

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 817**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09773177 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2311470**

Titulo: **Método para la inducción simultánea de CTL y células H**

30 Prioridad:

01.07.2008 JP 2008172797

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

24.06.2015

73 Titular/es:

**MEDINET CO., LTD. (100.0%)
Usui Bldg 9F 2-5-14, Shin-Yokohama Kohoku-ku
Yokohama-shi
Kanagawa 222-0033, JP**

72 Inventor/es:

**NIEDA, MIE;
TOMIYAMA, MAI y
MUTO, MASATO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 538 817 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la inducción simultánea de CTL y células $\gamma\delta$ T

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una técnica para cultivar simultánea y eficazmente CTL específicos de antígeno y células $\gamma\delta$ T eficaces en el tratamiento del cáncer. También se desvela en el presente documento el uso farmacéutico de las células cultivadas con la técnica de cultivo.

10

Técnica antecedente

Recientemente, la terapia inmunocelular se enfoca como una nueva terapia para enfermedades intratables incluyendo el cáncer. La terapia inmunocelular consiste en recolectar y activar los inmunocitos del propio paciente, particularmente los glóbulos blancos sanguíneos antes de reintroducirlos en el paciente para aumentar artificialmente el poder inmunizante. Esta terapia tiene la ventaja de que reduce los efectos secundarios en comparación con el tratamiento anticáncer con fármacos y similares.

15

Como terapia inmunocelular, ya está disponible la terapia con linfocitos autólogos activados que implica la activación de linfocitos no específicos de antígeno *in vitro* con una linfoquina y luego se devuelvan al cuerpo; sin embargo, existe la necesidad de que se disponga de una terapia que utilice linfocitos T citotóxicos (de aquí en adelante designados como CTL) que tengan una actividad citotóxica más fuerte y reconozcan específicamente y afecten a una lesión.

20

En el presente documento, como una terapia que se está intentado actualmente que utiliza los CTL, se adopta un método, por ejemplo, que implica la administración directa de un péptido antigénico del cáncer o similar a un paciente, sin embargo, en este caso, la capacidad del mismo para inducir CTL se puede mejorar debido a que el paciente a menudo tiene una inmunidad deficiente. En consecuencia, hay una terapia de vacunación con células dendríticas o similares que implica poner en contacto un antígeno con células de presentación de antígenos, por ejemplo células dendríticas (de aquí en adelante designadas con DC), o similares y por lo tanto que produzcan que las células presenten con fuerza el antígeno para inducir los CTL específicos del antígeno de la enfermedad por las DC en el cuerpo.

25

30

Algunos métodos actuales típicos para inducir los CTL específicos de antígeno se muestran a continuación como ejemplos.

35

Por ejemplo, en los documentos no patente 1 y 2, se añaden 9-meros peptídicos tales como un epítipo para un antígeno de una enfermedad particular a las células mononucleares de sangre periférica para intentar la inducción de CTL a partir de estas. Además, en los documentos no patente 3 y 4, se obtienen DC de las células mononucleares de sangre periférica y se añade un antígeno peptídico a las mismas para que se produzca una función de presentación de antígeno; las células T positivas a CD8 separadas de los linfocitos de la sangre periférica se cultivan junto con las DC resultantes para inducir CTL específicos del antígeno de la enfermedad.

40

Además, en el documento no patente 5, se lleva a cabo la vacunación utilizando DC que se obtienen de células hematopoyéticas precursoras y un antígeno peptídico y luego las DC derivadas de monocitos a las que se ha añadido el antígeno se co-cultivan con las células T positivas a CD8 separadas de las células mononucleares de sangre periférica para inducir CTL específicos del antígeno.

45

Como se puede apreciar de sus usos en los ejemplos anteriores, las células dendríticas tienen una alta capacidad de presentar antígenos y capacidad de inducir CTL específicos del antígeno de la enfermedad entre otras células presentadoras de antígeno, por lo tanto, el desarrollo tecnológico para obtenerlas está en marcha.

