTc producido en el [Ejemplo 1], 3, se infectó con el vector de retrovirus producido que lleva un gen anti-CD19-CAR que contiene un dominio intracelular derivado de CD30, por lo que se produjo un dominio intracelular derivado de CD30 que contenía células anti-CD19-CART derivadas de células iPS (en lo sucesivo a veces denominado "CD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTC").

[0222]

2-4. Introducción del gen anti-CD19-CAR

Como gen que codifica anti-CD19-CAR, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 5) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 10 desde el N-terminal.

[0223]

[Tabla 10]

orden de N-terminal	gen	número de aminoácido
1	secuencia principal de la cadena pesada de inmunoglobulina	22
2	región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (FMC63)	104
3	enlazador GGGGS	15
4	región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (FMC63)	120
5	secuencia derivada de CD8 (incluida la región transmembrana)	83
6	región del dominio intracelular de 4-1BB	47
7	región de dominio intracelular de CD3 ζ	112

[0224]

Se incorporó un oligo ADN artificial sintetizado con anterioridad en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pMY. Usando células FLYRD18 para la producción de vectores de retrovirus, se produjo un vector de virus. $\text{i}\gamma\delta\text{TC}$ producido en el [Ejemplo 3] se infectó con el vector retroviral producido que lleva un gen que codifica anti-CD19-CAR, por lo que produjo la célula anti-CD19-CART derivada de células iPS (en lo sucesivo, algunas veces denominada "CD19 $\text{i}\gamma\delta\text{CARTC}$ ").

[0225]

[Ejemplo 7]

1. Actividad citotóxica, etc. de las células T

1-1. Actividad citotóxica de CD19iWT1 α β CARTC y BMCAiWT1 α β CARTC

Se evaluó la actividad citotóxica de CD19iWT1 α β CARTC y BMCAiWT1 α β CARTC obtenida en el [Ejemplo 6] 2-1 y 2-2 contra la célula cancerosa Raji positiva para CD19 y la célula cancerosa H929 positiva para BCMA, respectivamente. Se mezcló CD19iWT1 α β CARTC o iWT1 α β TC en una proporción de 16 veces con respecto a la célula Raji. La actividad citotóxica de CD19iWT1 α β CARTC se evaluó basándose en la muerte de la célula diana 2 horas más tarde. Además, BMCAiWT1 α β CARTC o iWT1 α β TC se mezcló en una proporción de 16 veces con respecto a la célula H929. La actividad citotóxica de BMCAiWT1 α β CARTC se evaluó basándose en la muerte de la célula diana 2 horas después. Se demostró que CD19iWT1 α β CARTC y BMCAiWT1 α β CARTC tienen actividad citotóxica contra células cancerosas Raji positivas para CD19 y células cancerosas H929 positivas para BCMA, respectivamente, y que se pueden producir dos tipos de CART a partir del mismo iWT1 α β TC (Fig. 10).

[0226]

1-2. Actividad citotóxica de CD19-CD30-iWT1 α β CARTC

La actividad citotóxica de CD19-CD30-iWT1 α β CARTC obtenida en el [Ejemplo 6] 2-3 se evaluó frente a células cancerosas Raji positivas para CD19. Se mezcló CD19-CD30-iWT1 α β CARTC en una proporción de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 veces con respecto a la célula Raji. La actividad citotóxica de CD19-CD30-iWT1 α β CARTC se evaluó basándose en la muerte de la célula diana 2 horas después. Se demostró que CD19-CD30-iWT1 α β CARTC tiene actividad citotóxica contra células cancerosas Raji positivas para CD19 y que pueden producirse diferentes CART a partir de iWT1 α β TC (Fig. 11).