50

Sin embargo, para obtener células dendríticas para la vacunación con células dendríticas, es necesario típicamente recolectar sangre periférica humana, separar las células llamadas monocitos de ella, y cultivarlas tras la adición de IL-4, GM-CSF y similares. Este proceso es engorroso y hasta ahora tiene el problema de que el número y función de las células cultivadas varía dependiendo de la experiencia de un técnico en cultivos celulares.

55

Las células $\gamma\delta$ T que se activan por un antígeno no peptídico, son células responsables de la inmunidad natural, se ha descubierto recientemente que estas células ejercen una actividad citotóxica no restringida por el MHC (actividad no específica) sobre las células cancerosas. Por lo tanto, se investiga la inmunoterapia que utiliza la fuerte actividad antitumoral de estas células $\gamma\delta$ T.

60

Debido a que las células $\gamma\delta$ T se activan por el reconocimiento de un antígeno no peptídico, se pueden estimular, por ejemplo, con una alquilamina o un bifosfonato como antígenos no peptídicos para su activación y/o proliferación; las células $\gamma\delta$ T separadas de la sangre periférica se han producido para reconocer antígenos no peptídicos *in vitro* para

65

llevar a cabo estudios de activación y/o proliferación de las mismas (por ejemplo, documento no patente 6).

Sin embargo, un problema de las células $\gamma\delta T$, que están presentes en general en una cantidad de solo el 1 a 5% de la sangre periférica, es que no se puede asegurar la pureza y el número de células $\gamma\delta T$ suficiente para el tratamiento médico si se recolecta una pequeña cantidad de sangre y después se activan y/o proliferan las células recolectadas. El aumento de la cantidad de sangre recolectada de un paciente para asegurar la pureza y cantidad de células $\gamma\delta T$ suficientes para el tratamiento médico también supone un problema que impone una gran carga al paciente.

El documento patente 1 también desvela un método que implica la adición de un bifosfonato a las células mononucleares de sangre periférica para activar y proliferar las células $\gamma\delta T$.

Por lo tanto el cultivo y uso de células más eficaces son muy importantes para la terapia inmunocelular; todavía se está llevando a cabo el desarrollo de una amplia variedad de métodos y técnicas.

Además, se cultiva mayoritariamente un tipo celular bajo las condiciones presentes y se utiliza para el tratamiento médico en terapia inmunocelular, sin embargo, probablemente se podrían mezclar varias células, dadas las características que se han descrito anteriormente y utilizarse en un tratamiento médico, por ejemplo CTL específicos de antígeno de enfermedad que se dirigen para atacar células o tejidos de manera restringida al MHC, por ejemplo, específicamente a un antígeno presente en el MHC clase I y las células $\gamma\delta T$ que atacan células o tejidos de una manera no restringida al MHC.

Sin embargo, para cultivar una pluralidad de tipos de células inmunitarias para el tratamiento médico, las etapas de cultivo tienen que llevarse a cabo concurrentemente para varios de los tipos en práctica. Las condiciones de cultivo adecuadas para cada tipo de células son distintas entre sí, si se utiliza un método de cultivo convencional adecuado para un tipo de células, sería muy difícil, por ejemplo, cultivar simultánea y eficazmente cantidades suficientes de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ para que ejerzan un efecto terapéutico, y tales métodos de cultivo e inducción eficaces aún no se ha perfeccionado.

Listado de citas

Documentos de Patente

Documento de Patente 1: WO 2006/006720

Documentos No patente

Documento No patente 1: Sugiyama H. et al. Cancer Immunol. Immunother. Dic. 2002; 51 (II-12):614-20. Epub. 18 Oct., 2002.

Documento No patente 2: Appella E. et al. J. Immunol. 1 Mar., 1995; 154(5):2257-65.

Documento No patente 3: Fujita S. et al. Blood 1 Jun., 2000; 95(1):286-93.

Documento No patente 4: Yasukawa M. et al. Clin. Cancer Res. Ago 2002; 8(8):2626-31.

Documento No patente 5: Palucka AK. et al. J. Exp. Med. 7 de Jun, 2004; 199(11): 1503-11. Epub Jun 1, 2004.