[0227]

1-3. Actividad citotóxica de CD19i γ δ CARTC

Se evaluó la actividad citotóxica de CD19i γ δ CARTC obtenida en

el [Ejemplo 6], 2-4. Usando células Raji positivas para CD19 y células CCRF-CEN negativas para CD19 como células diana, se mezcló CD19iγδCARTC en una proporción de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 veces con respecto a la célula diana. La actividad citotóxica de CD19iγδCARTC se evaluó basándose en la muerte de la célula diana 2 horas más tarde. Se demostró que CD19iγδCARTC tiene actividad citotóxica contra células Raji positivas para CD19, no tiene actividad citotóxica contra células CCRF-CEN CD19 negativas y tiene actividad citotóxica específica de antígeno (Fig. 12).

[0228]

[Ejemplo 8]

1. Introducción del gen anti-CD19-CAR y del gen IL-15Rα/IL-15
Como gen de IL-15Rα/IL-15, se sintetizó artificialmente un oligo ADN que codifica un polipéptido (SEQ ID NO: 7) diseñado para alinearse en el orden mostrado en la Tabla 11 desde el N-terminal.

[0229]

[Tabla 11]

orden de N-terminal	gen	número de aminoácido
1	secuencia principal 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

[0230]

Se incorporó un oligo ADN artificial sintetizado con anterioridad en el sitio de clonación múltiple del vector de retrovirus pMY. Usando células FLYRD18 para la producción de

vectores de retrovirus, se produjo un vector de virus. $\gamma\delta$ TC y V γ 9V δ 2-iTC producidos en el [Ejemplo 3] se infectaron con el vector de retrovirus producido que lleva el gen IL-15 α /IL-15 y el vector de retrovirus que lleva un gen anti-CD19-CAR y producido en [Ejemplo 6] 2-4, por lo que se produjeron respectivamente CD19/IL15i $\gamma\delta$ CARTC y CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC.

[0231]

[Ejemplo 9] 1. Producto de células T

1-1. Cultivo de expansión de células T (CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC)
El CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC obtenido en el [Ejemplo 8] se suspendió a 2.000.000 de células/ml en un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 6 al medio 15-MEM que contenía 15% de FBS, y la suspensión se sembró en una placa que contenía anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) y RetroNectin inmovilizados sobre el mismo y cultivados a 5% de CO₂/37 °C durante 3 días. Las células se recogieron de la placa el día 3 de cultivo y se midió el número de células usando NucleoCounter (marca comercial registrada) NC-200 (ChemoMetec). Las células se suspendieron en una cantidad apropiada de un medio obtenido mediante la adición de la citoquina que se muestra en la Tabla 5 al medio α -MEM que contenía un 15% de FBS, añadido a una placa de 6 pocillos G-Rex (marca registrada) no solidificada (WILSONWOLF) y se cultivó a 5% de CO₂/37 °C. Posteriormente, se recogió una parte de las células de la placa de 4 a 6 veces en cualquiera de los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17 de cultivo, y se midió el número de células utilizando un hemocitómetro. Las células se inmovilizaron en la placa de cultivo con anticuerpo anti-CD3 y RetroNectin mediante el siguiente método. Se añadieron a la placa un anticuerpo anti-CD3 (UCHT1, concentración final 3000 ng/ml) y RetroNectin (concentración final 150 μ g/ml) disueltos en PBS a las concentraciones necesarias y la placa se dejó reposar durante la noche a 4 °C.

[0232]

1-2. Tasa de proliferación

La tasa de proliferación del número de células CD19/IL15iVγ9Vδ2CARTC cuando el cultivo de expansión de [Ejemplo 9] 1-1. Se repitió 3 veces se muestra en la Fig. 13. CD19/IL15iVγ9Vδ2CARTC podría ser expansión cultivado al menos no menos de 10^9 veces.

[0233]

De esta manera, las células CAR-T pueden cultivarse por expansión y proporcionarse desde el banco celular maestro de células T y/o el banco celular de trabajo de células T para producir una gran cantidad de producto de células T (por ejemplo, producto de células CAR-T). Las diversas células T cultivadas en expansión se llenan en un recipiente de almacenamiento apropiado (vial estéril, bolsa de transfusión de sangre y similares), el recipiente se etiqueta y empaqueta para producir un producto de células T.