Documento No patente 6: Fumi Miyagawa et al. The Journal of Immunology 2001; 166(9):5508-5514.

Sumario de la invención

Problema técnico

En vista de las circunstancias descritas anteriormente, la presente invención tiene como objetivo la inducción y cultivo simultáneamente y eficazmente de una cantidad suficiente de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ para que ejerzan un efecto terapéutico en un cultivo de una etapa.

Solución del problema

Los presentes inventores han llevado a cabo varios estudios para resolver estos problemas y han creado la siguiente invención. La presente invención es de la siguiente manera:

(1) Un método *in vitro* para producir una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$, que se caracteriza porque comprende las etapas de adición de un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato a una población de células mononucleares de sangre periférica; (2) El método para producir una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con el punto (1), en el que la etapa de adición del antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato se lleva a cabo el primer día del cultivo (3) El método de producción de una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con el punto (1) o (2), en el que el aminobifosfonato es ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido zolendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los

mismos; (4) El método de producción de una población mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3), en el que el antígeno de enfermedad es un antígeno del cáncer; (5) El método de producción de una población mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en el que el antígeno de enfermedad y el aminobifosfonato se añaden simultáneamente; y (6) Un método para producir un agente farmacéutico que comprende la producción de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ que se obtienen por el método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5).

Como resultado de los estudios, los presentes inventores han descubierto que las células $\gamma\delta T$ de la sangre periférica activadas por un aminobifosfonato proliferan y estas células $\gamma\delta T$ que se activan y proliferan muestran una función como las APC (células presentadoras de antígeno) para presentar un antígeno de enfermedad y también promueven la inducción de CTL específicos de antígeno de enfermedad, consiguiendo de esta manera la presente invención.

Efectos ventajosos de la invención

En los métodos convencionales de cultivo e inducción de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$, las células que se desean se obtienen por medio de varias etapas y luego se empiezan a cultivar; sin embargo, la presente invención puede proporcionar CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ simultánea y eficazmente en un cultivo de una etapa sin separación de las células de la sangre periférica e incluso una población celular que contiene un gran número de células excelentes en el efecto terapéutico. La población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ que se obtiene por este método de inducción hace posible la provisión de un tratamiento médico que tiene un efecto mayor que el tratamiento médico convencional que administra células inmunitarias únicas como agente farmacéutico.

Particularmente, la inducción de CTL anteriormente necesitaba las etapas de: (1) separar las células mononucleares de la sangre; (2) añadir una citoquina para inducir células dendríticas; (3) pulsar las células dendríticas con un antígeno; y (4) co-cultivar las células dendríticas pulsadas con antígeno y los linfocitos para inducir CTL. Sin embargo, el uso de la presente invención hace posible la omisión de la etapa de inducción de células dendríticas, lo que reduce la carga de trabajo, también puede disminuir el riesgo de contaminación, y puede además acortar el periodo (aproximadamente 7 días) durante el que se inducen las células dendríticas.

Descripción de las realizaciones

Se describirán a continuación las realizaciones de la presente invención.

<Primera realización: Método para producir una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con la presente invención>

El método para producir una población mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con la presente invención (de aquí en adelante también denominada simplemente como "el método de inducción de la presente invención") se caracteriza porque comprende las etapas de añadir un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato a una población de células mononucleares de sangre periférica y cultivar las células mononucleares periféricas resultantes.

Mientras que era muy difícil convencionalmente obtener CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ en la misma etapa de cultivo en cantidades tales que fueran eficaces en el tratamiento médico, el método de inducción de la presente invención hace posible que se obtengan simplemente este tipo de células con alta eficacia pasando a través de las etapas anteriores.

De acuerdo con el método de inducción de la presente invención, las células $\gamma\delta T$ de la sangre periférica se activan por un aminobifosfonato y proliferan y estas células $\gamma\delta T$ que se activan y proliferan también muestran una función como APC que presentan un antígeno de enfermedad e inducen CTL específicos de antígeno de enfermedad. Además, las células $\gamma\delta T$ que tienen una función como APC no solo actúan simplemente como APC, sino que también siguen proliferando incluso tras la proliferación de los CTL específicos de antígeno de enfermedad haciendo posible una cantidad suficiente de ambos tipos celulares para hacer que se obtenga un efecto terapéutico.

El procedimiento específico del método de inducción de la presente invención se describirá a continuación:

1) Se recolecta la sangre para proporcionar sangre periférica. La cantidad de la misma que se necesita es de 15 a 25 ml. Tal cantidad hace posible que la sangre sea adecuada para cultivarse. Sin embargo, la cantidad suficiente de sangre no está limitada a este intervalo, y debido a que una cantidad mayor de recolección de sangre aumenta el número de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ recolectados, es preferible que se recolecte una cantidad mayor de sangre siempre que la carga sobre el donante por la recolección de esta sangre sea baja.

2) Se obtienen las células mononucleares de sangre periférica, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de

densidad. El número de células mononucleares periféricas que se pueden obtener es de 1 a 2×10^7 en 5 a 25 ml de sangre periférica.

3) Las células mononucleares de sangre periférica que se obtienen en 2) se suspenden en un medio de cultivo AIM-V (Invitrogen). En el presente documento, una solución en la que se suspenden las células mononucleares de sangre periférica se denomina suspensión celular. Además del medio de cultivo descrito anteriormente, se pueden utilizar medios disponibles comercialmente para el cultivo celular tales como medio RPMI-1640 (Invitrogen), medio Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen, de aquí en adelante designado DMEM), o medio de Iscove (Invitrogen; de aquí en adelante designado IMEM).

4) La suspensión celular obtenida en 3) se siembra en un matraz, una bolsa, o una placa.

5) Se añade un aminobifosfonato a una concentración de $0,05$ a $100 \mu\text{M}$, preferentemente de $0,1$ a $30 \mu\text{M}$ a las células mononucleares de sangre periférica sembradas en el matraz, bolsa o placa.

En el presente documento, el bifosfonato es un análogo del ácido pirofosfórico y es un compuesto en que el O (átomo de oxígeno) en el esqueleto P-O-P del ácido fosfórico se ha sustituido por un C (átomo de carbono) (P-C-P). Se usa en general como fármaco terapéutico para la osteoporosis. El aminobifosfonato se refiere a un compuesto que tiene N (átomo de nitrógeno) entre los bifosfonatos. Por ejemplo, el aminobifosfonato que se utiliza en la presente invención no está particularmente limitado; se pueden utilizar los aminobifosfonatos y similares que se desvelan en los documentos WO 2006/006720 y WO 2007/029689. Ejemplos específicos de los mismos incluyen el ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. La concentración de los aminobifosfonatos es preferentemente de 1 a $30 \mu\text{M}$ para el ácido pamidrónico, su sal y/o su hidrato, 1 a $30 \mu\text{M}$ para el ácido alendrónico, su sal y/o su hidrato, y $0,1$ a $10 \mu\text{M}$ para el ácido zoledrónico, su sal y/o su hidrato. En el presente documento, se añaden $5 \mu\text{M}$ de ácido zoledrónico como ejemplo.

6) Cuando se añade el aminobifosfonato en 5), se añade junto con un antígeno de enfermedad. En el presente documento, la "enfermedad" es, por ejemplo, cáncer o infección. El cáncer no está particularmente limitado e incluye cualquier cáncer, ejemplos de los mismos incluyen cánceres difíciles de tratar. Ejemplo de la infección incluyen una infección vírica tal como SIDA o hepatitis B o C, infección celular, infección bacteriana, infección fúngica, o infección por protozoos.

Como forma del antígeno, se puede utilizar un péptido, una proteína, o similares según se necesite. Se puede utilizar el lisado de cáncer o células infectadas, células apoptóticas, células necróticas, productos tratados por calor de los mismos y similares.

El antígeno puede derivarse de un paciente (por ejemplo, un tejido tumoral o similar aislado por cirugía de un paciente) o sintético. El uso de un péptido sintético puede reducir la carga de un paciente en comparación con el uso de un antígeno del cáncer recolectado del propio tejido canceroso del paciente o similar.