[0234]

1-3. Congelación del producto de células T

Un recipiente que contiene diversas células T cultivadas en expansión se congela de la misma manera que en el [Ejemplo 5] 1, para producir un producto de células T congelado.

[0235]

1-4. Construcción de la colección de productos de células T

Una colección de productos de células T se construye etiquetando los productos de células T congelados obtenidos con anterioridad de modo que se pueda distinguir el tipo de los mismos y almacenándolos.

[0236]

[Ejemplo 10]

1. Identificación del antígeno

Una muestra biológica, como una sección de tejido tumoral, un fluido corporal (por ejemplo, Sangre, suero, plasma, etc.) que

puede contener células tumorales, y similares, se recoge de un sujeto de prueba, se extrae ARNm de la muestra y ADNc se sintetiza según sea necesario a partir del ARNm y se identifica usando el ADNc y un método de amplificación de ácido nucleico y/o un método de detección de ácido nucleico como PCR digital (por ejemplo, ddPCR), RT-PCR, biochip (por ejemplo, microarray), RNAseq, y similares.

[0237]

2. Selección del producto de células T

Basado en el material (soporte de papel o soporte de datos electrónico) que muestra el resultado de identificación en el [Ejemplo 10] 1, un producto de células T que contiene células T que expresan un CAR o un TCR exógeno que reconoce y se une al antígeno identificado se selecciona de una lista de productos de células T preparada de antemano.

[0238]

[Ejemplo 11]

1. Número de días de supervivencia que prolongan el efecto de CD19/IL15 γ δCARTC

Se trasplantaron 5×10^5 células Nalm6 (ATCC) a ratones NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) (Instituto Central de Animales Experimentales, hembra, 7-8 semanas de edad) de la vena de la cola para preparar ratones de xenoinjerto Nalm6. El día 4 después del trasplante, se administró una suspensión de CD19/IL15 γ δCARTC (5×10^6 (células)) en 0,1 ml de tampón HBSS o una cantidad igual de tampón HBSS desde la vena de la cola, y el número de días de se confirmó la supervivencia. Todos los ratones trasplantados con células cancerosas Nalm6 positivas para CD19 a través de la vena de la cola murieron en 3 semanas en el grupo de administración de control, mientras que todos los ratones sobrevivieron durante al menos 6 semanas en el grupo de administración de CD19/IL15 γ δCARTC (Fig. 14).

[0239]

2. Efecto antitumoral de CD19/IL15iVγ9Vδ2CARTC

Se trasplantaron 5×10^5 células Nalm6 que expresan luciferasa (ATCC) a ratones NOD/Shi-scid, IL-2RγKO (NOG) (Instituto Central de Animales Experimentales, hembra, 7-8 semanas de edad) de la vena de la cola para preparar Ratones de xenoinjerto Nalm6 que expresan luciferasa. El día 4 después del trasplante, una suspensión de CD19/IL15iVγ9Vδ2CARTC (10^7 (células)) obtenida en el [Ejemplo 6], 1-2, en 0,2 ml de tampón HBSS o una cantidad igual de tampón HBSS se administró desde la vena de la cola y se confirmó el número de días de supervivencia. Todos los ratones trasplantados con células cancerosas Nalm6 positivas para CD19 a través de la vena de la cola murieron en 3 semanas en el grupo de administración de control, mientras que todos los ratones sobrevivieron durante al menos 6 semanas en el grupo de administración de CD19/IL15iγδCARTC (Fig. 15).

[APLICABILIDAD INDUSTRIAL]

[0240]

De acuerdo con la presente invención, un sistema para proporcionar un producto de células T alogénicas de alta calidad listo para usar (en particular, varios tipos de productos de células CAR-T), que puede reducir los costos humanos, de tiempo y financieros y minimizar la diferencia entre lotes, y se proporciona un método para proporcionarlo. El producto de células T así proporcionado es útil para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, tumores y similares.

[0241]

Esta solicitud se basa en una solicitud de patente N.º 2019-212718 presentada en Japón (fecha de presentación: 25 de noviembre de 2019), cuyo contenido se incorpora en su totalidad al presente.