La cantidad añadida puede ser del orden de $0,02$ a $2 \mu\text{g/ml}$ para un péptido. Por ejemplo, se añaden $2 \mu\text{g/ml}$.

El orden en el que se añaden el aminobifosfonato y el antígeno de enfermedad no está particularmente limitado y ambos se pueden añadir simultáneamente o cualquiera de ellos se pueden añadir antes; sin embargo, es preferible la adición simultánea.

6) Además, se añade IL-2 a una concentración de 50 a 2.000 U/ml, más preferentemente 500 a 1.000 U/ml del medio de cultivo anterior.

7) Tras la adición de IL-2, se lleva a cabo el cultivo a 34 a 38 °C, más preferentemente a 37 °C en presencia de un 2 a 10% , más preferentemente un 5% de CO_2 . En esta ocasión, se añade adecuadamente un medio de cultivo dependiendo del número de células cultivadas. Además, se añade adecuadamente IL-2 a una concentración de 50 a 2.000 U/ml, más preferentemente 400 a 1.000 U/ml cuando crece medio de cultivo.

8) Además, se añade suero en una cantidad de $0,1$ a 20% de la solución de cultivo anterior. Como suero, se puede utilizar suero fetal bovino (de aquí en adelante designado como FCS), suero AB, o auto-plasma, por ejemplo.

De esta manera, cuando el periodo de cultivo es de 7 días o más, se obtiene un grupo de células que comprende CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta\text{T}$ con alta pureza; sin embargo, el cultivo se lleva a cabo preferentemente durante 14 días para aumentar más el número de células.

El plasma también se añade preferentemente a la solución de cultivo durante la etapa de cultivo anterior. El tiempo de adición que varía aproximadamente entre 0 a 100 horas tras el inicio del cultivo hace posible que se lleve a cabo el cultivo satisfactoriamente.

<Segunda realización: Un método para producir un agente farmacéutico que comprende CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ >

5 En el método de la presente invención para producir un agente farmacéutico que comprende CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$, se obtiene el agente por adición de un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato a la sangre periférica al principio del cultivo.

10 Una inmunoterapia convencional utilizaba un solo tipo de células, o usaba una pluralidad de tipos de células añadiendo estos tipos de células cultivadas por separado tras mezclarlas en el momento de la administración o simultáneamente.

15 Por el contrario, el agente farmacéutico se obtiene cultivando simultáneamente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ por el método de inducción de la presente invención, lo que permite un gran número de células que se obtiene muy simplemente. El uso de tal agente farmacéutico tiene la ventaja de que proporciona una eficacia terapéutica más alta que la del uso convencional de un solo tipo de células inmunitarias debido al efecto sinérgico entre los CTL específicos de antígeno de enfermedad y las células $\gamma\delta T$.

20 El método de la presente invención para producir un agente farmacéutico será descrito específicamente a continuación.

1) Las células obtenidas por el método del cultivo de la presente invención se recolectan por centrifugación o similar.

25 2) Las células recolectadas se lavan en una solución de lavado. La solución de lavado preferiblemente es una solución isotónica, que tiene la misma presión osmótica que las células, y más preferentemente un líquido que se pueda utilizar como una medicina. En el presente documento, considerando que se administra a pacientes, son preferibles, por ejemplo la solución salina o PBS (solución salina fosfato tamponada).

30 3) Se puede recolectar una población de linfocitos que contiene predominantemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ tras el lavado por centrifugación o similar y suspenderse en un líquido que se pueda utilizar como una medicina, por ejemplo, solución salina para preparar el agente farmacéutico. En el presente documento la cantidad utilizada del líquido para la suspensión se ajusta apropiadamente dependiendo del número de células que se administren y el método de administración.

35 En la población de linfocitos que contiene predominantemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ que se utiliza en el agente farmacéutico, el número de células se selecciona apropiadamente dependiendo del método de administración, el tipo de enfermedad, la patología de un paciente, y similares; sin embargo, se prefiere típicamente de 10^8 a 10^{12} /persona, más preferentemente 10^9 /persona o más.

40 4) Posteriormente, estas se suspenden en solución salina para proporcionar el agente terapéutico. El agente terapéutico se puede utilizar como un agente terapéutico/profiláctico para el cáncer o una infección.

En el presente documento, en el caso del uso como agente terapéutico/profiláctico para infecciones víricas, el agente terapéutico se puede combinar también con una citoquina tal como IL-2 o IL-12.

45 En el caso del uso de un agente terapéutico/profiláctico para infecciones víricas, el agente farmacéutico se puede combinar también con interferón γ (IFN- γ) o similares.

50 5) El método de administración puede ser por ejemplo por inyección intravenosa, intradérmica o subcutánea, inyección directa en una lesión, o administración sistémica por infusión gota a gota. Además, puede ser por inyección en una arteria en la zona próxima a la lesión.

<Tercera realización: Método terapéutico/profiláctico que implica la administración de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ >

55 El método terapéutico/profiláctico desvelado en el presente documento es un método terapéutico/profiláctico que implica la administración de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ obtenidos por adición al cultivo de un antígeno y un aminobifosfonato a la sangre periférica al inicio del cultivo.

60 El método terapéutico/profiláctico desvelado en el presente documento se describirá específicamente a continuación.

1) Las células obtenidas por el método de cultivo de la presente invención se recolectan por centrifugación o similar.

65 2) Las células recolectadas se lavan en una solución de lavado. La solución de lavado es preferentemente una solución isotónica que tiene la misma presión osmótica que la de las células y más preferentemente un líquido que

sea posible utilizar como una medicina. En el presente documento, considerando que se administra a pacientes, se usa preferentemente, por ejemplo solución salina o PBS (solución salina de fosfato tamponada).

- 5 3) Se puede recolectar una población de linfocitos que contiene predominantemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ que se obtienen tras el lavado, por centrifugación o similar y suspenderse en un líquido utilizable como una medicina, por ejemplo, solución salina para preparar una suspensión que se utiliza en el método terapéutico/profiláctico. En el presente documento, la cantidad que se utiliza del líquido para la suspensión se ajusta apropiadamente dependiendo del número de células que se administren y el método de administración.
- 10 En la población de linfocitos que contiene predominantemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ que se utiliza en el método terapéutico/profiláctico el número de células se selecciona apropiadamente dependiendo del método de administración, el tipo de enfermedad, la patología del paciente, y similares; sin embargo es típicamente preferentemente de 10^8 a 10^{12} /persona, más preferentemente 10^9 /persona o más.
- 15 4) Posteriormente, se suspenden en solución salina para proporcionar una suspensión celular.

En el presente documento, en el caso del tratamiento o prevención del cáncer, el agente farmacéutico desvelado en el presente documento también se puede combinar con una citoquina tal como IL-2 o IL-12.

- 20 En el caso del tratamiento o prevención de una infección vírica, el agente farmacéutico que se desvela en el presente documento también se puede combinar con interferón- γ (IFN- γ) o similar.
- 25 5) El método de administración puede ser por ejemplo, por inyección intravenosa, intradérmica o subcutánea, inyección directa en el área afectada, o la administración sistémica por infusión gota a gota. Además, puede ser por una inyección en una arteria en la vecindad de un área afectada.

La presente invención se describirá a continuación en detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, se tiene que entender que la presente invención no pretende limitarse por estos.

30 **Ejemplo 1**

Método de cultivo / inducción de la presente invención

- 35 1) Se recolectó sangre periférica (42 ml) de un donante sano y se separaron de la misma las células mononucleares de sangre periférica utilizando una solución en gradiente de densidad para la separación de las células sanguíneas.
- 2) Las células mononucleares de sangre periférica se suspendieron en AIM-V.
- 40 3) Estas células mononucleares de sangre periférica (8×10^8 / 4ml) se sembraron en una placa de 6 pocillos (SUMILON). A estas se les añadieron 1.000 U/ml de IL-2, a la que se añadieron además $5 \mu M$ de ácido zoledrónico (ZOMETA (nombre comercial)) y $2 \mu g/ml$ de Mart-1 (A27L, secuencia ELAGIGILTV) como péptido, y a continuación se inició el cultivo bajo condiciones de $37^\circ C$ y un 5% de CO_2 .
- 45 4) Además, se añadió suero AB en una cantidad del 10% tras el comienzo del cultivo.
- 5) Se añadieron AIM-V que contenía 1.000 U/ml de IL-2 y suero AB dependiendo de la proliferación de las células, que se cultivaron entonces durante 14 días.
- 50 6) En la población celular que se obtiene tras el cultivo durante 7 días o 14 días, como se ha descrito anteriormente, se midió el porcentaje de células T positivas a CD8 específicas de antígeno de enfermedad y el porcentaje de células que expresaban TCRV γ 9 utilizando un anticuerpo anti-CD8 (BD Pharmigen), Tetrámero T-select HLA-A*0201 Mart-1 ELAGIGILTV (MBL), un anticuerpo anti TCRV γ 9 (Beckman Coulter) y un anticuerpo anti-CD3 (Beckman Coulter) con un clasificador celular activado por fluorescencia (de aquí en adelante designado FACS; Epics XL-MCL ADC, Beckman Coulter). Los valores obtenidos por la medición se muestran a continuación.
- 55

[Tabla 1]

Porcentaje (%) de células T positivas a CD8 específicas de antígeno de enfermedad contenidas en las células mononucleares el día 7 y día 14 de cultivo

Número de días del cultivo	7 Días		14 Días	
Antígeno de enfermedad	-	+	-	+
Donante: A	0,00	0,41	0,00	0,36
Donante: B	0,01	0,26	0,00	0,09
Donante: C	0,02	0,14	0,00	0,10

[Tabla 2]

5

Porcentaje (%) de células $\gamma\delta$ T contenidas en las células mononucleares el día 7 y día 14 de cultivo

Número de días del cultivo	7 Días		14 Días	
Antígeno de enfermedad	-	+	-	+
Donante: A	43,7	41,9	80,9	80,6
Donante: B	68,2	62,6	99,0	99,5
Donante: C	28,6	26,8	89,2	85,7

[Tabla 3]

Expansión (veces) de células T positivas a CD8 específicas de antígeno de enfermedad contenidas en las células mononucleares el día 7 y día 14 de cultivo

Número de días del cultivo	7 Días		14 Días	
Antígeno de enfermedad	-	+	-	+
Donante: A	0,00	74,46	0,00	2495,68
Donante: B	1,79	31,42	0,00	343,73
Donante: C	0,57	4,31	0,00	151,88

10 [Tabla 4]

Expansión (veces) de células $\gamma\delta$ T contenidas en las células mononucleares el día 7 y día 14 de cultivo

Número de días del cultivo	7 Días		14 Días	
Antígeno de enfermedad	-	+	-	+
Donante: A	50,40	42,28	4027,31	3104,19
Donante: B	31,31	19,40	1328,85	974,39
Donante: C	4,97	5,00	1244,02	786,25

Los resultados anteriores confirmaban que se obtenía una población de linfocitos que contenía predominantemente células T positivas a CD8 específicas de antígeno de enfermedad (CTL) y células $\gamma\delta$ T por la adición simultánea de un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato en el cultivo.

5 **Ejemplo 2**

Estudio del efecto de la adición de antígeno de enfermedad sobre la tasa de expresión de CD56 en las células $\gamma\delta$ T

10 Se examinó si la adición de un antígeno de enfermedad afectaba o no a la tasa de expresión de CD56 en las células $\gamma\delta$ T por los siguientes procedimientos. El CD56 es una isoforma de una molécula de adhesión neural (N-CAM) y un factor de adhesión conocido como un marcador para las células NK. Es uno de los marcadores que proporcionan indicadores de la actividad citotóxica de las células $\gamma\delta$ T.

15 1) Se recolectó sangre periférica (8 ml) de un donante sano y se separaron de la misma las células mononucleares de sangre periférica utilizando una solución en gradiente de densidad para la separación de las células sanguíneas.

2) Las células mononucleares de sangre periférica resultantes se suspendieron en AIM-V.

20 3) Estas células mononucleares de sangre periférica ($1,8 \times 10^6$ / 25 ml) se sembraron en una placa de 12 pocillos (SUMILON). A las mismas se añadieron 1.000 U/ml de IL-2, a la que se añadió además 5 μ M de ácido zoledrónico (ZOMETA) y 2 μ g/ml de Mart-1 (A27L) como un péptido, iniciando a continuación el cultivo bajo condiciones de 37 °C y una concentración de CO₂ del 5%.

25 4) Además, se añadió suero AB en una cantidad del 10% después del inicio del cultivo.

5) Se añadió AIM-V que contenía 1.000 U/ml de IL-2 y suero AB dependiendo de la proliferación de las células, que se cultivaron durante hasta 14 días.

30 6) En la población celular que se obtuvo tras el cultivo durante hasta 14 días como se ha descrito anteriormente, se midió el porcentaje de células que expresaban TCRV γ 9 o el porcentaje de células que expresaban CD-56 utilizando un anticuerpo anti-TCRV γ 9 (Beckman Coulter), un anticuerpo anti-CD56 (Beckman Coulter) y un anticuerpo anti-CD3 (Beckman Coulter) por FACS (Epics XL-MCL ADC, Beckman Coulter). Los valores que se obtuvieron de la medición se muestran en la Tabla 5.

35 [Tabla 5]

Tasa de expresión del antígeno de superficie (%) de células $\gamma\delta$ T contenidas en las células mononucleares el día 13 del cultivo

Área de la ventana de análisis	Antígeno de superficie	Tasa de Expresión (%)	
		Antígeno de enfermedad (-)	Antígeno de enfermedad (+)
Células vivas	CD3	98,5	98,4
	V γ 9-TCR	97,0	96,5
	CD56	54,4	51,2
CDS	CD56	53,1	49,9
V γ 9	CD56	53,1	49,6

40 Como se muestra en la Tabla 5, no se observó ninguna diferencia en la tasa de expresión del antígeno de superficie en las células $\gamma\delta$ T entre el caso en el que no se añadía el antígeno de enfermedad (-) y el caso en el que se añadía el antígeno de enfermedad (+), confirmando que la adición de este antígeno no tiene una gran influencia en la tasa de expresión de las células $\gamma\delta$ T.

Aplicabilidad industrial

45 Como se ha descrito anteriormente, el método para inducir simultáneamente CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta$ T de acuerdo con la presente invención, hace posible en una muestra de sangre, la proliferación e inducción de ambos tipos de células en una cantidad de células que permite que cada tipo de células ejerza un efecto terapéutico mientras que en los métodos convencionales los CTL específicos de antígeno de

5 enfermedad y las células $\gamma\delta$ T se cultivaban por separado. Esto hace posible que tanto las células inmunitarias específicas y no específicas del antígeno de enfermedad se utilicen simultánea y simplemente para el tratamiento médico, lo que puede mejorar el efecto terapéutico de las mismas y reducir la carga sobre los pacientes. Además, se puede disfrutar de esta ventaja en términos de los aspectos económicos tales como el coste del cultivo debido a que se pueden unificar las etapas en una sola etapa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para producir una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$, en que el método comprende las etapas de: añadir un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato a una población de células mononucleares de sangre periférica y cultivar las células mononucleares de sangre periférica resultantes que comprenden dichos CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$.
- 10 2. El método de producción de una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de adición de un antígeno de enfermedad y un aminobifosfonato se lleva a cabo el primer día del cultivo.
- 15 3. El método de producción de una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el aminobifosfonato es ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los mismos.
- 20 4. El método de producción de una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno de enfermedad es un antígeno del cáncer.
- 5 5. El método de producción de una población celular mixta de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de enfermedad y el aminobifosfonato se añaden simultáneamente.
- 25 6. Un método de producción de un agente farmacéutico que comprende la producción de CTL específicos de antígeno de enfermedad y células $\gamma\delta T$ por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.